



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Stryphnodendron adstringens: ANÁLISE FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO* E
IN VIVO

MARINGÁ

2011

SANDRA CRISTINA GIROTTO PINTO

***Stryphnodendron adstringens*: ANÁLISE FITOQUÍMICA E BIOLÓGICA *IN VITRO*
E *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

B928c Bueno, Fernanda Giacomini, 1982-
Controle de qualidade, desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação da atividade cicatrizante de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. / Fernanda Giacomini Bueno. -- Maringá, 2010.
118, [120] f. : figs. color., tabs.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010.

1. *Caesalpinia peltophoroides* Benth. - Atividade antioxidante. 2. *Caesalpinia peltophoroides* Benth. - Atividade cicatrizante. 3. Polifenóis. 4. Espectroscopia UV/VIS. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22.ed. 615.32374

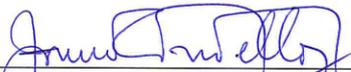
SANDRA CRISTINA GIROTTO PINTO

**“STRYPHODENDRON ADSTRINGENS: ANÁLISE FITOQUÍMICA E
BIOLÓGICA *IN VITRO* E *IN VIVO*”**

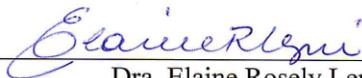
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 25 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Elaine Rosely Lepri
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Maria da Conceição Torrado Truiti
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e ao meu esposo principalmente pela compreensão e apoio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este mestrado.

Ao meu esposo Agnaldo pela compreensão, ajuda e paciência em todos os momentos.

Aos meus pais, Álvaro e Maria, pelo amor e apoio ao longo desta caminhada.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Jessica, pelo carinho, amor e amizade.

Ao prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello pela compreensão, paciência e confiança no meu trabalho.

Aos professores que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, Profa. Dra. Eneri Leite Mello, Profa. Dra. Gisely Lopes e Prof. Dr. Mauro Baesso.

À minha grande amiga Fernanda Bueno pela ajuda em todas as etapas do meu trabalho, pela amizade, compreensão, uma pessoa muito especial que eu sou grata eternamente por tudo que me ajudou durante o mestrado.

Aos técnicos de laboratório, Admir, Marli, Cláudio, Maria Eurides, Maria Ângela e Maria dos Anjos pela amizade, pela compreensão e pela ajuda.

Aos meus companheiros de trabalho, Alessandra, Maria Angélica, Ana Carolina e principalmente o Paulo Vitor e a Elaine. Ao Gutierrez pelas análises de fotoacústica.

Ao Fabio Rosado pela ajuda nas análises de Western Blotting.

À Traudi em especial, por ter me alojado em sua casa durante boa parte do mestrado, por sua amizade e companheirismo.

À todos os companheiros da pós-graduação que estiveram presentes nestes anos.

À Diretora da Biocinese - Centro de Estudos Biofarmacêuticos, Josélia Manfio, pela oportunidade e liberação para afastamento temporário da empresa para conclusão do mestrado.

À Ivonete Hoss pela ajuda aos domingos nas análises, ao Mauricio pelo auxílio na parte estatística, ao Wagner e Maycon pela ajuda com os artigos, à Mariely pelo auxílio na formatação do trabalho e a todos os companheiros da Biocinese pelo apoio.

À Fabiane Hoffmann pela grande ajuda na preparação para prova de proficiência em língua inglesa.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos auxílios concedidos.

RESUMO

Os extratos das cascas de *Stryphnodendron adstringens* possuem excelente atividade cicatrizante já comprovada em animais de laboratório sadios. Isto é um bom indicador de que o extrato desta planta possa ter ação eficaz no tratamento de feridas crônicas em ratos diabéticos. Este trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação estrutural de taninos de uma fração semipurificada obtida de *Stryphnodendron adstringens* utilizando diferentes métodos cromatográficos, avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto (EB) e semipurificado (frações acetato de etila –FAE e aquosa –FA) pelo método do radical livre DPPH, e avaliar a atividade cicatrizante do extrato bruto em ratos diabéticos. O isolamento das substâncias foi realizado por cromatografia em coluna, cromatografia em contra-corrente de alta velocidade (CCCAV) e cromatografia em camada delgada, e a identificação destas substâncias realizada por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY ^1H - ^1H , HMQC e HMBC), espectrometria de massas e ópticos. A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH, avaliando-se o IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). A atividade cicatrizante foi analisada aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento com gel contendo 1% do EB através do comprimento e espessura da área re-epitelizada, análise de permeação cutânea através de espectroscopia fotoacústica, quantidade de células em metáfases e fibras colágenas (tipo I e III). Foram obtidas 21 subfrações da cromatografia em coluna. As subfrações F4, F5, F6 e F7 foram cromatografadas em CCCAV pra separação das substâncias. Foram identificadas as substâncias 4'-O-metil-galocatequina, galocatequina, epigalocatequina e 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina. A capacidade antioxidante das amostras foram: EB=3,99, FAE=3,47, FA=5,19 e vitamina C= 5,19, sendo que o EB e a FAE possuem uma atividade antioxidante cerca de 1,3 e 1,5 vezes maior que a vitamina C, respectivamente. A avaliação da atividade cicatrizante mostrou a formação de uma área re-epitelizada maior no grupo dos animais tratados com EB aos 4 e 7 dias e mais espessa aos 12 e 17 dias, assim como a estimulação da maturação das fibras colágenas (tipo I) aos 17 dias e da proliferação celular das metáfases aos 4 e 7 dias. Na avaliação da atividade cicatrizante, comprovou-se a permeação do EB em todos os tempos analisados e que o gel contendo EB mostrou ação sobre o reparo tecidual, favorecendo uma cicatrização mais rápida e resistente aos 17 dias de tratamento, em relação ao controle. A análise por Western Blotting comprova a maior presença de vasos sanguíneos aos 7 dias pela expressão em grande quantidade de VEGFR.

PALAVRAS-CHAVES: *Stryphnodendron adstringens*, Cicatrização, Diabetes mellitus, Taninos condensados, Capacidade antioxidante *in vitro*, VEGFR.

ABSTRACT

The extracts from the barks of *Stryphnodendron adstringens* have excellent wound healing activity demonstrated in healthy laboratory animals. This is a good indicator that the extract of this plant would have effective action in the treatment of chronic wounds in diabetics rats. The aim of this study was the isolation and structural identification of tannins of a semipurified fraction obtained from *Stryphnodendron adstringens* using different chromatographic methods, evaluation *in vitro* the antioxidant capacity of crude (CE) and semipurified extracts (Ethyl-acetate –EAF and Aqueous -AF Fractions) by free radical DPPH method, and evaluation the wound healing activity of CE in diabetic rats. The isolation of the compounds was performed by column chromatography, high speed countercurrent chromatography (HSCCC) and TLC. The identification of the compounds carried out by spectroscopic methods of nuclear magnetic resonance (NMR) 1D (^1H and ^{13}C), 2D NMR (^1H - ^1H COSY, HMQC and HMBC), mass spectrometry and optical. The antioxidant capacity was determined by DPPH assay, to evaluate the IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$). The wound healing activity was assessed at 4, 7, 12 and 17 days of treatment with a gel containing 1% of CE across the length and thickness of the re-epithelialized area, analysis of skin permeation by photoacoustic spectroscopy, number of cells and fibers in metaphase collagen (types I and III). From column chromatography 21 subfractions were obtained. Subfractions F4, F5, F6 and F7 were chromatographed on HSCCC for separation of compounds. The compounds 4'-O-methyl-gallocatechin, gallocatechin, epigallocatechin and 4'-O-methyl-gallocatechin-(4 α →8)-4'-O-methyl-gallocatechin were identified. The antioxidant capacity of the samples were: CE=3.99, EAF=3.47, AF=5.19 and vitamin C = 5.19, and the CE and the EAF have an antioxidant capacity about 1.3 and 1.5 times greater than vitamin C, respectively. The evaluation of wound healing activity showed the formation of a re-epithelialized area greater in animals treated with CE at 4 and 7 days and thicker at 17 days, as the proliferation of metaphases after 4 and 17 days. The stimulation of maturation of collagen fibers (type I) at 17 days of treatment was highest in treatment with the gel containing 1% CE. In assessing the wound healing activity, proved the permeation of EB in all periods analyzed and the gel containing EB showed activity on the tissue repair, providing more rapid and strong healing at 17 days of treatment with regard to control. The analysis by Western Blotting confirms the presence of larger blood vessels at 7 days in large quantities by the expression of VEGFR.

KEYWORDS: *Stryphnodendron adstringens*, Wound healing, Diabetes mellitus, Condensed tannins, Antioxidant capacity *in vitro*, VEGFR.

NOTA BIOGRÁFICA



Sandra Cristina Giroto Pinto nasceu em Toledo-Pr, no dia 08 de outubro de 1981. Em 1999, concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Senador Atilio Fontana. Em 2002 iniciou o curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense – UNIPAR e neste período participou do Programa de Iniciação Científica PIC, sob a orientação da Profa. Dra. Sonia Aparecida Reis Lopes Shikida. Participou de projetos e grupos de pesquisa. Realizou estágio curricular no Laticínio Lacto Bom em Toledo, formando-se em 2005. Trabalha na Biocinese – Centro de Estudos Biofarmacêuticos na área de Equivalência Farmacêutica desde 2006 como analista junior I. Em 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, realizando atividades no laboratório de Farmacognosia sob a orientação do professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	(A) <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville; (B) Folíolos; (C) cascas picadas.....	19
2	Flavan-3-óis isolados das cascas de <i>S. adstringens</i> (Mart.) Coville.....	20
3	Prodelfinina dimérica isolada das cascas do barbatimão [4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)- 4'-O-metil-galocatequina].....	21
4	Novos dímeros isolados de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	22
5	Estrutura química de tanino hidrolisável (A) e condensado (B).....	26
6	Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto, fração acetato e fração aquosa de <i>S. adstringens</i>	33
7	Cromatografia em camada delgada das 21 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna.....	38
8	Espectro de massas da substância 4'-O-metil-galocatequina no modo ESI <i>m/z</i> 319,2.....	45
9	Espectro de RMN ¹ H da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz)	46
10	Espectro de HSQC da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD ₃ OD, relativo para TMS, 300 MHz).....	47
11	Espectro de HMBC da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz).....	48
12	Espectro de massas da substância galocatequina no modo negativo ESI <i>m/z</i> 305,1.....	50
13	Espectro de RMN ¹ H da substância galocatequina (CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz)	51
14	Espectro de massas da substância epigalocatequina no modo negativo ESI <i>m/z</i> 305,2.....	53
15	Espectro de RMN ¹ H da substância epigalocatequina (CD ₃ OD, relativo para TMS; 300 MHz)	54
16	Espectro de COSY ¹ H/ ¹ H da substância epigalocatequina (CD ₃ OD, 300 MHz).....	55
17	Espectro de massas da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina no modo negativo ESI <i>m/z</i> 1057.....	57
18	Espectro de RMN ¹ H da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (acetona- <i>d</i> ₆ , relativo para TMS; 300 MHz).....	58

19	Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (acetona- d_6 , 300 MHz).....	59
20	Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme.....	64
21	Fases de cicatrização: (A) fase inflamatória, (B) fase de proliferação e (C) fase de remodelagem	67
22	Fases da cicatrização com as respectivas migrações celulares em cada etapa.	67
23	Representação da família do VEGF e ligação com receptores (VEGFR); MMP9: matriz metaloproteinase.....	71
24	Esquema de uma célula fotoacústica.....	73
25	(A) Feridas realizadas no dorso dos animais e (B) punch utilizado para marcação no dorso.....	78
26	Corte histológico de pele de rato. Figura representativa da medida do comprimento (A) e espessura (B) da área re-epitelizada. As setas indicam o início e fim da área re-epitelizada (6 μm ; Hematoxilina-Eosina).....	79
27	Corte histológico de 6 μm de pele de rato corada por Hematoxilina-Eosina aumento de 40x. Fotomicrografia das metáfases (A) presentes na camada basal/supra basal (B) da área de re-epitelização.....	79
28	Corte histológico de pele de rato. Fotomicrografia da birrefringência das fibras colágenas tipo I (vermelha/amarela) e III (verde) da camada papilar de pele (picro-Sírius 6 μm) (aumento 20x).....	80
29	Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para medidas <i>in vitro</i>	82
30	Representação da média \pm desvio padrão da medida da língua de re-epitelização, em μm , aos 4 e 7 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada em ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	84
31	Representação da média \pm desvio padrão da espessura da epiderme, em μm , aos 12 e 17 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	84
32	Fotomicrografia de cortes histológicos da área re-epitelizada de um dos lados e do centro das feridas tratadas com gel contendo EB (A, B, C, e D) e com o gel base (E, F, G e H), aos 4, 7, 12 e 17 dias, respectivamente (n=5). As setas indicam início e fim da área re-epitelizada aos 4 e 7 dias e o centro da área aos 12 e 17 dias (HE, objetiva 10X)	86
33	Representação da média \pm desvio padrão do número de metáfases contadas na camada basal e suprabasal da área re-epitelizada das feridas com	

	tratamento aos 4, 7, 12 e 17 dias (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	88
34	Corte histológico de pele de rato Wistar, corado pela técnica de picro Sírius (aumento 20x). Captura de imagem de tecido de granulação (A) aos 4 dias de tratamento	90
35	Porcentagem de fibras colágenas tipo III e tipo I aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento (n=5)	92
36	Fotomicrografia da camada papilar da derme. Fibras colágenas aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento com gel contendo EB a 1% (A-D) e gel base (E-H), respectivamente (n=5)	93
37	(A) Gel corado com Comassie blue, (B) membrana corada com Ponceau-S, (C) e (D) bandas positivas após detecção com anticorpo primário anti-VEGFR. Detecção positiva das formas de alto peso molecular referente aos receptores VEGFR. T= Tratamento com gel contendo EB e C= tratamento com gel base aos 4, 7 e 12 dias de tratamento.....	94
38	Membrana de nitrocelulose após transferência submersa das proteínas separadas por SDS-page (10%). (A) membrana corada com Ponceau-S e (B) bandas positivas após detecção com anticorpo primário anti-VEGFR.....	95
39	Ampliação da região da banda de 45 kDa da análise de Western Blotting realizada com a pele tratada com o gel contendo EB (T) e pele tratada com gel base (C) em 4, 7 e 12 dias de tratamento	95
40	(A) Ferida aos 4 e (B) 7 dias de tratamento. Ferida tratada com gel contendo EB – lado esquerdo (T) e com gel base – lado direito (C).....	97
41	Espectro de absorção óptica do gel base, EB de barbatimão e gel contendo EB a 1%. As setas indicam a região de absorção do gel contendo EB à 280 nm	99
42	Espectros de absorção aos 4, 7, 12 e 17 dias (A, B, C e D) de tratamento da ferida com o gel base e o gel contendo EB a 1%, e o gel contendo EB a 1%, sem tratamento (n=2)	100
43	Diferença dos espectros de absorção do gel contendo EB a 1% e gel base aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento	101
44	Comportamento da permeação da formulação contendo 1% do EB.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Pág.
1	Subfrações obtidas por CC em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila	37
2	Dados de RMN ¹ H da substância I na forma livre (300 MHz; CD ₃ OD relativo ao TMS).....	44
3	Dados de RMN ¹ H da substância II na forma livre (300 MHz; CD ₃ OD relativo ao TMS).....	49
4	Dados de RMN ¹ H da substância III na forma livre (300 MHz CD ₃ OD relativo ao TMS).....	52
5	Dados de RMN ¹ H da substância IV na forma acetilada (300 MHz; acetona- <i>d</i> ₆ relativo ao TMS).....	60
6	Faixa de trabalho determinada na triagem para a análise de atividade sequestradora de DPPH.....	61
7	Capacidade antioxidante do extrato de frações <i>S. adstringens</i> pela redução de DPPH.....	62
8	Valores médios do comprimento (4 e 7 dias) e espessura (12 e 17 dias) da área re-epitelizada para as feridas tratadas com gel base e gel com EB (n=5)..	83
9	Número de metáfases/mm encontradas na camada basal e supra basal da área re-epitelizada para os dois tratamentos (n=5).....	87
10	Porcentagem de fibras colágenas tipo I e III presentes no gel base e gel com EB aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento (n=5).....	91

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Flux.	Título	Pág.
1	Fracionamento da subfração F4, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.....	40
2	Fracionamento da subfração F5, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.....	41
3	Fracionamento da subfração F6, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV	42
4	Fracionamento da subfração F7, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ASPECTOS GERAIS	19
2.1.1 Família Fabaceae	19
2.1.2 Gênero <i>Stryphnodendron</i>	19
2.1.3 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	20
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS	25
2.2.1 Substâncias fenólicas	25
2.2.2 Taninos	25
2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	28
2.3.1 Processo oxidativo	28
2.3.2 Antioxidantes	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 MATERIAL	32
4.1.1 Solventes, reagentes e soluções	32
4.1.2 Equipamentos	32
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	33
4.2.2 Preparação dos extratos	35
4.2.2.1 Extrato bruto (EB)	35
4.2.2.2 Fração acetato de etila (FAE)	35
4.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	35
4.3.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila	35
4.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	35
4.3.3 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) (MELLO, 1995)	36
4.3.4 Derivatização química (MELLO et al., 1996b)	36
4.3.5 Análise estrutural	36
4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	37
4.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (AMAROWICZ et al., 2004)	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38

9.1 ANÁLISE DA RE-EPITELIZAÇÃO	84
9.2 AVALIAÇÃO DA FIBROPLASIA.....	90
9.3 ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING	95
9.4 ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTANÊA	99
10 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO 1.....	117

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, o tratamento de uma série de doenças é realizado através de preparações à base de plantas medicinais. Estas desempenham papel fundamental na saúde mundial. Nas últimas décadas, a medicina moderna apresentou grandes avanços, contudo, as plantas ainda têm uma contribuição importante para a saúde (CALIXTO, 2000).

Muitas comunidades e grupos étnicos têm como único recurso terapêutico o uso de plantas medicinais, sendo que estas são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais de residências nas regiões menos desenvolvidas do país ou até mesmo nas grandes cidades brasileiras (MACIEL et al., 2002).

A partir de 1980, ressurgiu o interesse pela pesquisa das substâncias isoladas a partir de fontes naturais, servindo como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. As plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento no mundo inteiro mesmo com o crescimento de grandes laboratórios farmacêuticos e fármacos sintéticos, sendo observado nas últimas décadas a revalorização do emprego de preparações fitoterápicas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Ocorre atualmente uma grande procura da população pela fitoterapia, a busca pelo natural, fator determinante para a indústria farmacêutica investir na pesquisa de drogas vegetais, fato este relacionado com o aumento na pesquisa com extratos de plantas para descobrir novas substâncias ativas (RATES, 2001).

A diabetes mellitus (DM) constitui-se em um dos principais fatores de risco para as doenças do sistema circulatório. Entre as consequências mais frequentes do DM encontram-se o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular encefálico (AVE), a insuficiência renal crônica, as amputações de pés e pernas, a cegueira definitiva, os abortos e as mortes perinatais (BARBOSA et al., 2001).

Segundo Lau et al. (2009) cerca de 194 milhões de pessoas no mundo já sofrem de diabetes mellitus. A diabetes está associada a inúmeras complicações, como ulcerações, microangiopatia, que sem cuidados adequados podem causar o chamado pé diabético, causa frequente de internações hospitalares. Estas complicações estão afetando a população de forma crescente, tornando-se um sério problema de Saúde Pública (MILMAN et al., 2001).

A dificuldade na cicatrização de feridas pode ser uma consequência de estados patológicos associados à diabetes, perturbações-imune, isquemia e estase venosa e, em ferimentos, tais como queimadura. A diabetes prejudica numerosos componentes de cicatrização de feridas, incluindo a hemostasia e inflamação, matriz deposição e angiogênese. Estas deficiências estão presentes em uma ampla variedade de tecidos, incluindo a pele. Em feridas cutâneas de diabéticos foi observada alteração do fluxo

sanguíneo e diminuição do número de fatores de crescimento essenciais para a cicatrização de feridas, incluindo FGF-2, fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF)-B, e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GALIANO et al., 2004).

Os fatores de crescimento que são liberados por plaquetas, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos, para que ocorra o processo de cicatrização, são responsáveis pela atração das células da resposta inflamatória para o local da ferida. Em um processo de reparação de uma ferida normal ocorre a angiogênese, formação do tecido de granulação, epitelização, e remodelação do tecido, processos estes que podem estar ausentes em uma ferida diabética, causando a má cicatrização (WANG et al., 2008). A má cicatrização observada em feridas diabéticas inclui a inflamação prolongada, a insuficiência de neovascularização, a diminuição da síntese de colágeno, o aumento dos níveis de proteases e defeitos da função macrofágica. Estudos recentes demonstraram que os extratos de plantas melhoram a cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos (GUPTA et al., 2008).

CAPÍTULO I

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae compreende 727 gêneros e cerca de 19.327 espécies sendo a terceira maior família de Angiospermas. Do ponto de vista econômico é uma das mais importantes famílias com representatividade ecológica. No Brasil, são encontrados cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies que crescem em campos abertos e regiões de cerrado (LOPES et al., 2009).

Tradicionalmente a família tem sido dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Faboideae (HUTCHINSON, 1967; POLHILL et al., 1981; HEYWOOD, 1993). Plantas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae têm sido muito utilizadas na medicina popular. Esta subfamília compreende cerca de 80 gêneros e 3270 espécies de árvores e arbustos, sendo encontradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais (KHELLADI et al., 2010).

2.1.2 Gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* pertencente à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, ordem Fabales (CRONQUIST, 1988), é um dos que possui maior número de espécies na família, aproximadamente 48 espécies, as quais são ricas em taninos. Estudos realizados com o gênero *Stryphnodendron* mostraram atividades: antimicrobiana, antiviral, cicatrizante, antiúlcera, antioxidante, anti-inflamatória, antileishmania, dentre outras (LOPES et al., 2009).

Nas cascas de *S. obovatum* Benth. foram encontrados cerca de 15% e em *S. polyphyllum* Mart. 12% em taninos totais (SANCHES et al., 2002; LOPES et al., 2005). A capacidade de precipitar proteínas, particularmente salivares da cavidade oral caracteriza o sabor adstringente dos taninos, possibilitando seu fácil reconhecimento.

Extratos da casca de *S. polyphyllum* e *S. obovatum* são utilizados na medicina popular no tratamento de leucorreia e diarreia, como agentes antissépticos e anti-inflamatórios e também atuam na coagulação do sangue e cicatrização de feridas (LOPES et al., 2005). Devido ao alto teor de taninos condensados, extratos da casca de *S. polyphyllum* mostraram eficácia contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni* (BEZERRA et al., 2002).

S. obovatum possui a capacidade de inibição de crescimento das bactérias Gram positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, porém é inativa frente às bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SANCHES et al., 2002; SANCHES et al., 2005; LOPES et al., 2005).

Foram isolados também, deste gênero, triterpenos (cicloartanos e damaranso), fitoesteroides, esteroides pregnanos, cumarinas, lignanas, γ -lactonas, sesquiterpenos, aminoácidos (BELTRAME, 2005) e taninos (BURKILL, 1997).

2.1.3 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville caracteriza-se num arbusto ou árvore, com ramos curtos e grossos sendo as cascas recuadas no sentido transversal, com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na superfície interna. Suas folhas são alternas, grandes, duplicado-pinadas com aproximadamente 30 cm de comprimento, pinas com 9-12 julgos, de base oblíqua, arredondada e parte apical obtusa, glabros em ambas as faces e membranosos (Figura 1) (FERRI, 1969).

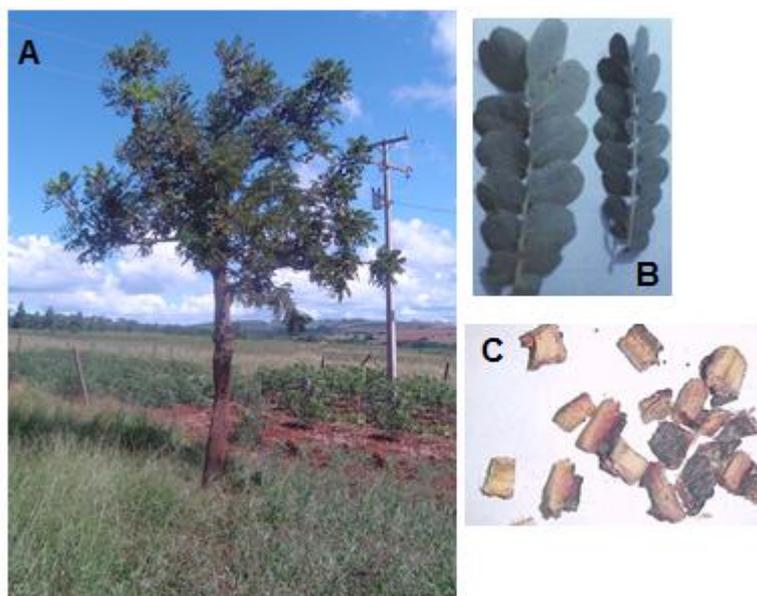


Figura 1 – (A) *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville; (B) Folíolos; (C) cascas picadas. Fotos: Marco Antonio Costa, 2007.

São conhecidas como “barbatimão” e são encontradas, principalmente, no cerrado brasileiro, sendo utilizadas como planta medicinal. Possuem alto teor de taninos, sendo mencionada na Farmacopeia Brasileira (2010) com conteúdo de cerca de 8% na casca. Mello et al. (1996a e 1996b) isolaram, a partir de liofilizados das cascas secas do *S. adstringens*, flavan-3-óis, prodelfinidinas e prorobinetinidinas (Figura 2), tendo suas estruturas elucidadas através de análise espectroscópica de RMN em 1D (^1H -RMN, ^{13}C -RMN), 2D (COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HETCOR e NOE), EI- e DCI-MS, além de métodos ópticos (polarimetria e dicroísmo circular). Além dessas, foi isolada e identificada uma nova prodelfinina, denominada 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (Figura 3) (MELLO et al., 1999; LOPES et al., 2009).

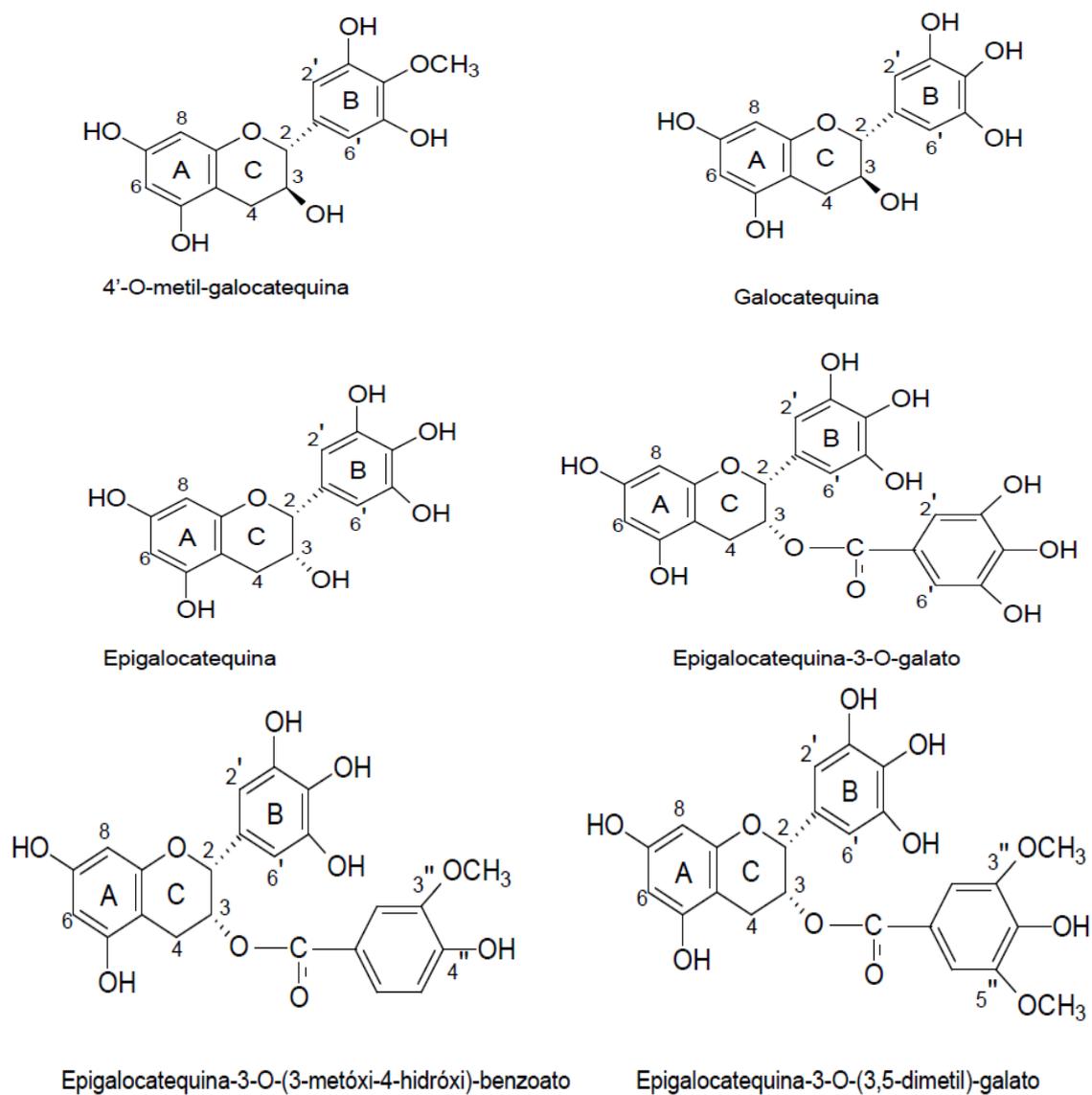


Figura 2 - Flavan-3-óis isolados das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville.

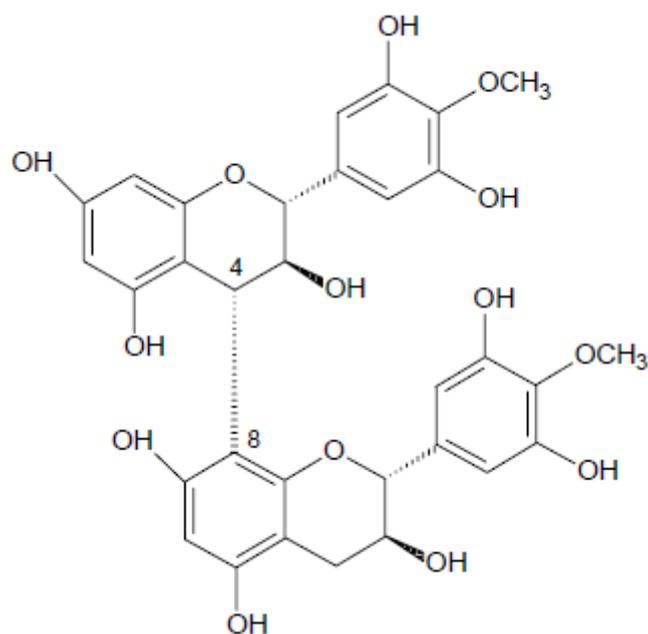


Figura 3 - Prodelfinidina dimérica isolada das cascas do barbatimão [4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina].

Lopes et al. (2009), isolaram e identificaram duas novas substâncias em *S. adstringens*, sendo denominadas 4'-O-metil-robenitinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-epigalocatequina e 4'-O-metil-robenitinidol-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (Figura 4).

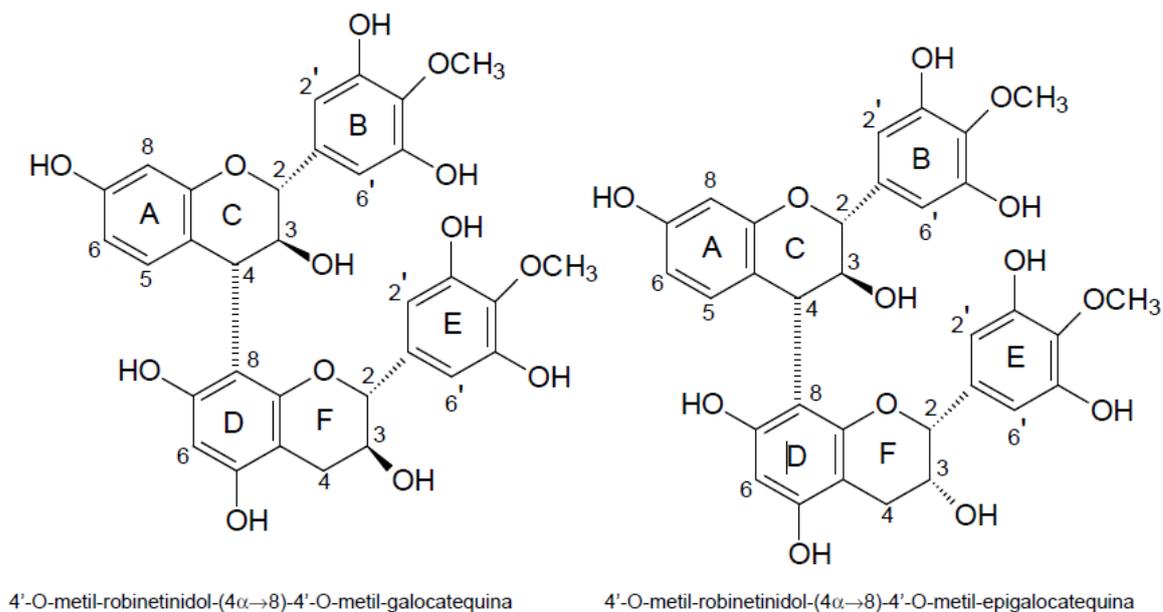


Figura 4 - Novos dímeros isolados de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

As cascas de *S. adstringens* são utilizadas pela população nativa como cicatrizante, antimicrobiano, no tratamento de leucorreia, blenorragia, diarreias, disenterias, hemorragias e no tratamento de úlceras (REBECCA et al., 2002).

Dados farmacológicos revelam que as doses eficazes do extrato bruto de *S. adstringens*, por via oral, variam de 200 a 800 mg/kg (BERSANI-AMADO et al., 1996; LIMA et al., 1998).

Soares et al. (2008), testaram extratos hidroalcoólicos de *S. adstringens* contra microrganismos da cárie dental, observando resultados promissores em todos os microrganismos testados, com melhor resultado para as cepas de *Streptococcus mitis* e *Lactobacillus casei*.

Quanto a ação antifúngica do *S. adstringens*, a mesma foi avaliada por Ishida et al. (2006), demonstrando atividade sobre *Candida* spp, especialmente sobre *C. albicans*, a qual é atribuída aos taninos condensados, inibindo o crescimento por afetar a integridade da parede celular, pela modificação da hidrofobicidade da superfície celular, inibição da formação do tubo germinativo e interferência no processo de brotamento. Os autores também demonstraram ações nos fatores de virulência do fungo, como inibição da aderência às células Vero e superfície inerte (vidro) e aumento do processo de fagocitose. Extratos aquosos e etanólicos de *S. adstringens* demonstraram eficácia na avaliação da suscetibilidade de microrganismos patogênicos orais, sendo constatado que os extratos aquosos possuem atividade contra *Streptococcus mutans*, *S. aureus*, *Actinobacillus*

actinomycescomitans e eficácia reduzida contra *C. albicans*, já o extrato etanólico possui tanto atividade antibacteriana, quanto atividade antifúngica (SANTOS et al., 2009).

As cascas de *S. adstringens* demonstraram atividade anti-inflamatória (BERSANI-AMADO et al., 1996; LIMA et al., 1998), capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Providencia* spp (BERSANI-AMADO et al., 1996; TOLEDO, 2002; AUDI et al., 2004) e também ação cicatrizante (VIEIRA et al., 1998; HERNANDES et al., 2010). Alves et al. (2000), verificaram atividade do extrato das cascas de *S. adstringens* contra bactérias como *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus* e *P. aeruginosa*.

Quanto ao potencial antiulcerogênico desta espécie testado em ratos, Martins et al. (2002) confirmaram os resultados relatados no trabalho de Audi et al. (1999).

A avaliação da atividade tripanocida *in vivo* de *S. adstringens* demonstrou redução significativa no número de parasitas circulantes no sangue, observando-se interferência na curva de parasitemia de *Trypanosoma cruzi* (HERZOG-SOARES et al., 2002). Este resultado foi confirmado por Luize et al. (2005) mostrando uma inibição do crescimento de *T. cruzi* de 51,9%. Toledo (2002) demonstrou atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, com inibição total do crescimento. O mesmo autor também demonstrou atividade antibacteriana contra *B. subtilis* e *E. coli*. Inibição do crescimento do protozoário *Herpetomonas samuelpessoai* também foi relatado (HOLETZ et al., 2005).

Extratos das cascas e das folhas de *S. adstringens*, quando testados contra *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*, demonstraram alta toxicidade, matando 100% dos moluscos na concentração de 100 ppm (BEZERRA et al., 2002).

Estudos realizados para avaliar a atividade antinociceptiva do extrato bruto e frações de *S. adstringens* demonstraram este efeito através de mecanismos periféricos, devido apresentarem efeito evidente nos modelos experimentais de contorção induzida por ácido acético e dor induzida pela formalina, não modificando significativamente o tempo de latência dos animais no teste da placa quente (MELO et al., 2007).

Lucena et al. (2009), avaliaram a capacidade de uma formulação à base de extrato da casca de *S. adstringens* em neutralizar os efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*, comprovando a inibição significativa das atividades hemorrágica e miotóxica nos grupos tratados.

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Substâncias fenólicas

Substâncias fenólicas abrangem uma ampla variedade de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais frequentemente combinadas com açúcares como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

Os fenóis possuem a habilidade de se complexarem com proteínas por pontes de hidrogênio. Quando os constituintes celulares das plantas se reúnem e as membranas são destruídas durante o processo de isolamento, os fenóis rapidamente se complexam com proteínas e como resultado, geralmente ocorre a inibição da atividade enzimática em extratos brutos de plantas. Por outro lado, os fenóis são por si só muito susceptíveis à oxidação enzimática e o material fenólico pode ser perdido durante os processos de isolamento, devido à ação de enzimas “fenolases” específicas presentes em todas as plantas. A extração dos fenóis de plantas com álcool em ebulição normalmente previne a oxidação enzimática (HARBORNE, 1998).

As substâncias fenólicas contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitas delas importantes economicamente pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Têm-se relatado atividade antioxidante, sugerindo que doenças causadas pelas oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de substâncias fenólicas (CARVALHO et al., 2004). Pulido et al. (2000), afirmaram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação parecem ser os critérios que regem o poder redutor dos polifenóis da dieta.

O processo clássico para detectar fenóis simples utiliza solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998). Além disso, os fenólicos são todos aromáticos, sendo assim, todos mostram uma intensa absorção na região do UV (HARBORNE, 1998; CARVALHO et al., 2004). Métodos espectrométricos são, dessa forma, especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

2.2.2 Taninos

A palavra tanino foi usada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais em couro (COSTA, 2002).

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM et al., 1975), sendo que sua ocorrência nas Angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998).

São substâncias fenólicas, solúveis em água com massa molecular entre 500 e 3000 Daltons ou u, que apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides e proteínas. Tais substâncias são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2004).

Industrialmente, os taninos são substâncias que, devido à habilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Nas células das plantas, os taninos estão localizados separadamente das proteínas e das enzimas do citoplasma, mas quando o tecido é danificado, quando um animal se alimenta, por exemplo, a reação de tanagem pode ocorrer, fazendo com que as proteínas fiquem menos acessíveis aos sucos gástricos do animal. Os tecidos ricos em taninos são, de fato, amplamente evitados pela maioria dos herbívoros, devido ao sabor adstringente. Portanto, uma das maiores funções dos taninos em plantas é a de ser uma barreira para herbívoros e insetos (HARBORNE, 1998).

A característica fundamental que dá aos taninos suas propriedades biológicas características, parece ser a alta concentração de grupos hidroxila orto-orientados (HASLAM, 1974).

Os taninos são classificados segundo a sua estrutura química em 2 grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Figura 5). Os taninos hidrolisáveis são caracterizados por um poliol central, geralmente *D*-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (SANTOS; MELLO, 2004). Os taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (FREUDENBERG; WEINGES, 1958 e 1960).

Taninos condensados e hidrolisáveis se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes. Enquanto as proantocianidinas ocorrem amplamente em Gimnospermas e Angiospermas, os taninos hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetalae das Dicotiledôneas (SANTOS; MELLO, 2004).

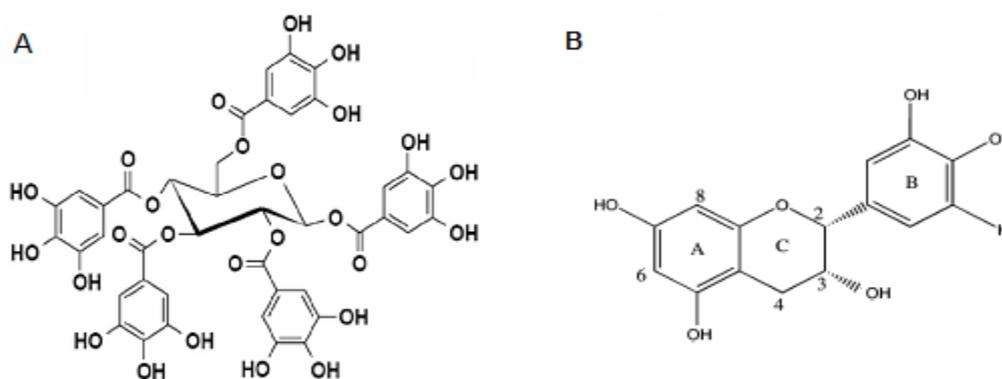


Figura 5 – Estrutura química de tanino hidrolisável (A) e condensado (B) (SCHOFIELD et al., 2001; CARVALHO, 2007).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida, fungicida (SANCHES, 2005), antiviral (OKUDA et al., 1993; FELIPE et al., 2006), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993), ação antitumoral (OKUDA et al., 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* e *Cryptococcus neoformans* (HOLETZ et al., 2005; ISHIDA et al., 2009), atividade cicatrizante (LOPES et al., 2005) e atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006). Os taninos podem atuar também como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2004).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Os taninos podem formar complexos com proteínas de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas. Já as interações covalentes ocorrem entre os núcleos aromáticos dos taninos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos

proteicos (LUCK et al., 1994). Esta propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (SCHOLZ, 1994).

A ação dos taninos na cura de feridas, queimaduras e inflamações ocorre através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Debaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. O mesmo mecanismo de ação ocorre no caso das úlceras gástricas (HASLAM, 1998). Lopes et al. (2005), observaram que o tratamento de feridas cutâneas com extratos semipurificados de *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, que contêm altas concentrações de taninos, promove um aumento significativo na proliferação celular da epiderme.

2.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

2.3.1 Processo oxidativo

Os radicais livres são formados a partir de reações de óxido-redução provocadas durante os processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias e sinalização intercelular e são reconhecidos por apresentarem efeitos benéficos e deletérios à saúde (RATMAN et al., 2006; BARREIROS; DAVID, 2006; GÜLÇİN et al., 2010). O efeito benéfico ocorre, pois em concentrações baixas atuam na regulação da apoptose de células pré-cancerígenas, na ativação de fatores envolvidos na resposta imune e na modulação da expressão de códigos genéticos de enzimas antioxidantes (VICENTE, 2009). No entanto, estes radicais livres constituem moléculas cuja estrutura química possui elétrons desemparelhados, sendo instáveis e altamente reativos, resultando no estresse oxidativo.

O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a taxa de produção e degradação de agentes antioxidantes, ou seja, ocorre quando há produção acelerada de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou deteriorização dos mecanismos envolvidos na proteção contra as EROs. Isto pode levar a danificação dos lipídeos celulares, proteínas ou DNA inibindo sua função normal, danos estes relacionados às doenças degenerativas crônicas como Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, diabetes mellitus, bem como no processo de envelhecimento precoce (VICENTINO; MENEZEZ, 2007).

Quando os radicais livres são formados em excesso, ocorre uma sobrecarga nas enzimas protetoras, como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, causando efeitos destrutivos e letais às células. Esse efeito letal ocorre através da oxidação das membranas lipídicas, proteínas celulares, DNA e enzimas, tendo como consequência o bloqueio da respiração celular. Além disso, as EROS parecem interferir na transmissão dos sinais celulares (ANTOLOVICH et al., 2002).

O radical hidroxila dificilmente pode ser sequestrado *in vivo* devido apresentar uma meia-vida curta, sendo o radical que provoca maior dano ao organismo. É formado por dois

mecanismos, como a quebra da água quando em exposição à radiação ultravioleta, radiação γ e raios x e pela reação do peróxido de hidrogênio com metais (M) de transição presentes nas células, como o cobre e o ferro, sendo demonstrado na equação 1 e 2, respectivamente (BARREIROS; DAVID, 2006).



As EROs podem ser produzidas por fontes endógenas ou exógenas. Através de fontes endógenas, originam-se por processo fisiológico natural do organismo, sendo produzidas nas mitocôndrias como um subproduto do metabolismo normal, exercendo ações na transcrição gênica, na tradução e regulação da atividade da guanilato ciclase nas células (SOARES, 2002; VICENTINO; MENEZEZ, 2007). Dentre os radicais livres gerados pelas fontes exógenas, incluem o tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (SOARES, 2002). As EROs mais comuns são os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila ($\text{OH}\cdot$), peroxila ($\text{RO}_2\cdot$), alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e hidroperoxila ($\text{HO}_2\cdot$). Através de reações químicas, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrato ($\text{ONOO}\cdot$), mesmo não sendo radicais livres podem levar a formação dos mesmos (VICENTINO; MENEZEZ, 2007).

2.3.2 Antioxidantes

Os seres vivos controlam a produção de radicais livres por diversos compostos antioxidantes, podendo ser de origem endógena ou proveniente da dieta alimentar e outras fontes. Lesões oxidativas de caráter cumulativo podem ocorrer quando há limitação da disponibilidade destes antioxidantes. Os radicais livres podem ser estabilizados ou desativados pelos antioxidantes para que não ataquem os alvos biológicos nas células (SOUZA et al., 2007).

Os antioxidantes têm o potencial de neutralizar os radicais livres e prevenir os danos causados por eles. Tem grande importância como agentes profiláticos e terapêuticos em muitas doenças, como o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes e neurodegenerativas (RATMAN et al., 2006).

Muitas plantas medicinais contêm grandes quantidades de substâncias fenólicas, as quais podem agir como substâncias antioxidantes, funcionando como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, sendo eficazes, portanto, para prevenir a oxidação lipídica (SOARES, 2002).

Os antioxidantes são classificados em dois grupos: os enzimáticos e não enzimáticos. Como exemplo de antioxidantes enzimáticos tem-se a superóxido dismutase

(SOD), catalase (CAT), e glutathione peroxidase (GPx). Os antioxidantes não enzimáticos geralmente são provenientes da alimentação, agem na neutralização dos radicais livres, quelando metais e bloqueando a ação das espécies reativas. As vitaminas E e C são exemplos de antioxidantes não enzimáticos (RATMAN et al., 2006; BARREIROS; DAVID, 2006).

3 OBJETIVOS

O objetivo do trabalho neste capítulo foi o isolamento e identificação estrutural de taninos de uma fração semipurificada obtida das cascas de *Stryphnodendron adstringens* utilizando diferentes métodos cromatográficos e avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto (EB) e de frações semipurificadas (frações acetato de etila e aquosa) pelo método do radical livre DPPH *in vitro*.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar extrato bruto e fração semipurificada.
- Determinar a capacidade antioxidante *in vitro* do extrato bruto, fração acetato de etila e fração aquosa.
- Isolar substâncias da fração semipurificada acetato de etila por diferentes métodos cromatográficos.
- Identificar estruturalmente substâncias isoladas por meio de métodos espectroscópicos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HMQC e HMBC), espectrometria de massas e ópticos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth®, exceto quando especificado.

- Acetona
- Álcool de cereais - Cereálcool
- BHT
- DPPH
- Metanol grau HPLC
- Nitrogênio líquido – Departamento de Física da UEM
- Vitamina C
- Acetato de Etila
- Ácido Fórmico

4.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom modelo 752A
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Bomba a vácuo Pfeiffer Vacuum modelo DV05
- Espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650
- Evaporador rotatório Büchi R-114 capacidade 2 L
- Liofilizador – Christ Alpha 1-4
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- Ultra-som Transsonic T460, 35 kHz
- Ultra-turrax UTC 115 KT
- Aparelho de ressonância magnética nuclear Varian Gemini 300BB
- Espectrômetro de massas Waters Quattro Premier
- Coletor de frações LKB Brama 2070 Ultropac® II
- Coletor de frações Pharmacia Biotech FRAC-200
- Câmera de lâmpada UV 254 nm
- Cromatógrafo de contra corrente líquido de alta velocidade com coluna de teflon de 130 m x 1,6 mm, manufaturado na Universidade Estadual de Maringá

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Matéria-prima vegetal

As cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville foram coletadas aos 15 de março de 2008 em São Jerônimo da Serra, Paraná, Brasil. Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico N° 11.995-2 Registro no IBAMA 1.844.493 Ministério do Meio Ambiente – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O material foi identificado pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui. As cascas foram secas em estufa de ar circulante forçado à 40 °C e após, moídas em moinho de martelos de aço inox Tigre ASN-5 sendo posteriormente utilizadas nas análises descritas na Figura 6.

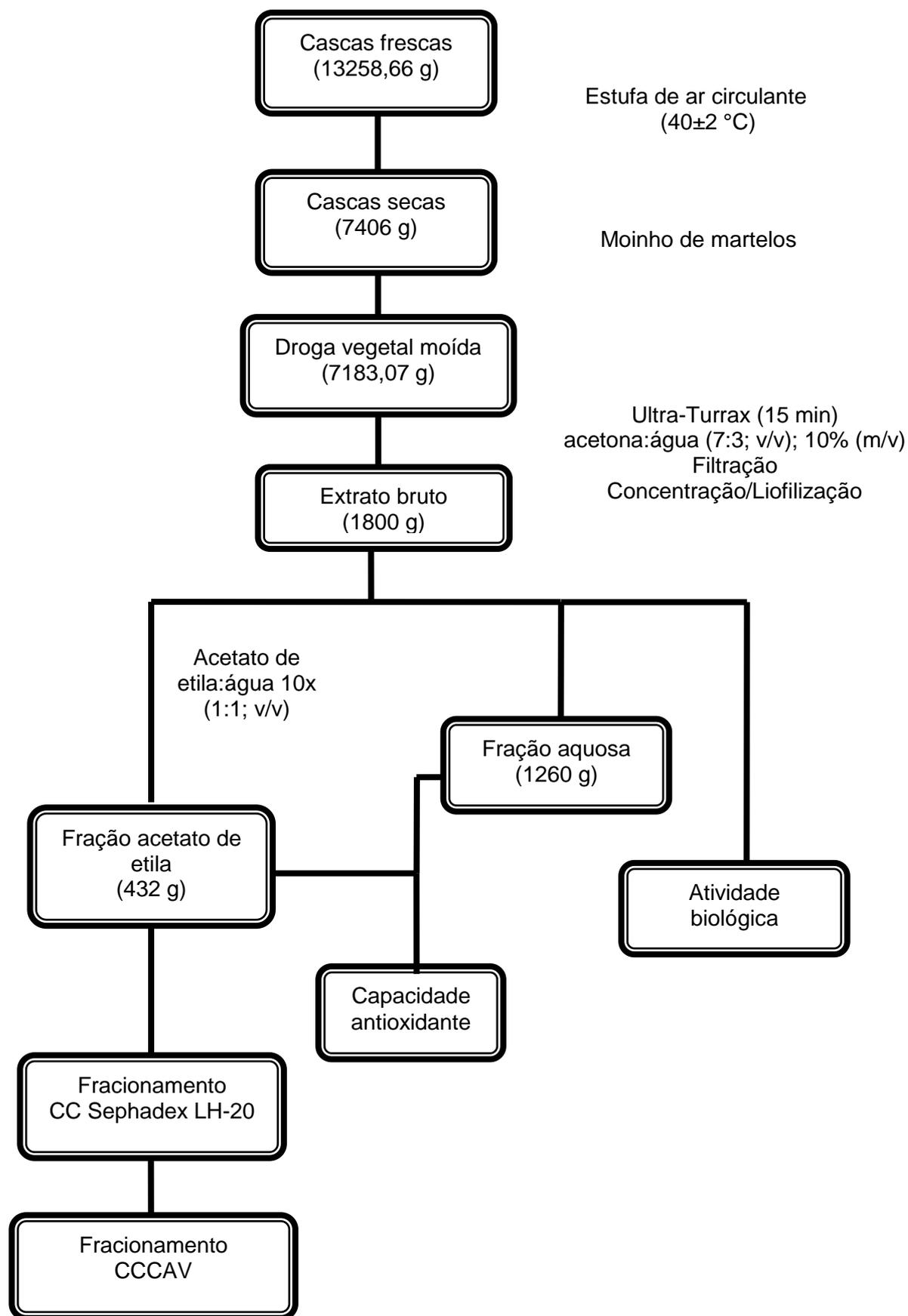


Figura 6 – Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto, fração acetato e fração aquosa de *S. adstringens*.

4.2.2 Preparação dos extratos

4.2.2.1 Extrato bruto (EB)

As cascas secas e cominuídas de *Stryphnodendron adstringens* foram empregadas no preparo do extrato bruto em Ultra-turrax UTC115KT, por 15 min, sem exceder a temperatura a 40 °C. A proporção utilizada foi de 1:10 (m/v), com a mistura de acetona-água (7:3; v/v) (CORK; KROCKENBERGER, 1991). Após a filtração por algodão, o filtrado foi concentrado em evaporador rotatório na temperatura média de 40 °C até completa eliminação do solvente orgânico, sob pressão reduzida, congelado e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto (EB).

4.2.2.2 Fração acetato de etila (FAE)

O EB (50 g) foi ressuspendido em água destilada (500 ml) e particionado com acetato de etila (500 ml; 10 vezes) (MELLO et al., 1996a). As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a FAE. A fase aquosa restante foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FA).

4.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

4.3.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila

A FAE foi fracionada, empregando-se uma coluna de vidro (h: 750 mm Ø 55 mm) contendo SEPHADEX® LH-20 (300 g) como fase estacionária. Após limpeza apropriada com ácido acético glacial 2%, a coluna foi estabilizada com etanol 50%. Foi adicionado cerca de 20 g de FAE no topo da coluna com auxílio de pipeta de Pasteur. Foi empregado a seguinte sequência de fase móvel em proporção volumétrica:

- | | |
|-----------------------|-------|
| 1. Etanol/água (1:1) | 8 l |
| 2. Etanol 100% | 6 l |
| 3. Acetona/água (7:3) | 2,5 l |

Foram recolhidos 10 ml de cada fração em tubo de ensaio com vazão de 1 ml/min. O monitoramento foi realizado através de cromatografia em camada delgada (CCD, seção 4.3.2). As subfrações foram reunidas por semelhança cromatográfica, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

4.3.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio de gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) com 0,200 mm de espessura, utilizando-se como sistema eluente, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram

visualizadas sob luz UV a 254 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em etanol.

4.3.3 Cromatografia em contra corrente de alta velocidade (CCCAV) (MELLO, 1995)

Foi utilizado cromatógrafo em contra corrente de alta velocidade equipado com coluna de politetrafluoroetileno (PTFE) de 2,5 mm de diâmetro interno, volume de 200 ml de capacidade total, injetor para 20 ml de amostra, 800 rpm e bomba de solvente de duplo pistão com capacidade de fluxo máximo 10 ml (Waters mod.510). O sistema eluente foi preparado em funil de separação com acetato de etila:*n*-propanol:água (140:8:80; v/v). A fase inferior foi utilizada como fase estacionária e a fase superior como fase móvel. Cada fração de 3 ml foi acompanhada por cromatografia em camada delgada (seção 4.3.2) e os tubos reunidos por semelhança.

4.3.4 Derivatização química (MELLO et al., 1996b)

Para quantidades de até 100 mg de substância, foram adicionados 1 ml de piridina e 1 ml de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 ml e a mistura foi deixada em repouso por 24 h. Após, foi adicionado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. A solução foi filtrada sob pressão reduzida através de funil de vidro sinterizado G3 e a substância acetilada foi lavada com água até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi solubilizada em acetona e a remoção do solvente foi realizada através de evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. A substância foi transferida para um frasco e colocada em capela de exaustão à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada.

4.3.5 Análise estrutural

As substâncias isoladas foram analisadas através de métodos de ressonância magnética nuclear (RMN) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$, HMQC e HMBC), no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os espectros das substâncias foram analisados e comparados com dados constantes na literatura. Os espectros de RMN foram obtidos em aparelho Varian, Mercury 300BB de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , com o uso de solventes deuterados (CD_3OD , acetona- d_6 e CDCl_3). Os espectros de massas foram obtidos junto a Biocinese- Centros de Estudos Biofarmacêuticos em Espectrômetro de massas Waters Quattro Premier.

4.4 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (AMAROWICZ et al., 2004)

Para obtenção da faixa de trabalho do extrato bruto, frações e antioxidantes sintéticos utilizados como padrão foram diluídos em 3 ml de metanol, de modo a atingir concentrações de 0,2 a 9,0 µg/ml. À estas soluções foram acrescentados 375 µl de solução de DPPH (1 mmol l⁻¹), com posterior agitação. Para definição da faixa de trabalho, compararam-se as amostras com o controle negativo. A solução branco foi preparada com uma solução metanólica de BHT (2 mg em 4 ml de metanol) adicionada de 500 µl de solução de DPPH (1 mmol l⁻¹) e como controle negativo, foi preparado uma solução contendo 3 ml de metanol e 375 µl de solução de DPPH (1 mmol l⁻¹).

As soluções resultantes (amostras, solução branco e controle negativo) foram agitadas em vortex por 15 s e deixadas em repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 min. Posteriormente as absorvâncias foram medidas em triplicata a 517 nm em espectrofotômetro e foi calculado o IC₅₀, correspondente a concentração que possui 50% da atividade antioxidante.

A atividade de sequestro de radicais (%ASR) foi calculada como porcentagem de descoramento do DPPH, usando a seguinte equação:

$$\%ASR = \frac{Abs_{CN} - Abs_A}{Abs_{CN}} \times 100$$

Onde:

Abs CN = Absorbância do controle negativo

Abs A = Absorbância da amostra

Os resultados foram submetidos à análise estatística através do programa Graph Pad Prism versão 5.0. Os dados foram apresentados como média±desvio padrão [coeficiente de variação (%)] utilizando-se análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Tukey, sendo considerado P<0,05 como critério de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CROMATOGRAFIA EM COLUNA (CC) DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

Com intuito de fracionamento da fração acetato de etila de *S. adstringens*, realizou-se a cromatografia em coluna (h: 750 mm Ø 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 como fase estacionária, utilizando-se 20 g da FAE. Através do monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) tabela 1, obtiveram-se 21 subfrações que foram reunidas por semelhança cromatográfica de acordo com a Figura 7.

Tabela 1 – Subfrações obtidas por CC em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila.

Fração	Eluente (v/v)	Quantidade (g)	(%)
F1	Etanol/Água (1:1)	0,3125	1,56
F2	Etanol/Água (1:1)	0,1765	0,88
F3	Etanol/Água (1:1)	0,0094	0,47
F3	Etanol/Água (1:1)	0,1705	0,85
F5	Etanol/Água (1:1)	2,6930	13,47
F6	Etanol/Água (1:1)	2,4386	12,19
F7	Etanol/Água (1:1)	1,0821	5,41
F8	Etanol/Água (1:1)	1,2603	6,30
F9	Etanol/Água (1:1)	0,4720	2,36
F10	Etanol/Água (1:1)	0,4226	2,11
F11	Etanol/Água (1:1)	2,1470	10,74
F12	Etanol/Água (1:1)	0,5183	2,59
F13	Etanol/Água (1:1)	0,5070	2,54
F14	Etanol/Água (1:1)	0,1506	0,75
F15	Etanol/Água (1:1)	0,2374	1,19
F16	Etanol/Água (1:1)	0,2020	1,01
F17	Etanol/Água (1:1)	0,1419	0,71
F18	Etanol/Água (1:1)	0,0783	0,39
F19	Etanol/Água (1:1)	0,1266	0,63
F20	Etanol (100)	0,2180	1,09
F21	Acetona/Água (7:3)	2,8104	14,05

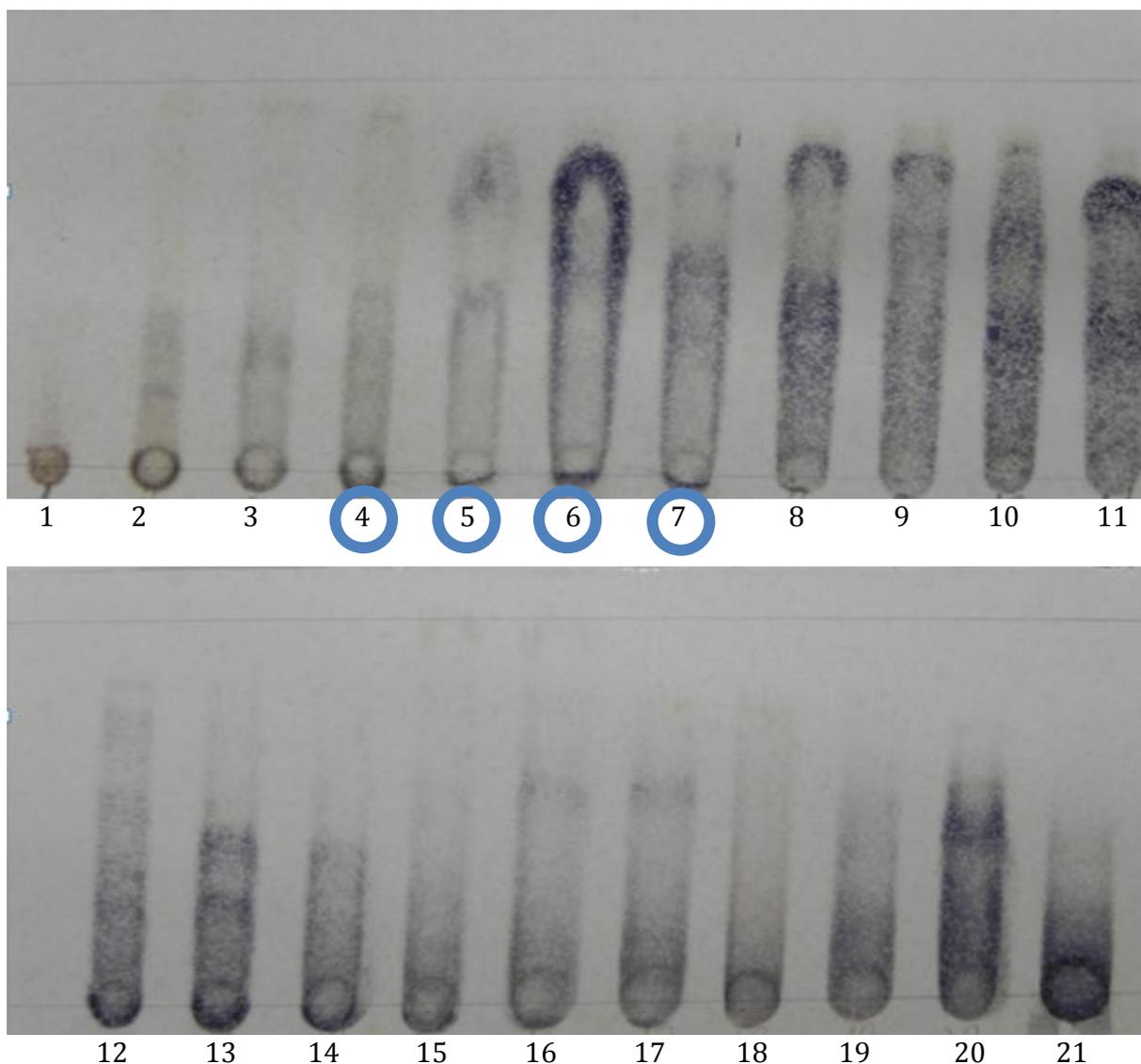
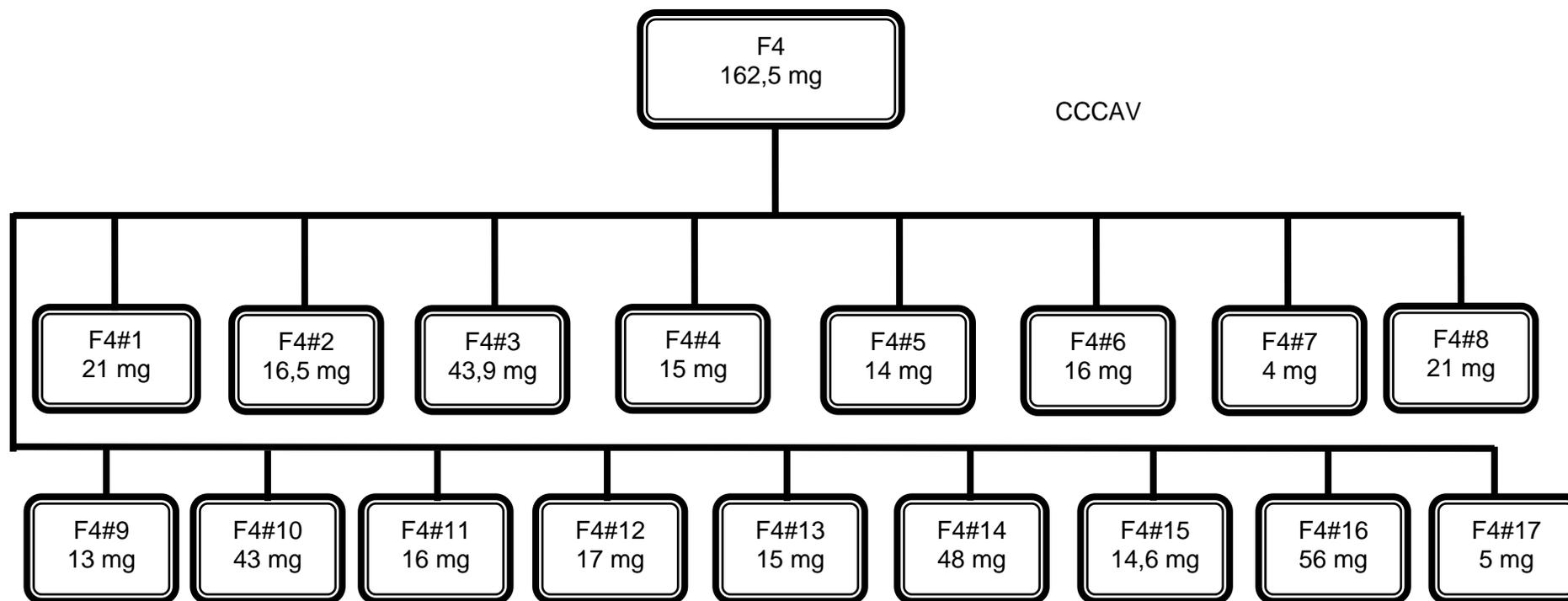


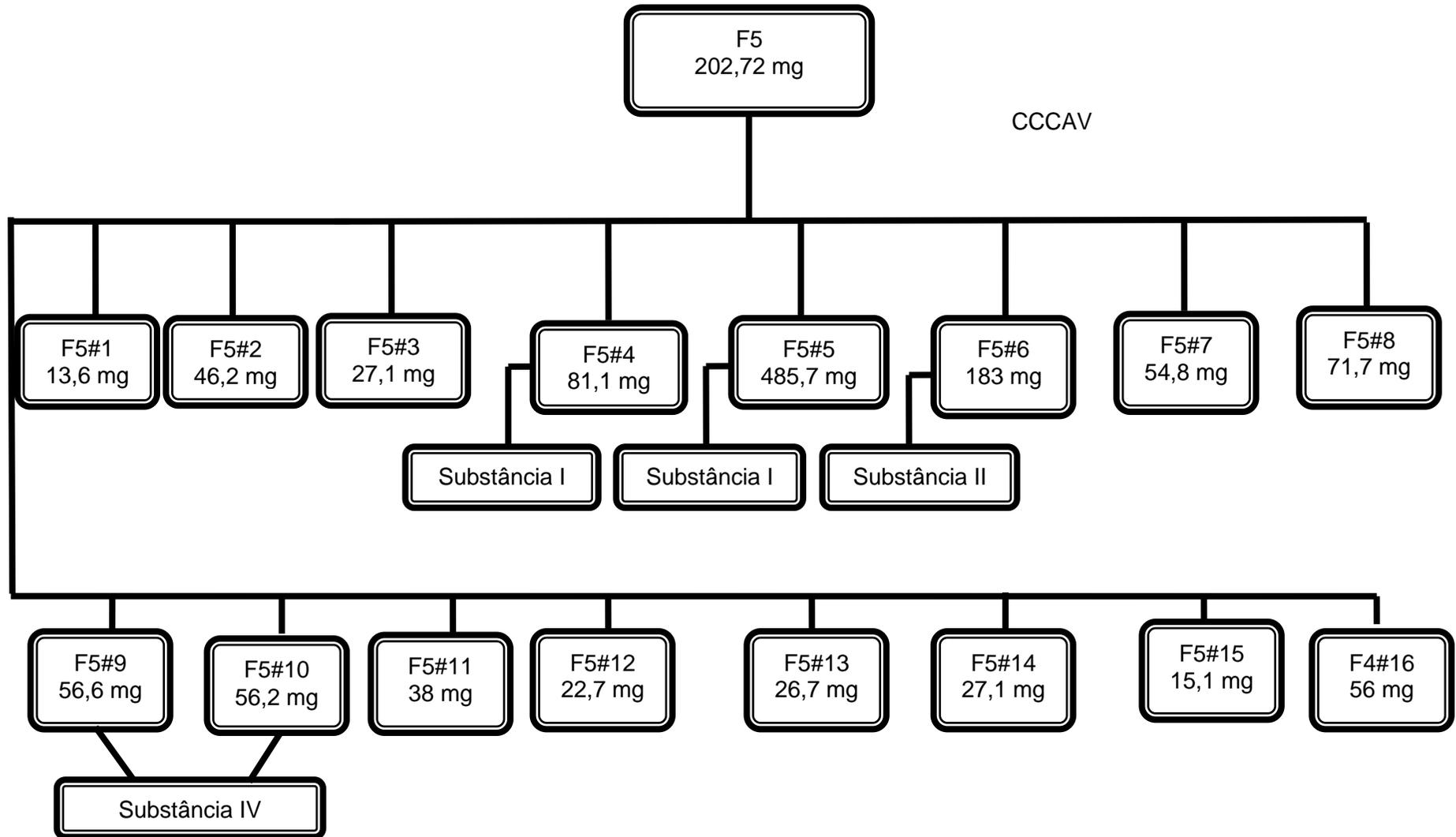
Figura 7 – Cromatografia em camada delgada das 21 subfrações obtidas da FAE por cromatografia em coluna.

No fracionamento realizado em SEPHADEX® LH-20, espera-se que as substâncias com maiores pesos moleculares apareçam nas frações iniciais. No entanto, o observado para taninos é a predominância de substâncias de peso molecular menor nas primeiras frações. Provavelmente o fato esteja relacionado com a interação entre os monômeros de taninos e o sistema eluente, ocorrendo a eluição sequencial dos monômeros >dímeros>trímeros>tetrâmeros>oligômeros>polímeros. A configuração dos dímeros influencia o fracionamento, sendo observado que as ligações $4\beta\rightarrow 8$ e $4\beta\rightarrow 6$ interagem antes com o sistema eluente (etanol) que as ligações $4\alpha\rightarrow 8$ e $4\alpha\rightarrow 6$ (THOMPSON et al., 1972).

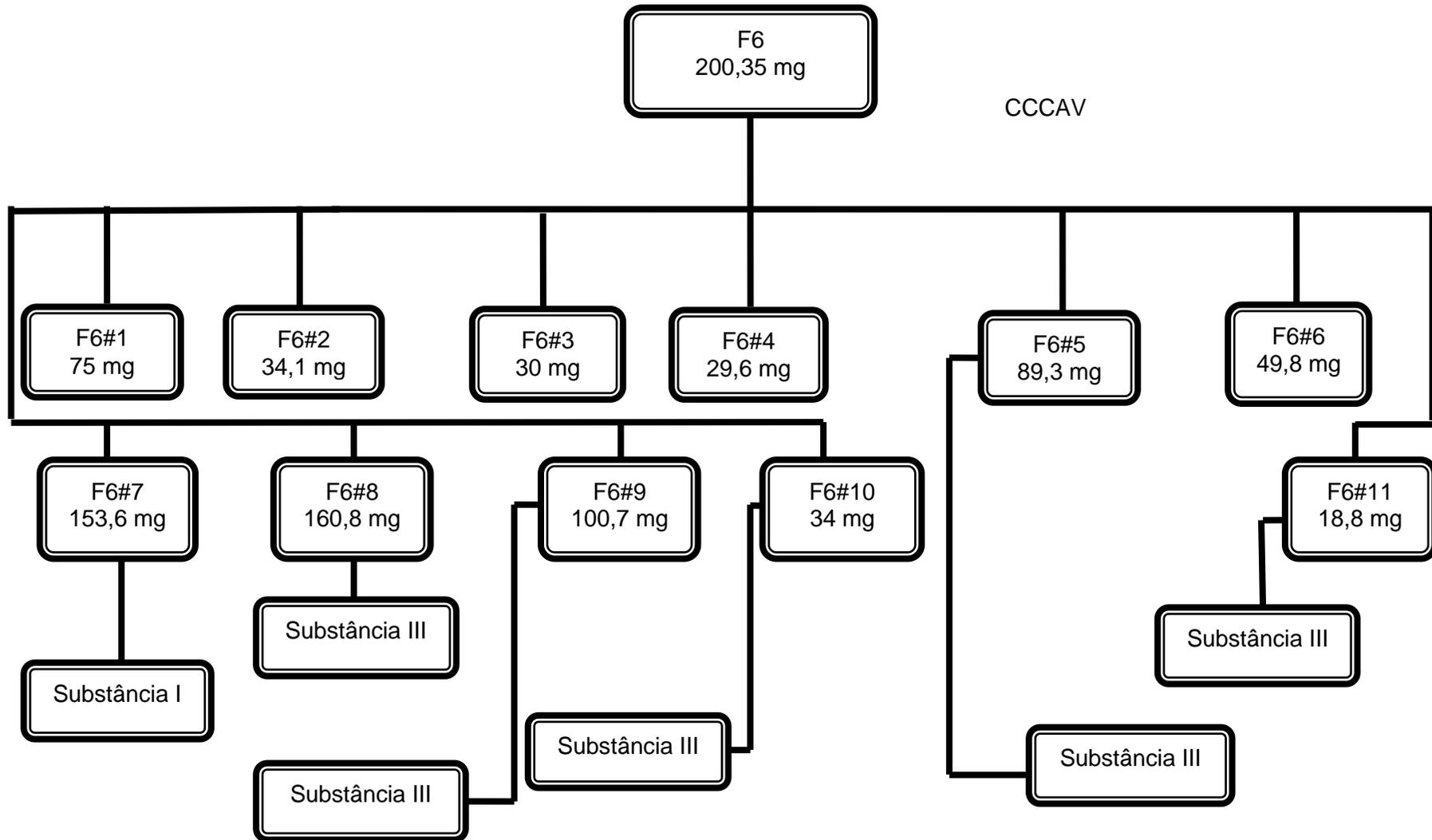
As subfrações F4, F5, F6 e F7 (Figura 7) foram cromatografadas em CCCAV para separação das substâncias de acordo com os fluxogramas 1, 2 e 3. A cromatografia de contra-corrente (CCCAV) foi fundamental na separação das substâncias. A técnica possui algumas vantagens como a recuperação total da amostra introduzida, não há adsorção irreversível, riscos mínimos de degradação da amostra, baixo consumo de solventes e quantidades mínimas de uma determinada substância pode ser separada de um extrato. Conseqüentemente, ela torna-se de grande uso no isolamento de substâncias em produtos naturais. Envolve basicamente a partição de um soluto em dois solventes imiscíveis, dependendo do coeficiente de partição do soluto para cada solvente. A CCCAV consiste de um tubo (\varnothing 2,5 mm) com capacidade para 200 ml enrolado em uma coluna e colocada sobre um eixo giratório. A coluna sofre uma ação centrífuga ocasionada pelos processos de rotação sobre o eixo e de translação do equipamento, a 800 rpm. Inicialmente, a coluna é preenchida com a fase estacionária (fase inferior) através de uma bomba. Em seguida, a fase móvel (fase superior) é bombeada, com fluxo determinado, com o equipamento ligado a 800 rpm até estabilização do sistema. No entanto, o mecanismo de distribuição dos solventes no tubo ainda não é conhecido (MARSTON; HOSTETTMANN, 1991). Esse sistema é útil em separação de substâncias polares e com similaridade química. Portanto, a CCCAV foi fundamental para o isolamento das substâncias, principalmente pelo fato de que os flavan-3-óis possuem várias características estruturais semelhantes.



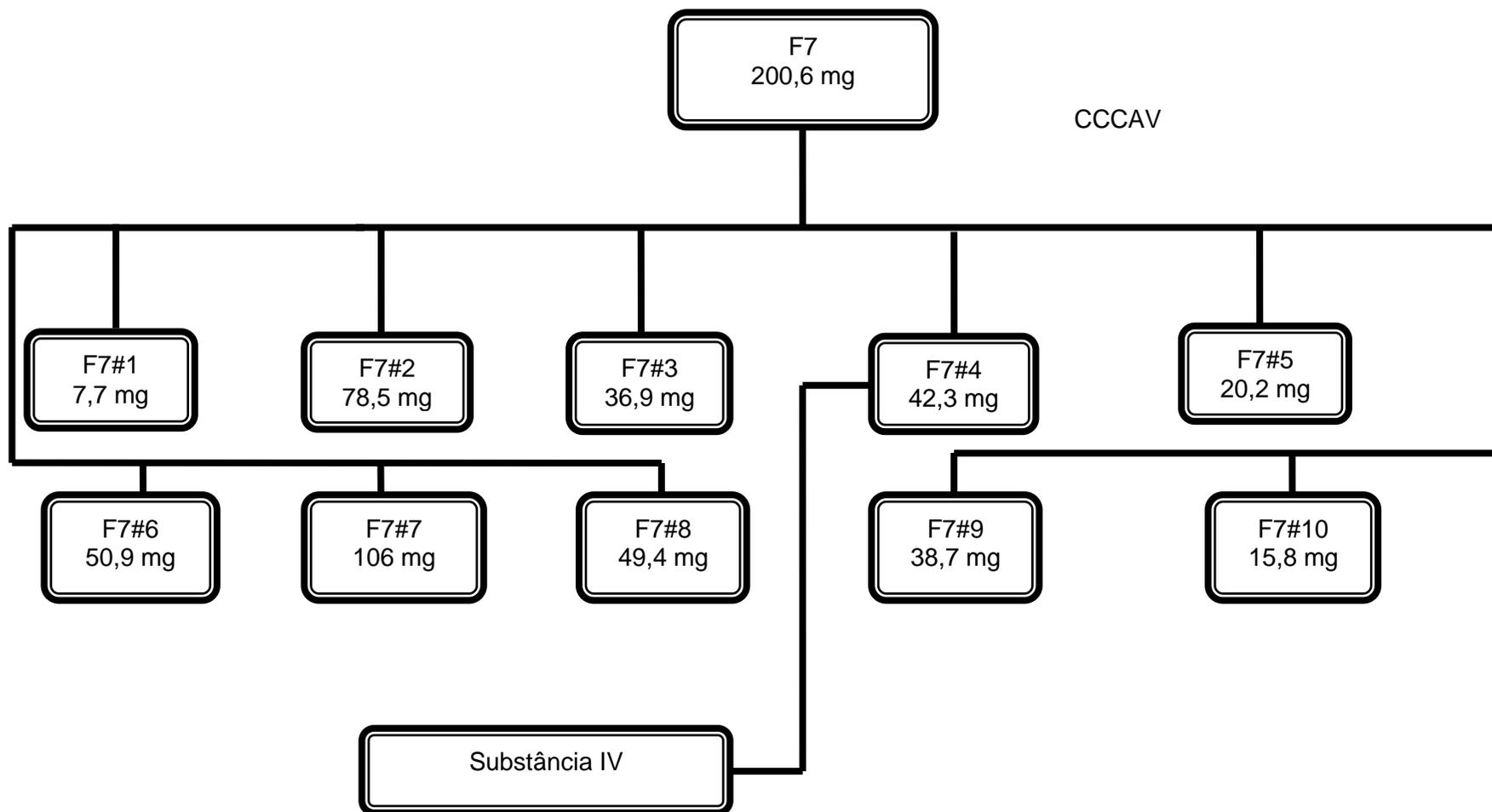
Fluxograma 1 - Fracionamento da subfração F4, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.



Fluxograma 2 - Fracionamento da subfração F5, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.



Fluxograma 3 - Fracionamento da subfração F6, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.



Fluxograma 4 - Fracionamento da subfração F7, obtida da coluna em Sephadex LH-20 da fração acetato de etila, por CCCAV.

5.2 MONÔMEROS

5.2.1 Substância I – 4'-O-metil-galocatequina

A substância I (4'-O-metil-galocatequina) apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl_3 , apresentando $R_f=0,75$ mostrando características de fenóis. No espectro de massas (Figura 8) pode-se verificar o pseudo-íon do pico molecular $[\text{M-H}]^-$ para a substância livre com m/z 319,2, caracterizando um monômero de taninos condensados.

Os dados referentes aos deslocamentos de RMN ^1H da substância I encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Dados de RMN ^1H da substância I na forma livre (300 MHz; CD_3OD relativo ao TMS).

δ (ppm)	δ - Literatura (ppm) [*]	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,50	2,65	H-4ax	dd	$^2J_{\text{Hax-4} - \text{Heq-4}} = 16,2$ $^3J_{\text{Hax-4} - \text{H-3}} = 7,8$
2,78	2,88	H-4eq	dd	$^2J_{\text{Heq-4} - \text{Hax-4}} = 16,2$ $^3J_{\text{Heq-4} - \text{H-3}} = 5,4$
3,78	3,80	O-Metil	s	
3,96	5,08	H-2	d	$^3J_{\text{H-2} - \text{H-3}} = 7,2$
4,55	5,20	H-3	ddd	$^3J_{\text{H-3} - \text{H-2}} = 7,2$ $^3J_{\text{H-3} - \text{Hax-4}} = 7,5$ $^3J_{\text{H-3} - \text{Heq-4}} = 5,4$
5,86	6,59	H-6	d	$^4J_{\text{H-6} - \text{H-8}} = 2,1$
5,92	6,66	H-8	d	$^4J_{\text{H-8} - \text{H-6}} = 2,1$
6,40	6,97	H-2'/H-6'	d	$^4J_{\text{H-2}' - \text{H-6}'} = 0,6$

s= simpleto; d= duplete; m= multiplete; ddd=duplo duplo duplete

* Mello et al., 1996a

O espectro de RMN ^1H (Figura 9) apresentou similaridades com a galocatequina (substância II), exceto para um simpleto com 3 hidrogênios a δ 3,78 ppm indicando um grupamento metoxila. Os hidrogênios heterocíclicos exibiram um sistema ABMX característico para o *spin* padrão de 2,3-*trans* flavan-3-ol (MELLO et al., 1996a).

A posição do grupamento metoxila no C-4' foi determinada com base nos resultados de experimentos HSQC e HMBC (Figuras 10 e 11), os quais mostraram correlações entre o C-4' e os hidrogênios H-2'/6' e os hidrogênios da metoxila (δ 3,78 ppm). Assim, essa substância foi identificada como sendo 4'-O-metil-galocatequina, a qual foi isolada de *Panda oleosa* Pierre (Pandaceae) (GARCIA et al., 1993) e posteriormente de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) (MELLO et al., 1996a; TOLEDO, 2002).

Os dados referentes ao carbono da substância I em ppm são: C-2'/C-6': 107,5, C-8: 96, C-6: 96, C-2: 81,5, C-3: 68, CH_3 : 59,8, C-4: 26,5.

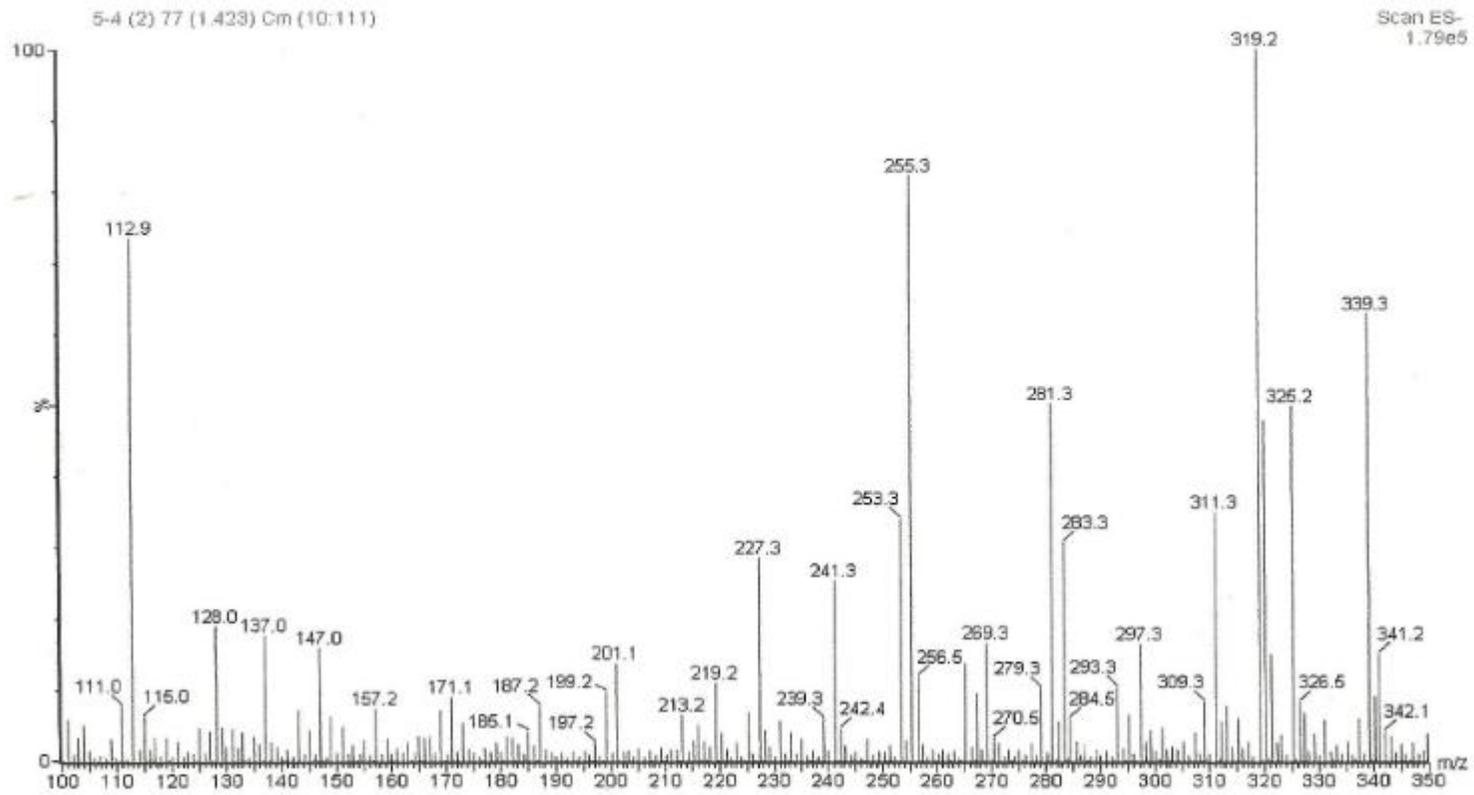


Figura 8 – Espectro de massas da substância 4'-O-metil-galocatequina no modo negativo ESI m/z 319,2.

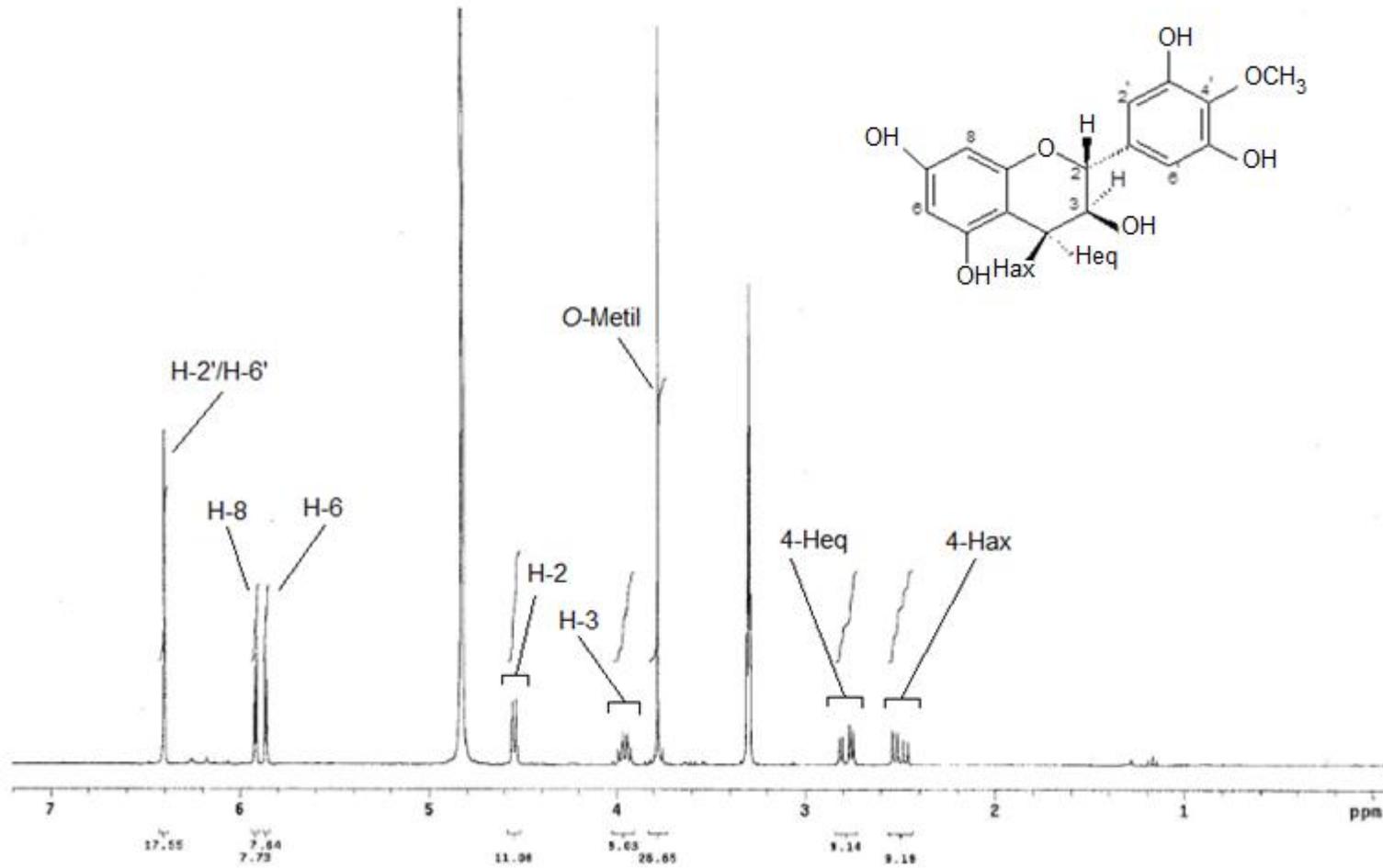


Figura 9 – Espectro de RMN ¹H da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD₃OD, relativo para TMS; 300 MHz).

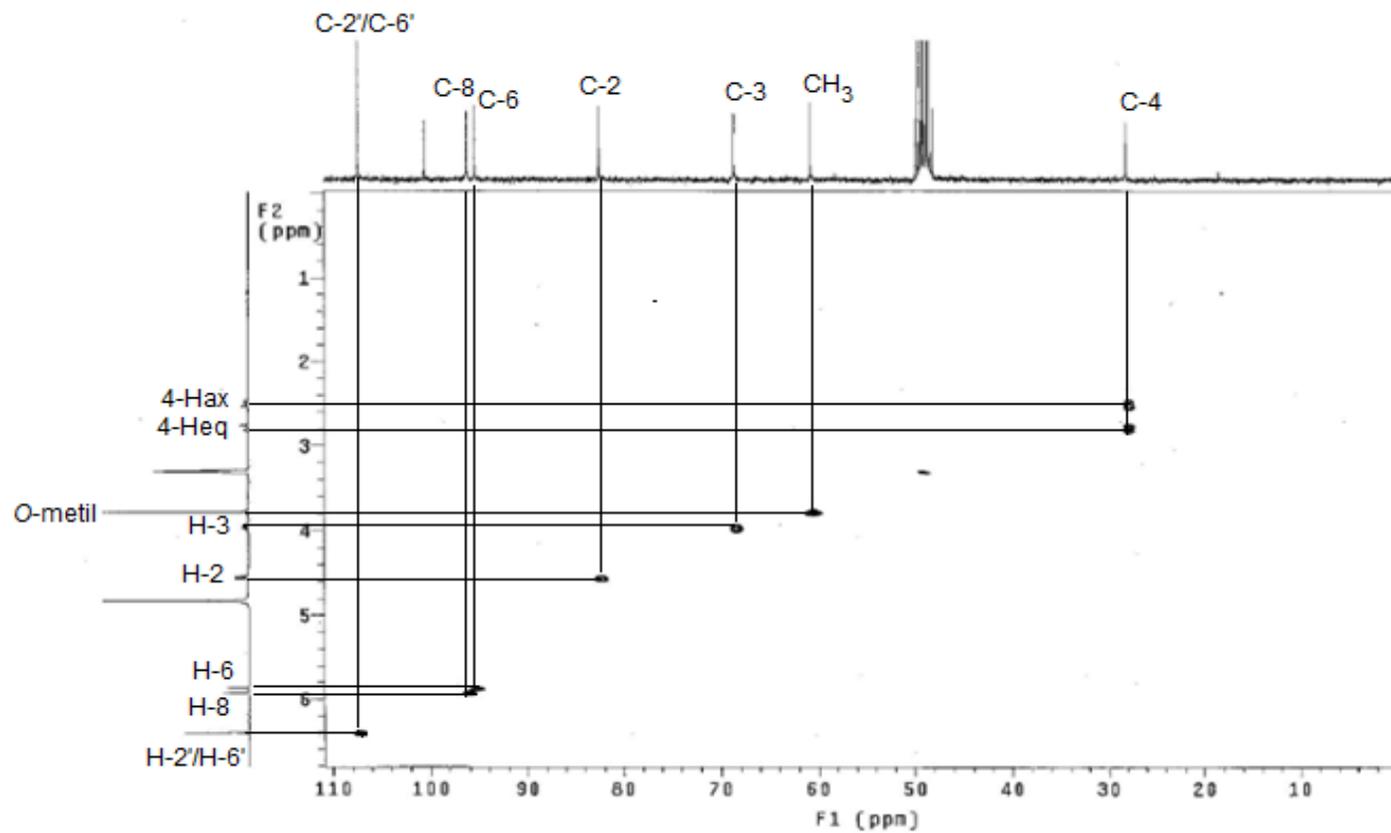


Figura 10 – Espectro de HSQC da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD₃OD, relativo para TMS; 300 MHz).

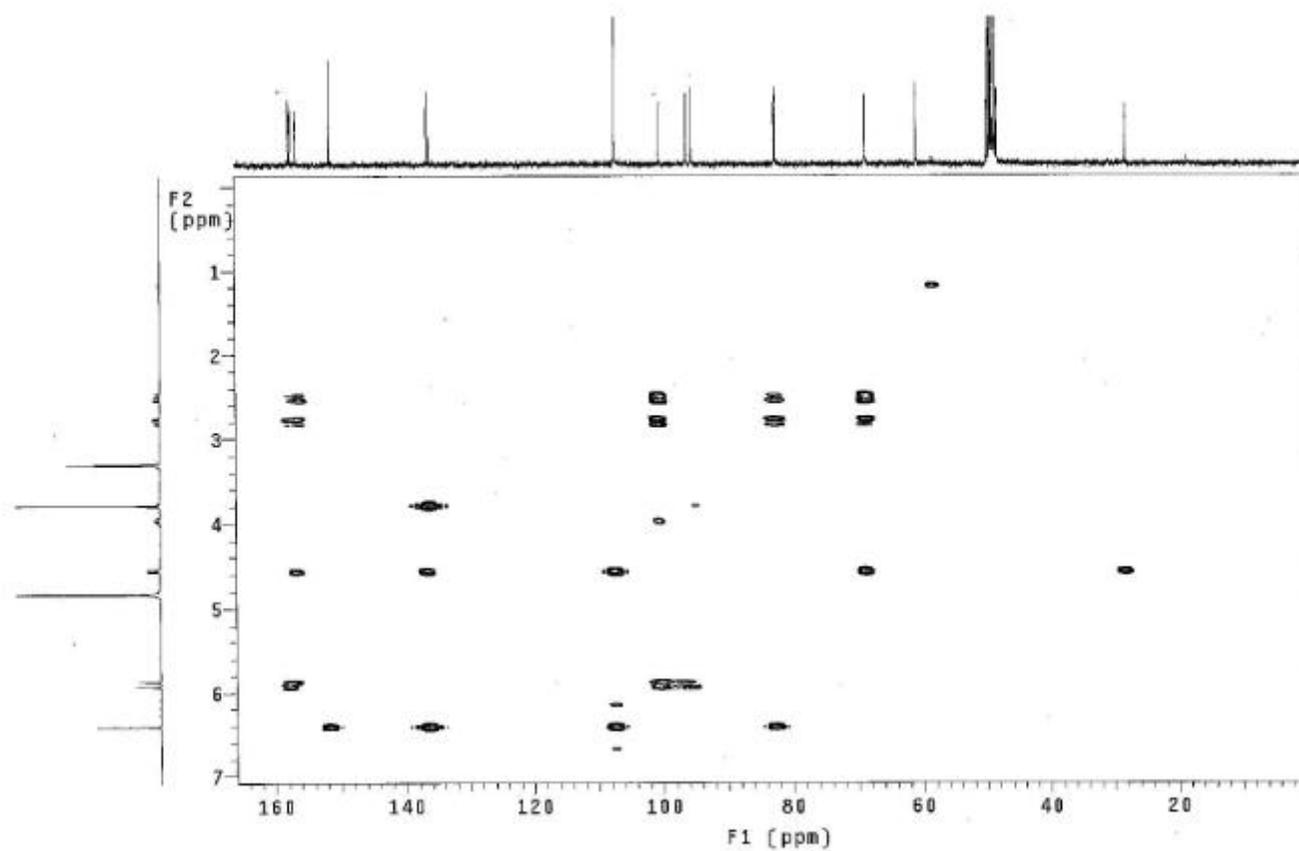


Figura 11 – Espectro de HMBC da substância 4'-O-metil-galocatequina (CD₃OD, relativo para TMS; 300 MHz).

5.2.2 Substância II – Galocatequina

A substância II (galocatequina) apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl_3 , apresentando $R_f=0,67$ e também mostrando características de fenóis. No espectro de massas (Figura 12) pode-se verificar o pseudo-íon do pico molecular $[\text{M-H}]^-$ para a substância livre em m/z 305,1, caracterizando um monômero de taninos condensados.

Na figura 13, pode-se notar um espectro característico de monômero de flavan-3-ol. É possível observar os hidrogênios alifáticos H-4 (axial e equatorial) como duplo dupletos em δ 2,51 e δ 2,82 ppm, respectivamente. A constante de acoplamento $J_{\text{H-2,H-3}}$ de 7,2 Hz caracteriza uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans* de acordo com WEINGES et al. (1969). Pode-se comprovar a tri-hidroilação do anel B pela presença de um simpleto referente aos deslocamentos de H-2' e H-6' (δ 6,38 ppm), pelo fato de serem quimicamente equivalentes. Assim, essa substância foi identificada como sendo galocatequina.

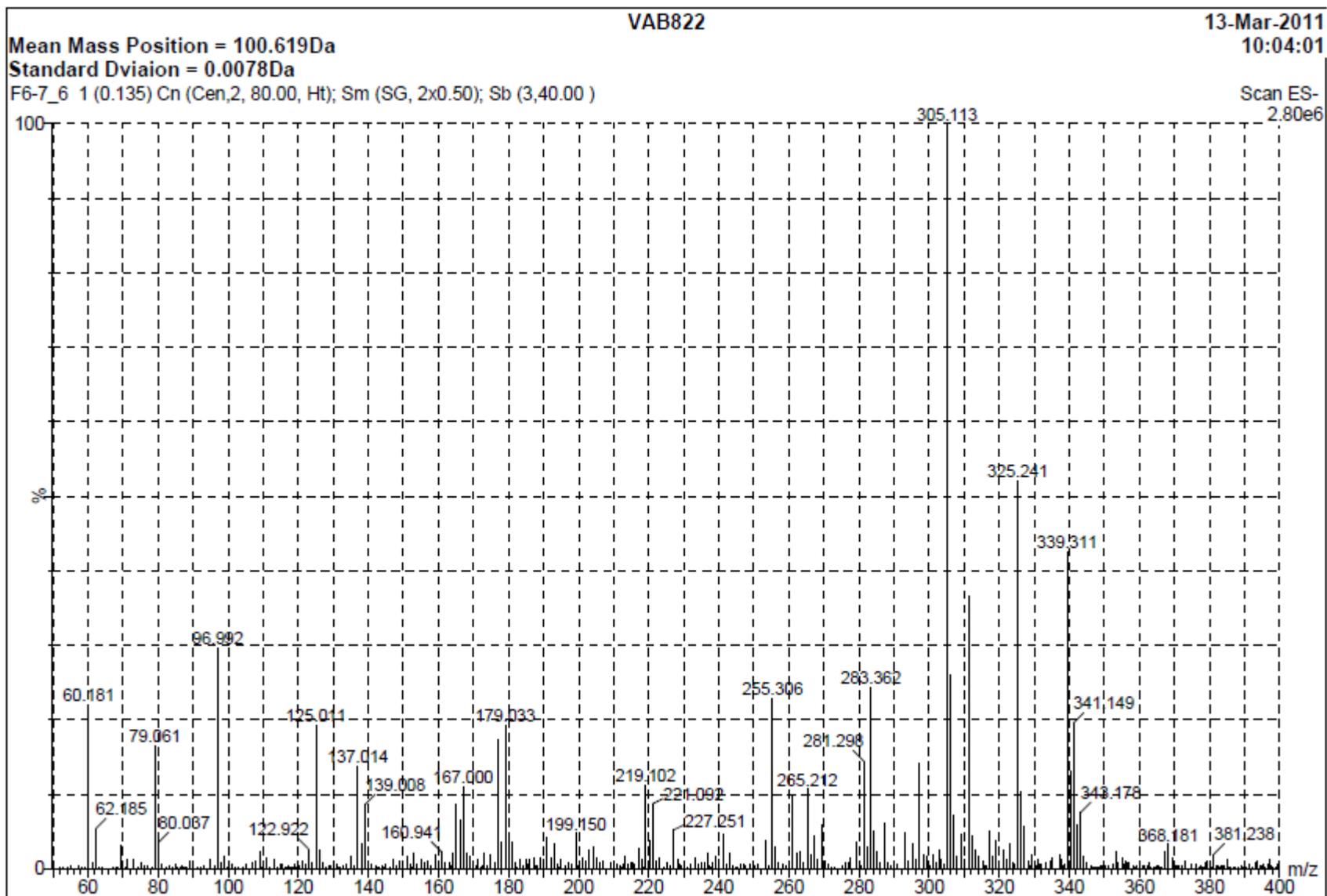
Os dados referentes aos deslocamentos de RMN ^1H da substância II encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Dados de RMN ^1H da substância II na forma livre (300 MHz; CD_3OD relativo ao TMS).

δ (ppm)	δ - Literatura (ppm)*	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,51	2,92	H-4ax	<i>dd</i>	$^2 J_{\text{Hax-4} - \text{Heq-4}} = 16,2$ $^3 J_{\text{Hax-4} - \text{H-3}} = 7,8$
2,82	2,66	H-4eq	<i>dd</i>	$^2 J_{\text{Heq-4} - \text{Hax-4}} = 16,2$ $^3 J_{\text{Heq-4} - \text{H-3}} = 5,4$ $^3 J_{\text{H-3} - \text{H-2}} = 7,2$
3,95	5,19	H-3	<i>ddd</i>	$^3 J_{\text{H-3} - \text{Hax-4}} = 7,8$ $^3 J_{\text{H-3} - \text{Heq-4}} = 5,4$
4,51	5,12	H-2	<i>d</i>	$^4 J_{\text{H-2} - \text{H3}} = 7,2$
5,85	6,60	H-6	<i>d</i>	$^4 J_{\text{H-6} - \text{H-8}} = 2,4$
5,91	6,66	H-8	<i>d</i>	$^4 J_{\text{H-8} - \text{H-6}} = 2,4$
6,38	7,12	H-2'/H-6'	<i>s</i>	

s= simpleto; *d*= dupletto; *m*= multipletto; *ddd*=duplo duplo dupletto

* Mello et al., 1996a

Figura 12 – Espectro de massas da substância galocatequina no modo negativo ESI m/z 305,1.

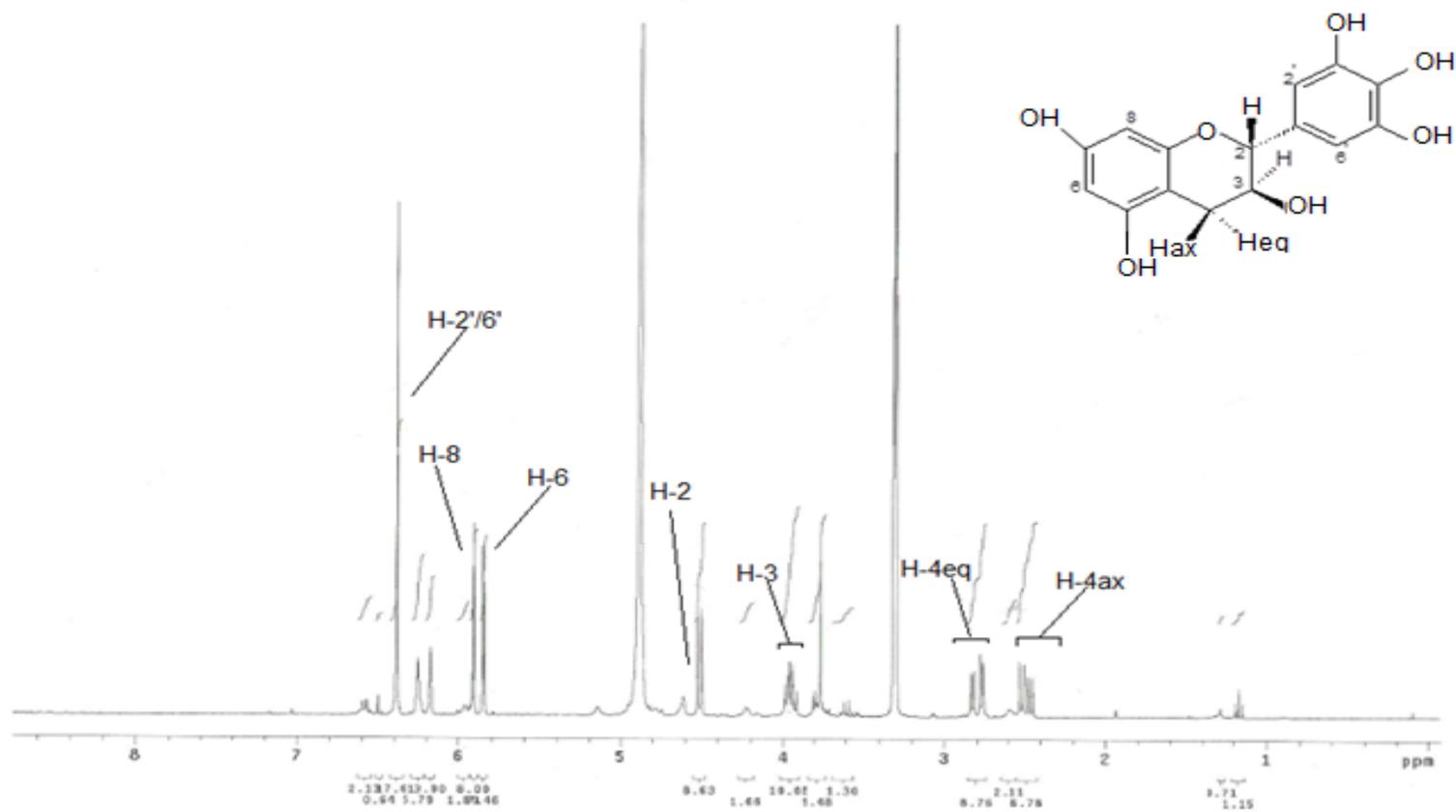


Figura 13 – Espectro de RMN ¹H da substância galocatequina (CD₃OD, relativo para TMS; 300 MHz).

5.2.3 Substância III – Epigalocatequina

A substância III (epigalocatequina) apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl_3 , com $R_f=0,66$ e mostrou características de fenóis. No espectro de massas (Figura 14) pode-se verificar o pseudo-íon do pico molecular $[\text{M-H}]^-$ para a substância livre com m/z 305,2, caracterizando um monômero de taninos condensados.

A constante de acoplamento entre H-2 e H-3 é pequena, não sendo possível determinar ($J \leq 1,0$ Hz). O pico referente a H-2 apresenta-se como um pseudo-simpleto e H-3 como um multipeto resultante do acoplamento com H-2, H-3 e H-4 (equatorial e axial). Segundo, Weinges et al. (1969), a pequena constante de acoplamento entre H-2 e H-3, caracteriza a substância com uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. Os demais deslocamentos se assemelham àqueles obtidos para a substância II. No COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (Figura 16) verificou-se o acoplamento entre H-3 e H-4 (equatorial e axial), H-3 e H-2 e H-2 e H-2'/H-6'.

Os dados referentes aos deslocamentos de RMN ^1H da substância III encontram-se na tabela 4 e figura 15.

Tabela 4 – Dados de RMN ^1H da substância III na forma livre (300 MHz; CD_3OD relativo ao TMS).

δ (ppm)	δ - Literatura (ppm)*	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,69	2,82	H-4ax	<i>dd</i>	$^3J_{\text{Heq-4} - \text{H-3}} = 3$
2,87	3,04	H-4eq	<i>dd</i>	$^2J_{\text{Heq-4} - \text{Hax-4}} = 16,8$
4,16	5,35-5,42	H-3	<i>m</i>	$^2J_{\text{Heq-4} - \text{Hax-4}} = 16,2$
4,74	5,08	H-2	<i>ps</i>	
5,89	6,57	H-6	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-6} - \text{H-8}} = 2,4$
5,92	6,67	H-8	<i>d</i>	$^4J_{\text{H-8} - \text{H-6}} = 2,4$
6,50	7,22	H-2'/H-6'	<i>s</i>	

s= simpleto; d= dupeto; m= multipeto; ddd=duplo duplo dupeto; ps= pseudosimpleto

* Mello et al., 1996a

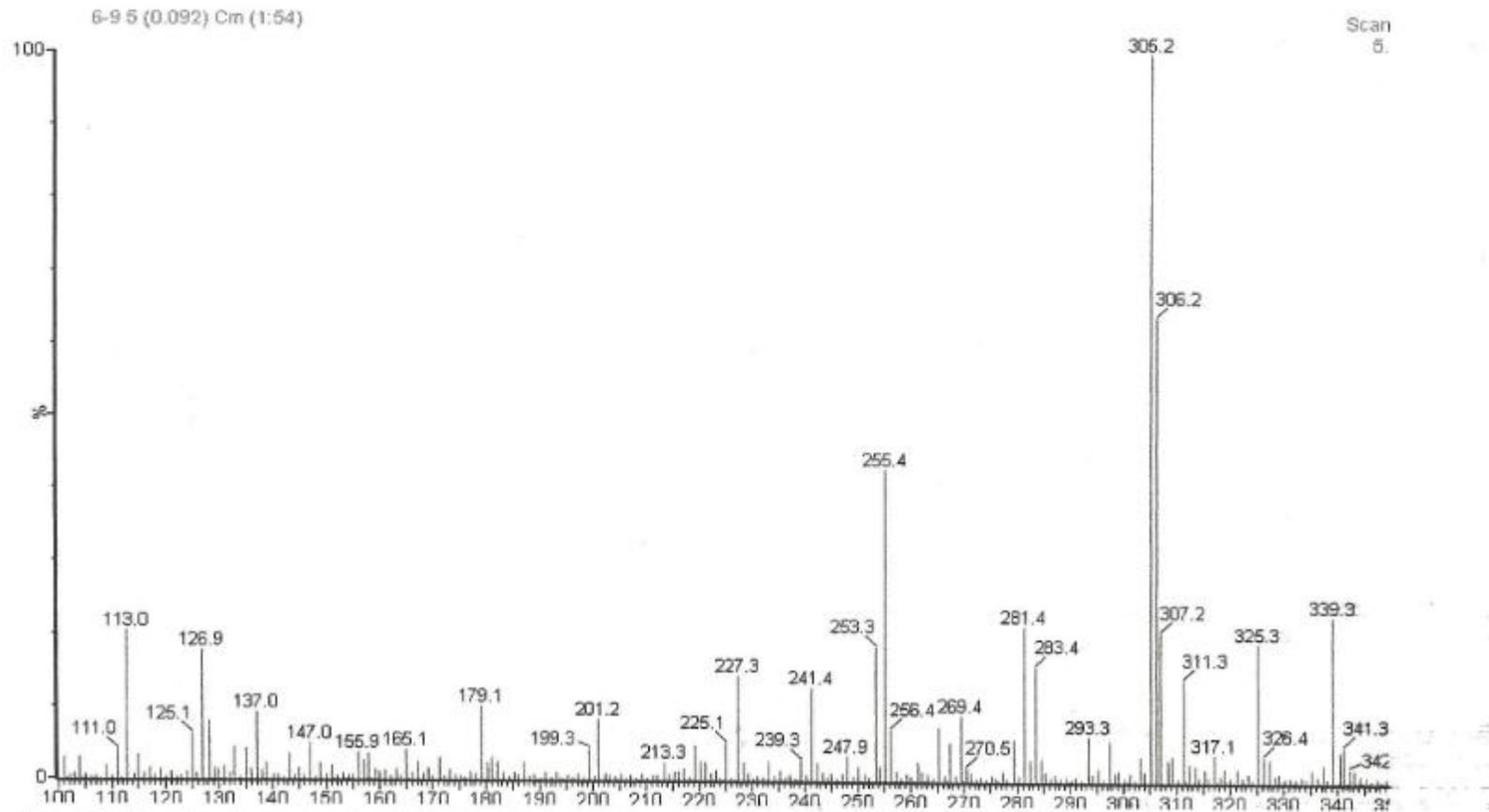


Figura 14– Espectro de massas da substância epigallocatequina no modo negativo ESI m/z 305,2.

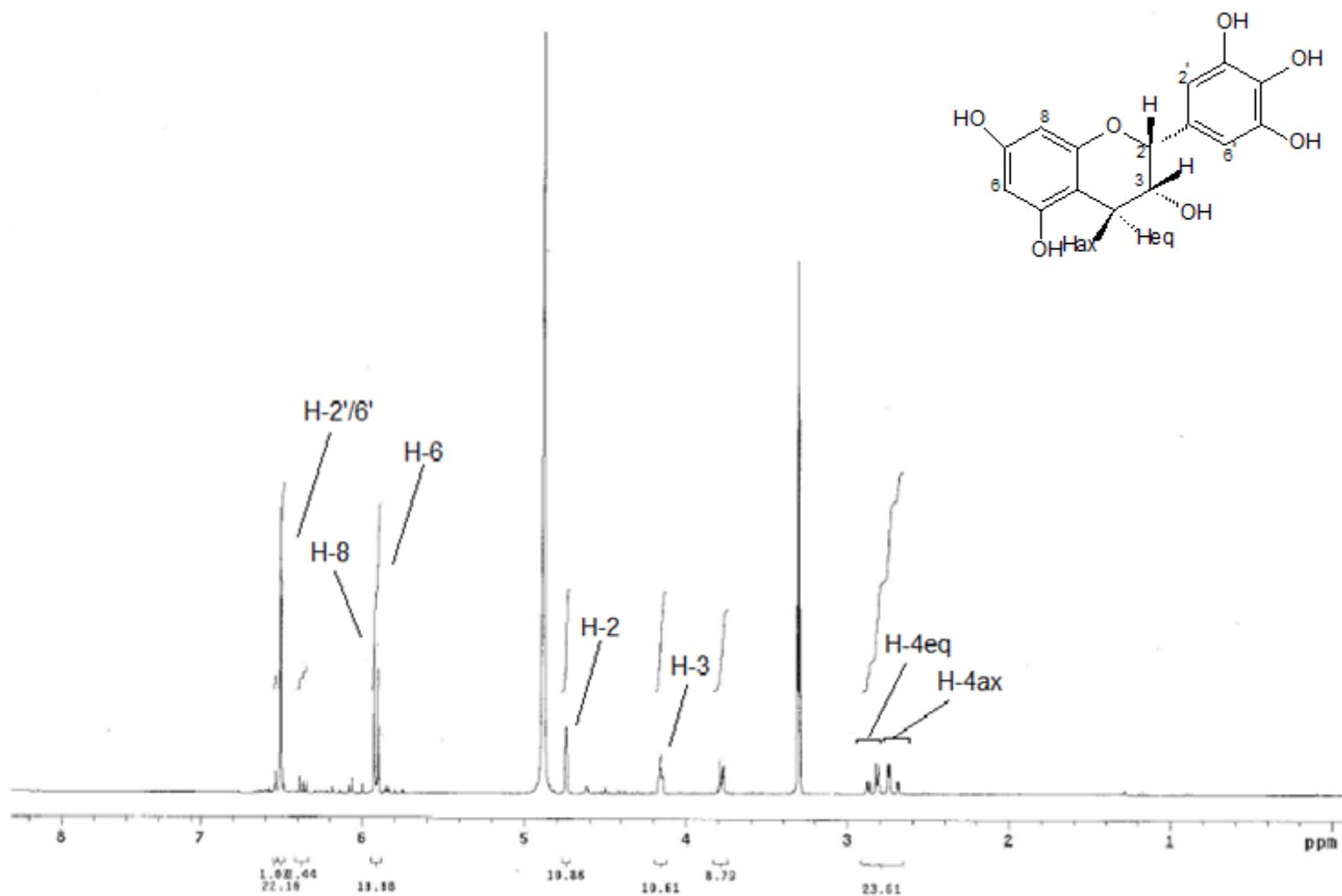


Figura 15 – Espectro de RMN ¹H da substância epigallocatequina (CD₃OD, relativo para TMS; 300 MHz).

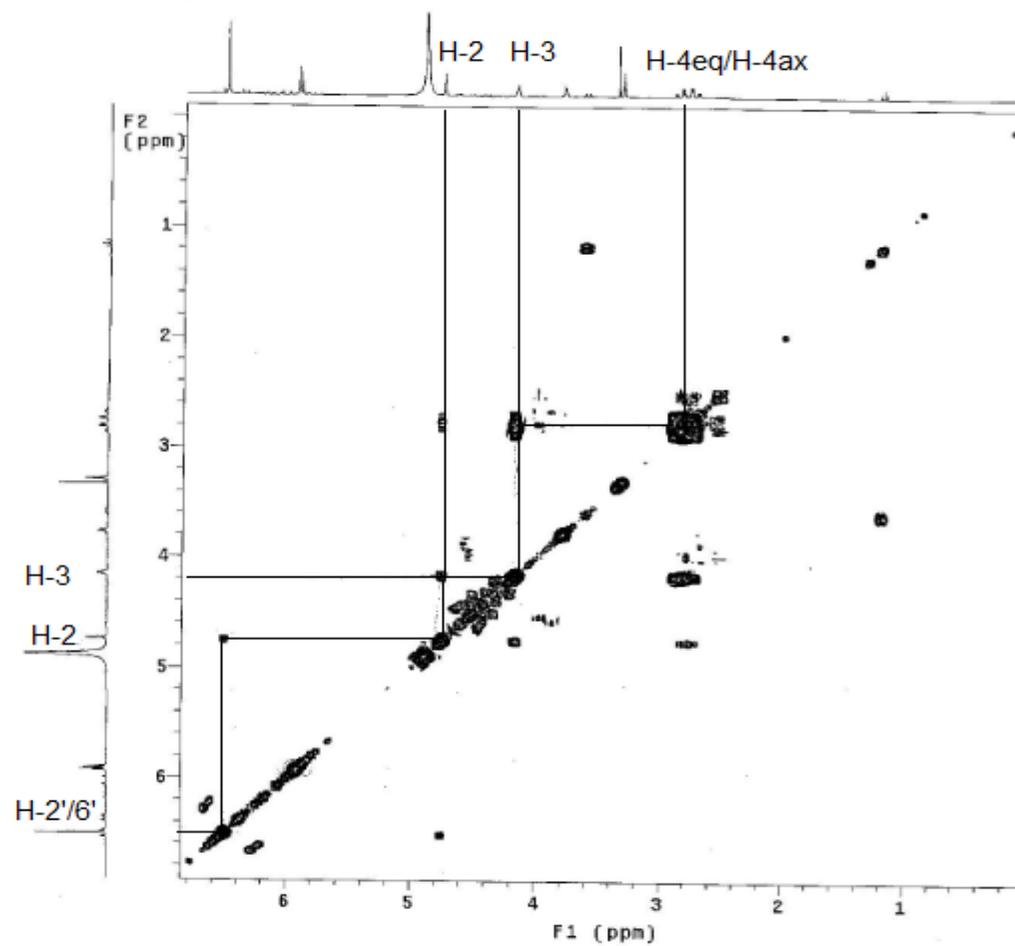


Figura 16 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância epigallocatequina (CD_3OD , 300 MHz).

5.3 DÍMEROS

5.3.1 Substância IV – 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina

A substância IV (4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina) apresentou-se como uma mancha azul escura intensa em CCD após revelação com FeCl₃, com R_f=0,57. No espectro de massas (Figura 17) pode-se verificar o pseudo-íon do pico molecular [M-H]⁻ para a substância acetilada com *m/z* 1057, característico de substâncias diméricas acetiladas.

O espectro de RMN ¹H em acetona-*d*₆ (Figura 18) da substância acetilada forneceu dados representativos de um composto fenólico do tipo tanino condensado dimérico, apresentando dois simpletos correspondendo a 3 hidrogênios cada em δ 3,78 e 3,74 ppm indicando dois grupamentos metoxilas. Através do espectro de COSY ¹H/¹H (Figura 19) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios H-2/H-4(C) e H-3(C), e também entre H-2/H-3(F) e H-4 α /H-4 β (F). Os acoplamentos de longo alcance entre os sinais de hidrogênios H-2(C) e H-2(F) e os respectivos sinais de H-2'/6' permitem distinguir os sinais dos hidrogênios do tipo pirogalol dos anéis B (δ 6,84 ppm) e E (δ 6,66 ppm). As constantes de acoplamento dos hidrogênios do anel C (*J*_{2,3}=9,9 e *J*_{3,4}=9,3 Hz) indicam a configuração relativa do anel C como sendo do tipo 2,3-*trans*-3,4-*trans*. O pico largo sobreposto dos hidrogênios H-2(F) e H-3(F) em δ 4,93 ppm não permite distinguir com certeza a estereoquímica relativa das posições 2,3. Essa observação já foi relatada para galocatequina-(4 α →8)-catequina (HELSPER et al., 1993) e pode ser explicada pelas trocas conformacionais do anel F (BALAS; VERCAUTEREN, 1994). A configuração relativa 2,3-*trans*-3,4-*trans* do anel C da proantocianidina foi também confirmada pela posição com cerca de δ 4-5 ppm da ressonância do C-2 devido ao substituinte em C-4 em comparação com a análoga configuração 2,3-*cis* (FLETCHER et al., 1977). O dímero não poderia ter a ligação 4→6, pois assim, segundo Petereit et al. (1991)

após análise de vários espectros de dímeros de proantocianidinas, os picos de H-2' e H-6', apareceriam em δ > 7 ppm. Assim, após as análises e em comparação com dados da literatura, a substância IV foi identificada como sendo 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina.

Os dados referentes aos deslocamentos de RMN ¹H da substância IV encontram-se na tabela 5.

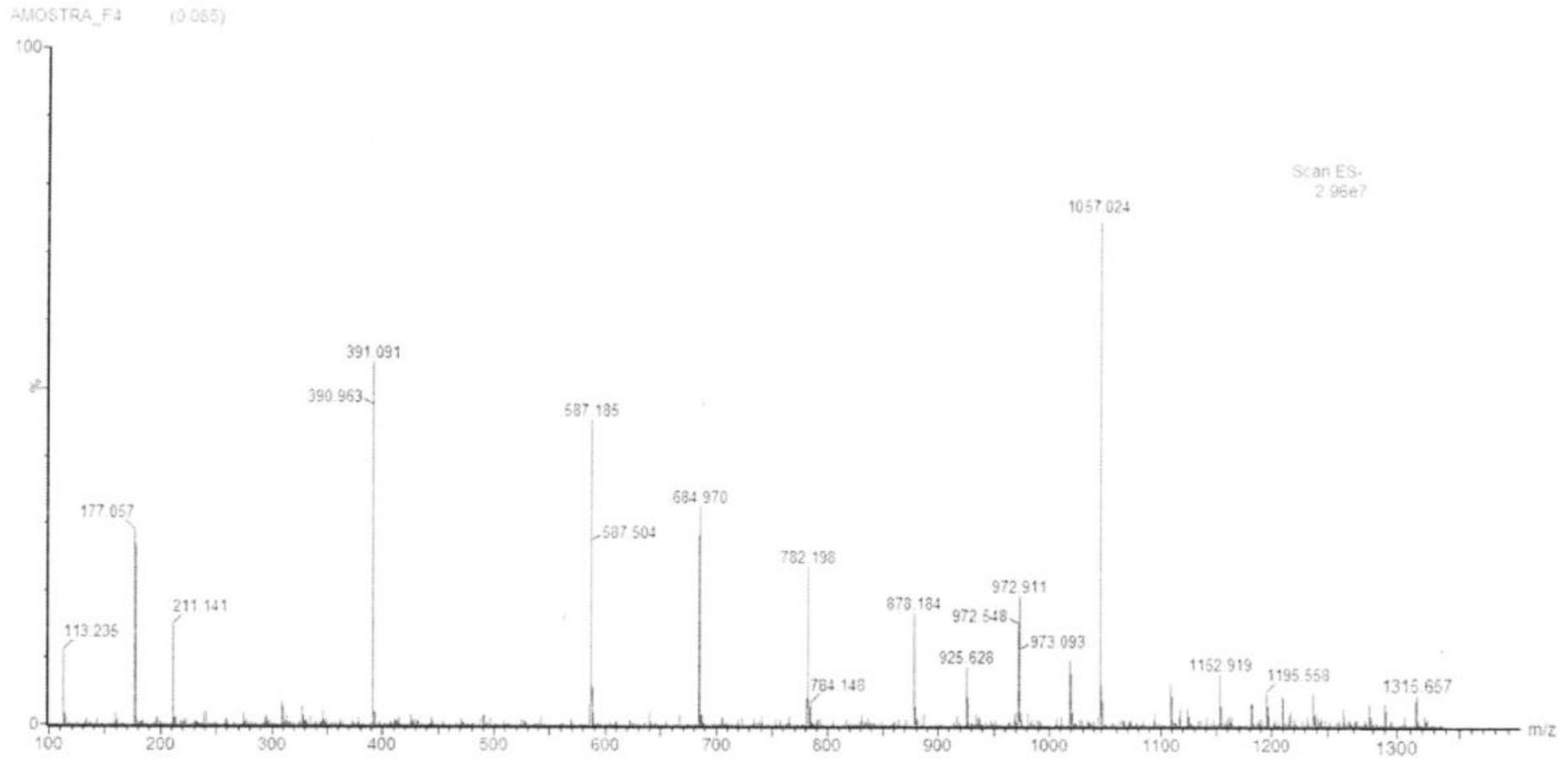


Figura 17– Espectro de massas da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina no modo negativo ESI m/z 1057.

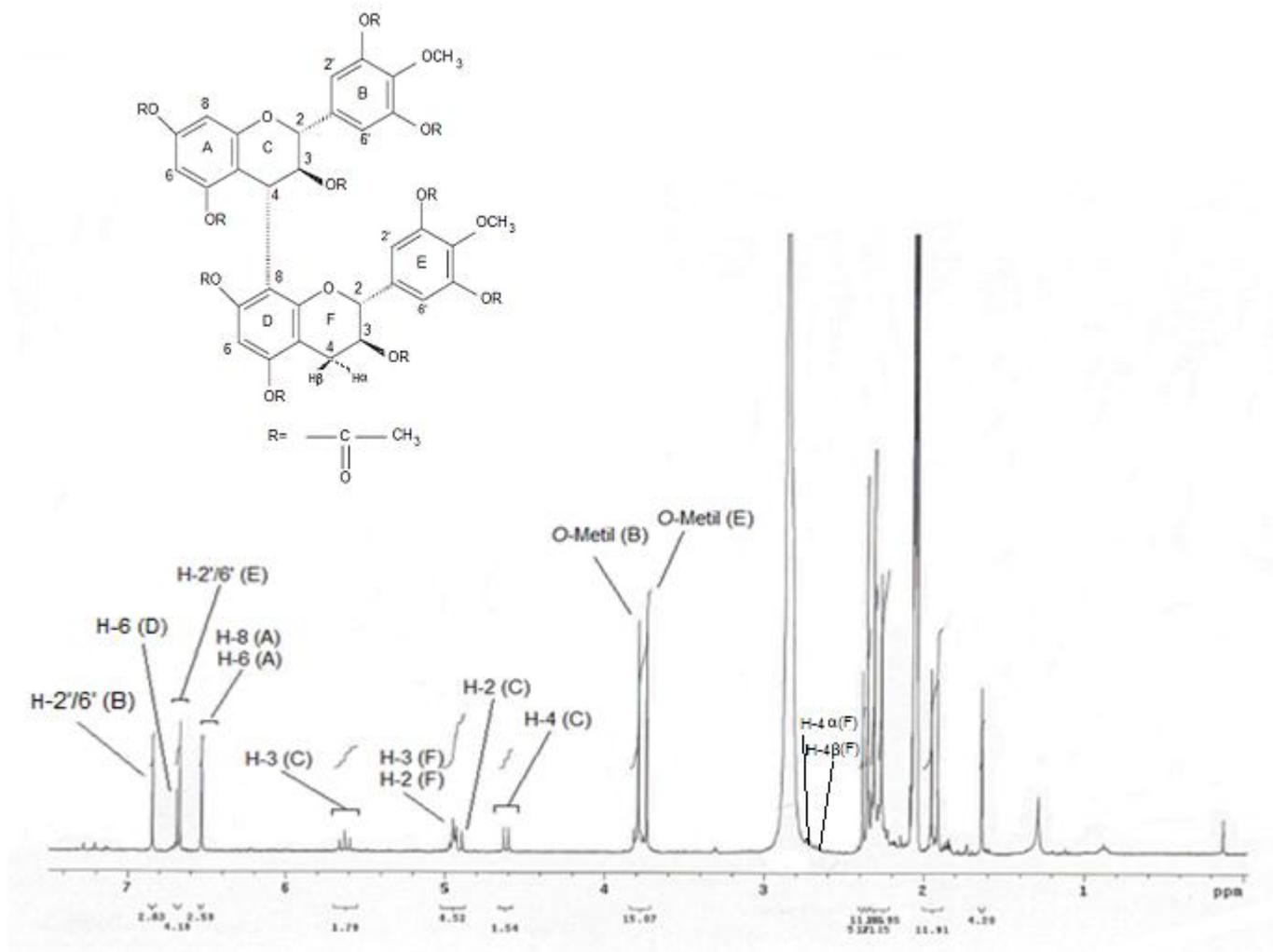


Figura 18 – Espectro de RMN ¹H da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (acetona-d₆, relativo para TMS; 300 MHz).

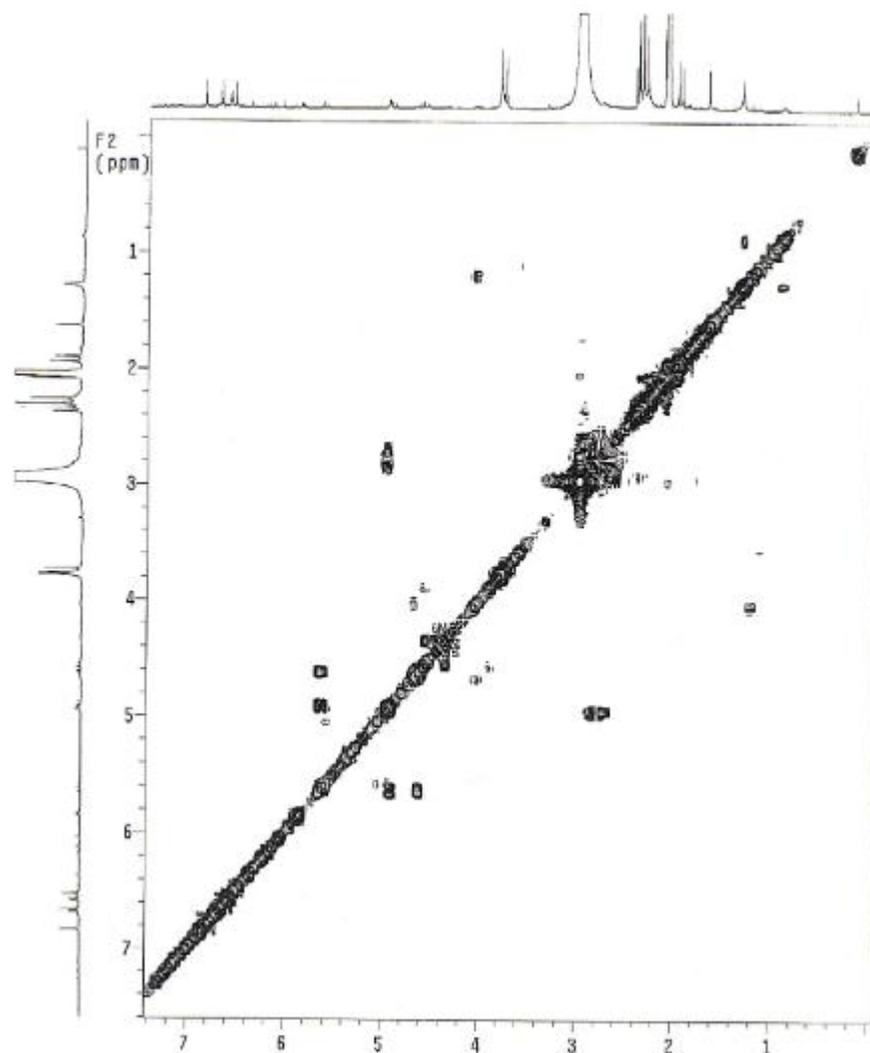


Figura 19 – Espectro de COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ da substância 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina (acetona- d_6 , 300 MHz).

Tabela 5 – Dados de RMN ^1H da substância IV na forma acetilada (300 MHz; acetona- d_6 relativo ao TMS).

δ (ppm)	δ - Literatura (ppm)*	Hidrogênio	Multiplicidade	J (Hz)
2,65	2,66	H-4 β (F)	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4}\beta(\text{F})-\text{H-4}\alpha(\text{F})} = 16,7$ $^3J_{\text{H-4}\beta(\text{F})-\text{H-3}(\text{F})} = 7,8$
2,83	2,84	H-4 α (F)	<i>dd</i>	$^2J_{\text{H-4}\alpha(\text{F})-\text{H-4}\beta(\text{F})} = 16,7$ $^3J_{\text{H-4}\alpha(\text{F})-\text{H-3}(\text{F})} = 5,4$
3,74	3,77	O-Metil	<i>s</i>	
3,78	3,79	O-Metil	<i>s</i>	
4,61	4,48	H-4 (C)	<i>d</i>	$^3J_{\text{H-4}(\text{C})-\text{H-3}(\text{C})} = 9,3$
4,90	4,73	H-2 (C)	<i>s</i>	
4,93	5,02	H-3 (F)/H-2(F)	<i>m</i>	
5,62	5,62	H-3 (C)	<i>pt</i>	$^3J_{\text{H-3}(\text{C})-\text{H-2}(\text{C})} = 9,9$
6,53	6,49/6,52	H-8 – H-6 (A)	<i>s</i>	$^3J_{\text{H-3}(\text{C})-\text{H-4}(\text{C})} = 9,3$
6,66	6,60	H-2'/H-6' (E)	<i>s</i>	
6,68	6,65	H-6 (D)	<i>s</i>	
6,84	6,81	H- 2'/H-6' (B)	<i>s</i>	

s= simpleto; *d*= duplete; *m*= multiplete; *dd*=duplo duplo duplete; *pt*= pseudo triplete

*Toledo 2002

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para avaliar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas são empregados vários métodos, dentre eles o método de formação do complexo fosfomolibdênio (NEGRI et al., 2009), capacidade de redução pela transformação de Fe^{3+} em Fe^{2+} (GÜLÇIN, 2006), modelo do linoleato de β -caroteno (JAYAPRAKASHA et al., 2007), e pela redução do radical DPPH (AMAROWICZ et al., 2004).

Um dos métodos mais utilizados é o DPPH, que é baseado na captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) sendo reduzido a difenil-picril-hidrazina. Os resultados são expressos em IC_{50} , concentração esta necessária para reduzir 50% do radical DPPH, considerando-se que quanto menor o IC_{50} maior é a atividade antioxidante e esta é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (ANDRADE et al., 2007; NEGRI et al., 2009).

Inicialmente, realizou-se uma triagem com várias concentrações para se determinar o intervalo em que a análise de DPPH deveria ser realizada. As faixas de trabalho determinadas nesta triagem estão expressas na tabela 6.

Tabela 6 – Faixa de trabalho determinada na triagem para a análise de atividade sequestradora de DPPH para o extrato bruto (EB), fração aquosa (FA), fração acetato de etila (FAE) e o padrão vitamina C.

Amostra	Faixa de trabalho ($\mu\text{g/ml}$)
Vitamina C	2,0 - 8,0
EB	4,0 - 9,0
FA	3,0 - 8,0
FAE	3,0 - 8,0

A partir das faixas de trabalho foram realizadas as determinações da atividade antioxidante.

A análise da atividade antioxidante do extrato bruto, frações acetato de etila e aquosa, de *Stryphnodendron adstringens*, devido a comprovação da presença de substâncias polifenólicas nas mesmas, em especial do grupo dos taninos demonstrou resultados promissores. Na tabela 7, encontram-se os resultados da atividade antioxidante pelo sequestro de DPPH (IC_{50}) das 3 amostras e da vitamina C, utilizada no ensaio como padrão de composto antioxidante.

Tabela 7 – Capacidade antioxidante do extrato e frações de *S. adstringens* pela redução de DPPH.

Extrato e Frações	IC₅₀ (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
Vitamina C	5,19±0,21 [4,12]
EB	3,99±0,18 [4,62]*
FA	5,20±0,05 [0,87]
FAE	3,47±0,12 [3,49]*

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; *(P<0,05) quando comparados à vitamina C

A presença de substâncias polifenólicas, em especial taninos, é responsável pela atividade das amostras. Quanto maior o número de hidroxilas dessas substâncias maior a sua capacidade em quelar metais e sequestrar radicais livres (MORAIS et al., 2009).

A melhor atividade antioxidante da fração acetato de etila em relação ao extrato bruto se deve a permanência de uma maior parte de substâncias capazes de sequestrar radicais livres no processo de partição.

O fato da fração aquosa apresentar uma atividade antioxidante semelhante à vitamina C, demonstra que mesmo após a partição do extrato bruto com a fração acetato de etila, ainda restam na fração aquosa substâncias importantes com potencial capacidade antioxidante.

Capítulo II

6 REVISÃO DE LITERATURA

6.1 A PELE

A pele humana é um órgão complexo, correspondendo a cerca de 16% do peso corporal e atuando como barreira seletiva, revestindo em torno de 2 m² do organismo, sendo elo de ligação entre o corpo e o ambiente externo (HADGRAFT, 2001; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). É constituída pela epiderme, camada epitelial de origem ectodérmica e a derme (Figura 20), uma camada do tecido conjuntivo de origem mesodérmica e abaixo dela, encontra-se a hipoderme, que liga a pele aos tecidos subjacentes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

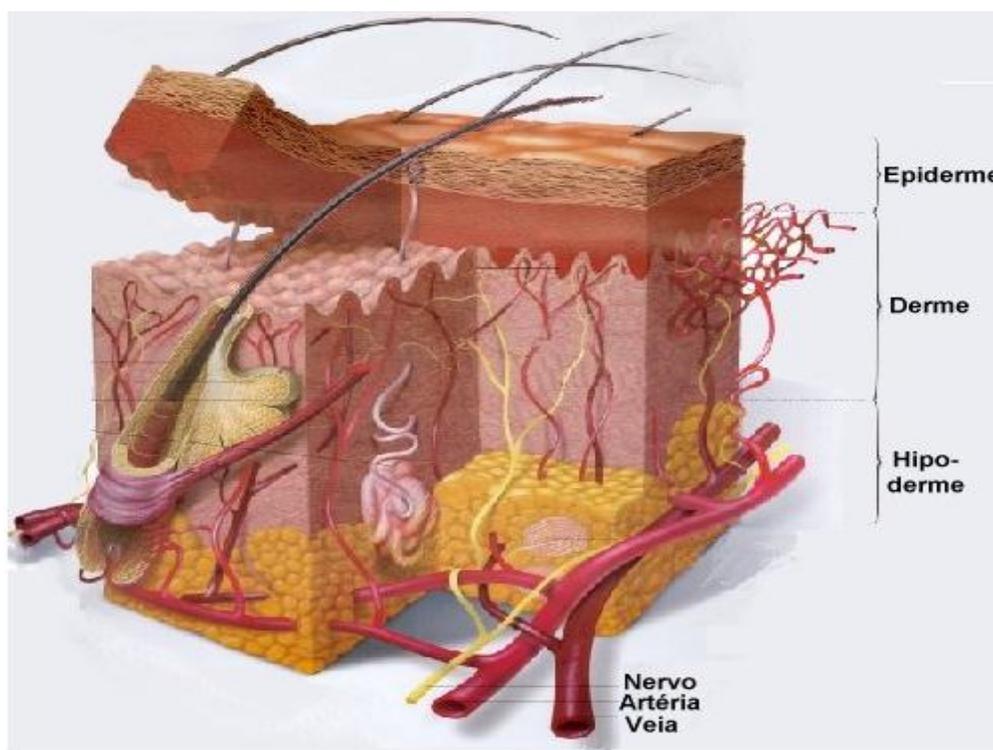


Figura 20 - Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme (Fonte: <http://www.saudetotal.com.br/prevencao/tópicos/histologia.asp> acessado em 17-11-10).

A epiderme é constituída pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, composto por diferentes tipos celulares. Os queratinócitos, que são células epiteliais especializadas responsáveis pela renovação, coesão e barreira da epiderme e também por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. É organizada em cinco camadas, sendo elas: camada basal, que devido às células-tronco, apresenta intensa atividade mitótica; camada espinhosa, onde as células dessa camada são unidas por filamentos que são importantes na manutenção da coesão entre as células e resiste aos efeitos de abrasão; camada granulosa, que funciona como uma barreira protetora da pele; camada lúcida,

sendo encontrada em peles espessas e formada basicamente de queratina e camada córnea, também rica em queratina (CARVALHO et al., 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A junção entre a epiderme e a derme é irregular. A derme possui projeções denominadas papilas dérmicas, que se encaixam em reentrâncias da epiderme, aumentando a coesão entre essas duas camadas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A derme é constituída de tecido conjuntivo contendo fibras elásticas e colágenas que são responsáveis pela tonicidade e elasticidade da pele. Também apresenta vasos sanguíneos e terminações nervosas, responsáveis por nutrir a epiderme. São encontradas na derme algumas estruturas derivadas da epiderme como pelos, glândulas sebáceas e sudoríparas, além das unhas. A derme é formada por duas camadas: camada papilar, superficial, que é constituída por tecido conjuntivo frouxo contendo fibras colágenas muito delicadas entrelaçadas com delgadas fibras do sistema elástico, possui também macrófagos, mastócitos, fibroblastos e outras células. A camada reticular, profunda, é constituída pelo tecido conjuntivo denso contendo feixes de fibras colágenas tipo I, que se entrelaçam com as fibras elásticas bem mais espessas que na derme reticular, que sustenta a epiderme (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; FERREIRA et al., 2007).

6.2 PROCESSOS DE CICATRIZAÇÃO

A pele apresenta função de barreira protetora contra o ambiente externo, protegendo o organismo. Quaisquer danos causados a ela desencadeiam, de imediato, sinais que caracterizam o processo inflamatório, como por exemplo, nas feridas. Este processo resulta da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e circulatórias devido a estímulos físicos ou sinalização química feita por estruturas das células rompidas, fragmentos do tecido (colágenos, elastinas, fibronectinas, e outros), proteínas séricas extravasadas e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (liberados dos grânulos das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas) ou neo-sintetizados (eicosanoides e PAF). Essas moléculas de sinalização ligam-se aos receptores da superfície da membrana induzindo mudanças no seu metabolismo provocando a formação de mediadores como os eicosanoides, citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos (BALBINO et al., 2005).

Durante a cicatrização do tecido lesado, ocorre a migração celular de fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais (BALBINO et al., 2005). Os fatores de crescimento liberados por estas células, juntamente com os componentes da matriz celular, são capazes de disparar sinais que iniciam e param cada um dos processos pelos quais ocorre a cicatrização (AGREN, 1999). Com isso, há a produção de colágeno pelos fibroblastos (fibroplasia), deposição de matriz extracelular, formação de novos vasos (angiogênese), cicatrização e re-epitelização da região da ferida (BALBINO et al., 2005). Estes processos

são sido divididos em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (Figuras 21 e 22) (CLARK, 1996).

A fase inflamatória é caracterizada por edema, eritema, calor e dor. Nessa fase, ocorre extravasamento sanguíneo devido à ruptura dos vasos, tendo como processo de reparo o tamponamento desses vasos, ocorrendo a vasoconstrição como resposta inicial devido a influência nervosa e ação de mediadores oriundos da desgranulação de mastócitos. Após injúria do endotélio, ocorre deposição de plaquetas, sendo ativadas e prosseguindo com recrutamento de novas plaquetas. Essa sequência resulta em um trombo rico em plaquetas que provisoriamente obstrui a lesão endotelial (HESS, 2002; BALBINO et al., 2005).

A fase proliferativa é responsável pela re-epitelização, que se inicia horas após a lesão. Por volta do quarto dia, inicia-se a formação do tecido de granulação, composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados (fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II). É um tecido edematoso formado por vasos imaturos, que são rompidos com facilidade. Uma nova matriz extracelular é produzida pelos fibroblastos que facilitam o crescimento celular, enquanto o oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local são carregados pelos novos vasos sanguíneos (BALBINO et al., 2005; MENDONÇA; COUTINHO NETO, 2009).

Na fase de remodelamento, que ocorre por volta do décimo dia, a ferida encontra-se totalmente preenchida pelo tecido de granulação. Nesta fase, o tecido passa a ser mais enrijecido por mais fibras colágenas, obtendo aparência de cicatriz, surgindo as primeiras fibras colágenas tipo I. As fibras colágenas se reorganizam, remodelam e amadurecem, ganhando força de tensão. A quantidade de colágeno depositada e a forma com que as fibras estão organizadas determinam a resistência de uma cicatriz (BALBINO et al., 2005; HESS, 2002).

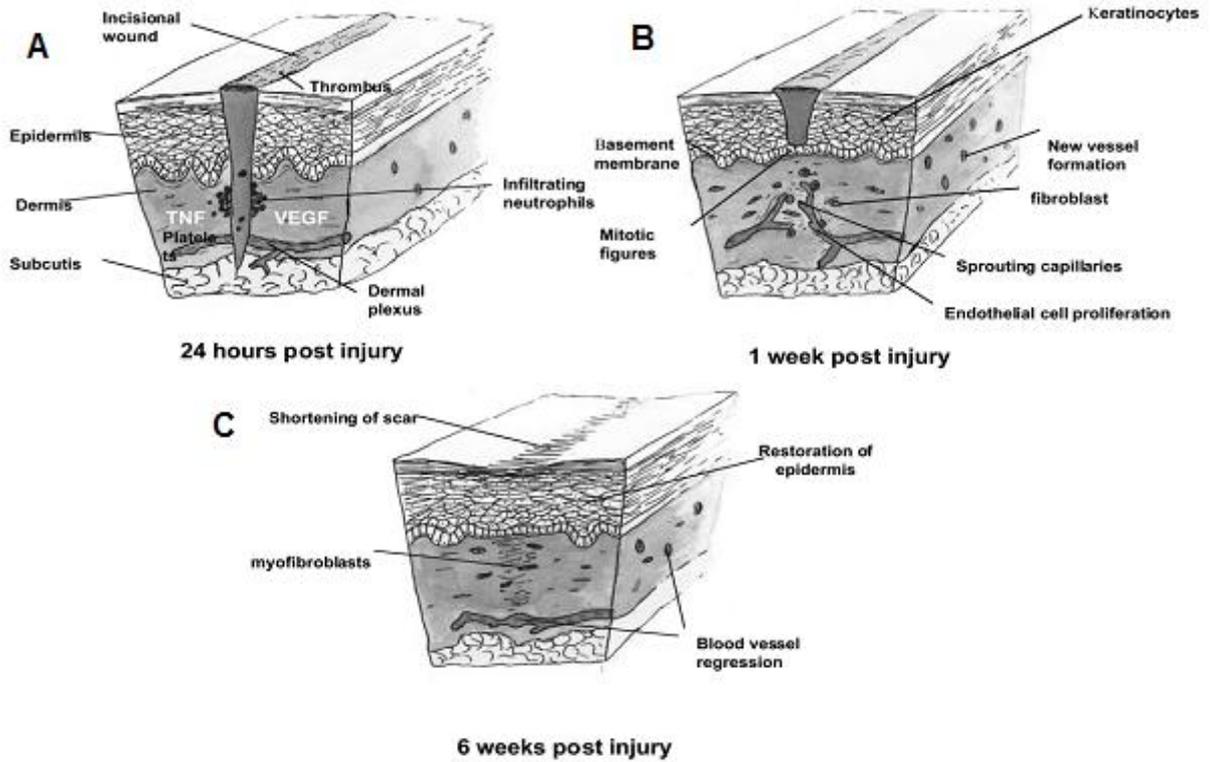


Figura 21 – Fases de cicatrização: (A) fase inflamatória, (B) fase de proliferação e (C) fase de remodelagem (BATES; JONES, 2003).

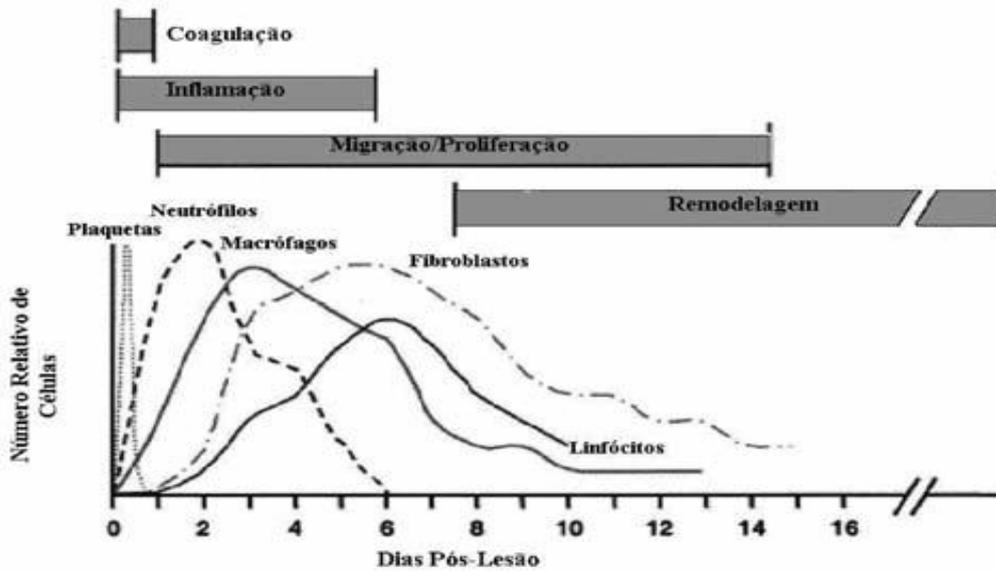


Figura 22 – Fases da cicatrização com as respectivas migrações celulares em cada etapa. (PARK; BARBUL, 2004 apud MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

6.3 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus é um distúrbio crônico hiperglicemiante, tendo como características clínicas o aumento de incidência de infecções como complicações microvasculares (microangiopatia diabética) e distúrbios metabólicos de etiologia múltipla (KOMESU et al., 2004; AMARAL et al., 2001). É decorrente da ausência de insulina ou sua incapacidade de produzir os efeitos adequados. Devido liberação descontrolada de glicose pelo fígado, ocorre hiperglicemia, também relacionada com a baixa captação de glicose pelo esquelético, tendo a síntese de glicogênio reduzida (RANG et al., 2004).

Existem dois tipos principais de diabetes mellitus. O diabetes tipo 1, que é conhecido como diabetes mellitus insulino-dependente (DMID), que tem como principal característica a deficiência absoluta de insulina devido a destruição auto-imune das célula B. Geralmente crianças e adolescentes não obesos são afetados pelo diabetes tipo 1, existindo uma predisposição hereditária, associada à antígenos de histocompatibilidade particulares (tipos HLA). O diabetes tipo 2 é conhecido como diabetes *mellitus* não insulino-dependente (DMNID). Decorre de resistência e comprometimento da secreção da insulina. Os pacientes, geralmente são adultos obesos e ocorre aumento progressivo da doença com a idade, devido declínio das células B (RANG et al, 2004).

A persistência da hiperglicemia em pacientes diabéticos, provoca produção elevada de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), que ao reagir com componentes celulares, contribuem para o aumento da morte neuronal através da oxidação de proteínas, danos ao DNA e peroxidação de produtos lipídicos. A persistência de inflamação e resposta angiogênica inadequada são as principais causas pelo atraso da cura em pacientes com diabetes. Os antioxidantes podem ser úteis como terapia de suporte em complicações diabéticas (AKTUNC et al., 2010; COMIN, 2010).

Uma das causas de morbidade e mortalidade em pacientes diabéticos é a dificuldade da cicatrização de feridas, sendo maior o risco de infecção, retardo na cicatrização e até mesmo amputação de membros. Existem no mundo cerca de 235 milhões de pessoas com diabetes, onde 15% destas sofrem de pé diabético. Os tratamentos destas feridas crônicas alcançam somente cerca de 50% de cura e a deficiência na cicatrização contribui para 81% de amputações em membros inferiores associados ao diabetes (LAING et al., 2010; LEE et al., 2011). Além disso, as feridas diabéticas são propensas à infecção devido à insuficiência de granulócitos e da quimiotaxia (BALBINO et al., 2005).

Os taninos, devido à formação de uma camada protetora sobre a pele, ou mucosa danificada são responsáveis pela cura de feridas. Foi demonstrado por Lopes et al. (2005), no tratamento de feridas cutâneas com extratos de *Stryphnodendron polyphyllum* e *S. obovatum*, que o alto teor de taninos promoveu aumento significativo na proliferação celular da epiderme.

Wang et al. (2008), verificaram que esponjas contendo colágeno de quitosana reticulado com fator de crescimento de fibroblastos demonstraram resultados promissores, sendo um curativo ideal para melhorar a cicatrização de feridas cutâneas de pacientes diabéticos.

Gutierrez e Vargas (2006) otimizaram significativamente o processo de cicatrização em ratos diabéticos em tratamentos realizados com extrato aquoso de *Acalypha langiana*. Qiu et al. (2007), avaliaram a cicatrização de feridas diabéticas aplicando topicamente fibronectina plasmática na ferida, observando que a fibronectina melhorou a cicatrização, além de promover um aumento na atividade dos fibroblastos e liberação de TGF.

Moraes et al. (2000), comprovaram que o tratamento de ratos diabéticos com insulina e suplementação dietética de zinco e cromo favoreceram a cicatrização de feridas cutâneas.

6.4 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

Durante o processo de cicatrização há em cada uma de suas fases a estimulação de diversos fatores de crescimento. Na etapa em que ocorre a angiogênese, fase proliferativa, há a redução na disponibilidade de oxigênio e sangue para as células, levando a uma hipóxia tecidual e posterior aumento da expressão de fatores pró-angiogênicos (LEVY et al., 1995 apud LUCENA; YAMANE, 2008). A família mais importante neste processo é a do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) devido a sua capacidade em estimular todas as etapas do processo de angiogênese, incluindo proliferação e migração das células endoteliais, degradação da membrana basal e permeabilidade vascular aumentada (BATES; JONES, 2003).

A família VEGF é formada por cinco isoformas: VEGF-A (referido como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento placentário (PIGF) (BATES, 2010). O VEGF-B também encontra-se relacionado com o desenvolvimento de artérias coronárias e com degradação da matriz extracelular e o VEGF-C e VEGF-D, com o desenvolvimento do sistema linfático (INFANGER et al., 2004; DVORAK, 2005). O VEGF tem sido o fator de crescimento mais estudado, por ser responsável pela vasculogênese e angiogênese através do aumento da sua expressão na presença de macrófagos e queratinócitos e no aumento de seus receptores nos vasos sanguíneos, além de atuar na regeneração de tecidos em feridas diabéticas (BALBINO et al., 2005; NOGAMI et al., 2007; YAN et al., 2010).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica com massa molecular de 45 kDa que apresenta especificidade por células endoteliais (LEUNG et al., 1989; KECK et al., 1989 apud BAO et al., 2009). Este fator possui várias isoformas diferentes, sendo as principais em humanos com 121, 165 e 189 aminoácidos. Apesar das diferenças entre as isoformas elas apresentam a mesma atividade biológica quando em solução, aumentando a permeabilidade vascular e estimulando a proliferação e migração endotelial (DVORAK,

2002). Este fator é produzido por diversas células participantes do processo de cicatrização: como as células endoteliais, neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, plaquetas e células musculares (BAO et al., 2009).

O VEGF é um agente mitótico específico de células endoteliais, que atua estimulando a angiogênese *in vivo* e a permeabilidade vascular com um potencial cerca de 50 mil vezes maior que a histamina (substância com ação vasodilatadora) (SENGER et al., 1990 apud NG et al., 2006). Este fator é a chave reguladora da angiogênese fisiológica (LI et al., 2003) e desempenha papel importante durante a embriogênese, na diferenciação de novos vasos, e no reparo tecidual (NG et al., 2006). Uma baixa tensão de oxigênio que ocorre durante a lesão é um indutor importante de VEGF (LI et al., 2003)

Cada forma da família VEGF se liga a um receptor específico normalmente por ligações hidrofóbicas e com alta afinidade (FERRARA, 1996; FERRARA, 2002). O receptor VEGFR-1/Flt-1 e VEGFR-2/KDR são expressos na maioria das células endoteliais vasculares (sanguíneas) e o VEGFR-3 em células endoteliais linfáticas. No entanto, o VEGF não reconhece o VEGFR-3, ligando-se apenas ao VEGFR-1 e VEGFR-2 (FERRARA et al., 2003 apud GONÇALVES, 2006). Estes receptores quando estimulados pela VEGF atuam aumentando o número de células endoteliais através de dois mecanismos: estimulação direta da mitose das células endoteliais mediada por ligação ao receptor VEGFR-2 (LEUNG et al., 1989 apud LUCENA, YAMANE, 2008) e através da migração de células precursoras da medula óssea, dependente da ligação ao receptor VEGFR-1 (Figura 23) (HATTORI et al., 2002 apud LUCENA, YAMANE, 2008).

VEGFR2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando envolvido no processo de diferenciação de células endoteliais (FERRARA, 1999 apud GONÇALVES, 2006), quimiotaxia e sobrevivência células.

VEGFR1 e VEGFR2 apresentam 44% de homologia. A expressão dos genes é ativada em hipóxia. A sinalização de células endoteliais é iniciada pela ligação com os receptores (BARTOLI et al., 2000). O VEGFR2 é o receptor chave que inicia a sinalização para VPF e VEGF causando a migração de células endoteliais, proliferação e formação de novos vasos (angiogênese) (BHATTACHARYA et al., 2005).

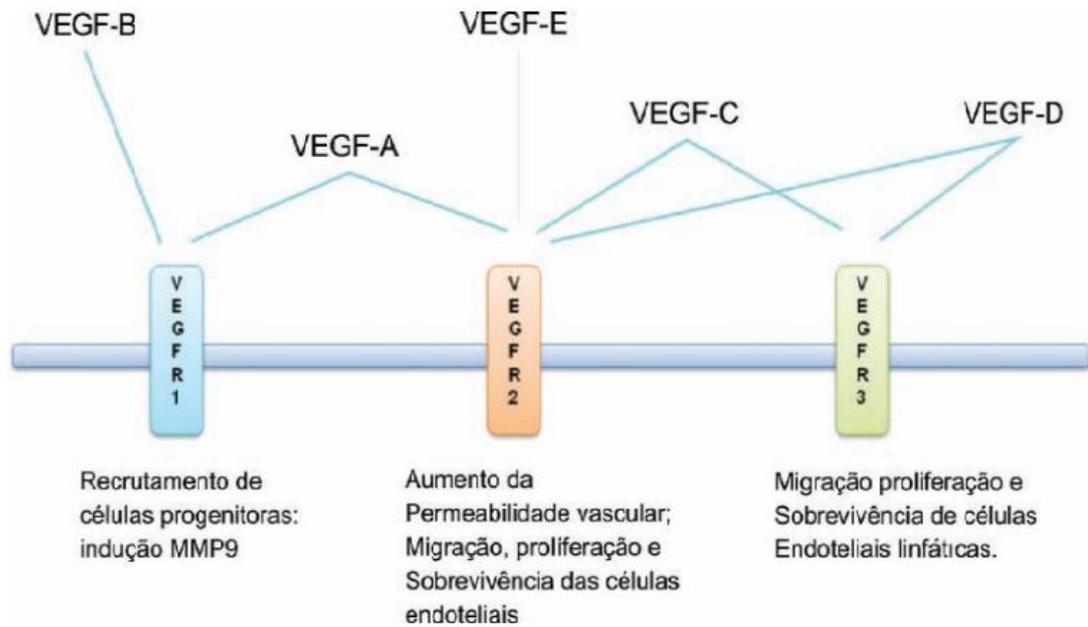


Figura 23 - Representação da família do VEGF e ligação com receptores (VEGFR); MMP9: matriz metaloproteinase (PARK et al., 1993 apud LUCENA, YAMANE, 2008).

A estimulação da angiogênese pelo VEGF envolve desde degradação da membrana e vasodilatação até migração e proliferação de células endoteliais (FOLKMAN; BREM, 1992 apud BAO et al., 2009). Outro mecanismo pelo qual se realiza a migração das células endoteliais é através do aumento da permeação vascular que pode ser mediada por óxido nítrico e prostaciclina (BAO et al., 2009). Este episódio tem sido associado às primeiras fases do reparo tecidual com deposição de uma matriz rica em fibrina.

6.5 PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

A técnica de Espectroscopia Fotoacústica (PAS) permite avaliar a propagação e distribuição de medicamentos *in vivo*, *ex-vivo* ou *in vitro* aplicados topicamente. A técnica permite realizar separação espectral dos diversos constituintes das formulações através da absorção óptica, obtida no espectro total da formulação. Essa absorção óptica é dada pela interação da radiação eletromagnética com a matéria, onde comprimentos de onda diferentes transportam diferentes quantidades de energia, resultando em informações sobre a estrutura molecular do material analisado (ALCANTARA, 2002 apud SEHN, 2006).

A PAS baseia-se no efeito fotoacústico e consiste na geração de uma onda acústica, que pode ser observado quando a luz modulada é absorvida por uma amostra dentro de uma célula contendo gás e acoplada a um microfone (Figura 24). A amostra é exposta a um feixe de luz que é mecanicamente ou eletronicamente modulada em uma frequência determinada. A absorção de luz modulada gera ondas acústicas na mesma frequência da luz incidente, produzindo oscilações de pressão que são responsáveis pelo sinal fotoacústico (ROMPE et al., 2004; SEHN, 2006).

Através da técnica fotoacústica, é possível fazer uma análise de perfil de profundidade, selecionando a camada da amostra a ser estudada. Isso é possível porque o sinal fotoacústico depende do comprimento de difusão térmica para uma dada amostra, e isso diminui a difusão de comprimento com o aumento da modulação e a frequência da luz incidente. À medida que a amplitude das ondas térmicas decai exponencialmente com a distância, apenas a quantidade de radiação absorvida por uma camada da amostra com espessura de cerca de um comprimento de difusão térmica serão responsáveis pelo sinal fotoacústico (ROMPE et al., 2004).

A utilização da Espectroscopia Fotoacústica possui inúmeras vantagens, dentre elas o fato de não ser uma técnica destrutiva, possibilitando a reutilização das amostras e acompanhamento quando a amostra for submetida à diversos tratamentos químicos, térmicos e físicos. Além disso, possibilita a detecção de concentrações reduzidas de compostos absorvedores, permite a determinação do perfil de penetração de uma substância através de espectros e é uma técnica utilizada para a avaliação de permeação cutânea de medicamentos. É uma técnica versátil, o que permite analisar tanto amostras opticamente opacas quanto amostras transparentes (SEHN, 2006; CARVALHO, 2010).

A técnica apresenta resultados promissores no estudo de materiais biológicos como membranas, amostras ósseas ou estruturas de tecidos que são insolúveis. Constitui-se numa ferramenta importante de pesquisa e diagnóstico, possibilitando a análise desses tecidos biológicos (COSTA et al., 2007).

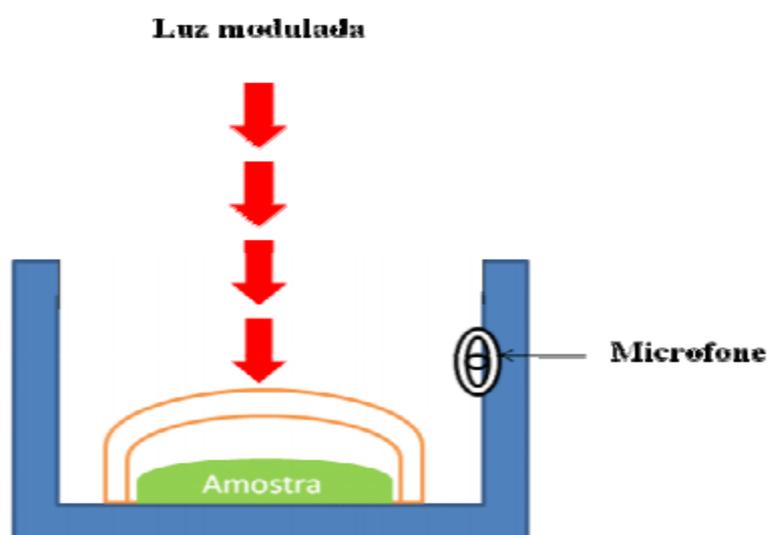


Figura 24 – Esquema de uma célula fotoacústica (FREITAS, 2009).

7 OBJETIVO

O objetivo do trabalho neste capítulo foi avaliar a atividade cicatrizante e a permeação cutânea em ratos diabéticos tratados com o extrato bruto obtido das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o comprimento e espessura da área re-epitelizada.
- Contagem do número de metáfases bloqueadas.
- Avaliar as fibras colágenas tipo I e III.
- Avaliação da presença da proteína VEGFR através de Western Blotting.
- Avaliar a permeação cutânea.

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 MATERIAL

8.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Os solventes e reagentes utilizados possuíam grau de pureza pró-análise (P.A.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth® e alta pureza das marcas Across®, Invitrogen® e Aldrich®.

- Alaranjado G
- Álcool absoluto
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ácido pícrico
- Cera de abelha
- Eosina
- Eosina amarelada
- Etanol 92,8%
- Hematoxilina
- Ketamina
- Parafina
- Ração Nuvilab®
- Rompum
- Xilol
- Estreptozotocina
- Sulfato de vincristina
- 2β-mercaptanol
- Acrilamida
- Anticorpo policlonal anti-VEGF-R de coelho (anticorpo primário) - Biosource
- β-Aprotinina
- Azul de bromofenol
- Bisacrilamida
- Comassie blue
- Glicerol
- Inibidor de protease PMSF
- Leite em pó - Molico
- Membrana de nitrocelulose -Perkin Elmer
- Metanol
- Padrão de peso molecular - Invitrogen

- Sulfato dodecil de sódio - SDS
- Tris base
- Tween 20

8.1.2 Equipamentos

- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Microscópio Olympus BX41 UTU 0.5XC-3, acoplado a uma Câmera Q Color 3 Olympus American INC
- Software para captura de imagem - Q Capture Pro versão 5.1
- Programa de análise de imagem - Image-Pro Plus versão 4.5 – Media Cybernetics, Inc – Silver Spring, MD
- Microscópio Olympus BX 50
- Micrótomo Leica RM2245
- Polarizador Attachment Nszh-KPO
- Sistema de eletroforese Bio-rad
- Storm 860 Amersham Biosciences

8.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

8.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar de 60 dias (220-240 g) provenientes do Biotério Central da UEM e mantidos no Biotério Setorial do DCM (Departamento de Ciências Morfológicas) em condições padronizadas (temperatura de 22 ± 1 C° e umidade relativa de $50\pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de 12 h e livre acesso à água e ração Nuvilab®.

8.2.2 Comitê de ética em experimentação animal

Os experimentos foram conduzidos em conformidade com as regras de cuidado e uso de animais de laboratório elaborados de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi submetido ao Comitê tendo sido aprovado, de acordo com o protocolo nº 141/2010, conforme anexo 1.

8.2.3 Obtenção do gel de carbopol para o tratamento das feridas

-Carbopol 940 NS	0,2 g
-Trietanolamina	0,2 g
-Extrato Bruto	1%

-Óleo de amêndoas	0,6 g
-Água destilada q.s.p.	20 g

Para a preparação do gel, pesou-se o carbopol 940 NS e pulverizou em gral de porcelana. Pesou-se a água destilada em um béquer e foi acrescentada aos poucos sobre o carbopol, mexendo sempre, até dissolvê-lo por completo. A trietanolamina foi acrescentada diretamente no gral, com agitação constante até obtenção de consistência de gel, sendo adicionado o óleo de amêndoas em seguida, pois melhora a absorção devido ao seu caráter lipofílico. Em seguida, acrescentou-se o extrato bruto liofilizado e previamente homogeneizado de *Stryphnodendron adstringens*, pesado na concentração de 1%, permanecendo em agitação para incorporação do extrato bruto à formulação. O gel base foi preparado da mesma maneira, sem a adição do extrato bruto (CORRÊA et al., 2005).

8.2.4 Avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos

8.2.4.1 Indução do diabetes

Para indução da diabetes, os animais foram submetidos a jejum prévio de 14 h, pois nestas condições tornam-se mais susceptíveis ao diabetes. Após esse período, foi injetada uma solução de estreptozotocina diluída em tampão citrato 0,1 mol l⁻¹ pH 4,5, na dose de 35 mg/kg de peso corporal, por via endovenosa (veia peniana). No quarto dia após a indução do diabetes, foi realizada a análise da glicemia (método glicose oxidase) para comprovação do estabelecimento do diabetes. Foram considerados diabético os animais que apresentaram glicemia superior a 250 mg/dl (ZANONI et al., 2003; COMIN et al., 2010).

8.2.4.2 Elaboração das feridas e tratamento dos animais

Para a avaliação de atividade cicatrizante foram utilizados 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos (n=5 animais por grupo) correspondentes a 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento. No sétimo dia após indução do diabetes, os animais foram analgesiados com Rompum/Ketamina 1:1 (1 mg/kg) para a elaboração das feridas. Foi realizada a tricotomia do dorso e após assepsia do local, utilizou-se um molde (punch) para marcar a área da confecção das feridas (1 cm²). Foram realizadas duas feridas para remoção da epiderme e derme com auxílio de tesoura, conforme Figura 25. Após 24 h iniciou-se o tratamento com os géis, sendo que a ferida da direita recebeu tratamento diário com gel base e a da esquerda com gel contendo 1% do extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens*.

Após 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento, administrou-se sulfato de vincristina 0,5 mg/kg (Tecnocris[®] 1 mg/ml) por via endovenosa (veia peniana) para bloquear a proliferação mitótica (SEHN et al., 2009). Duas horas após a administração, os animais foram

anestesiados com tiopental na dose de 40 mg/kg de peso corporal até a morte por aproveitamento de anestesia.

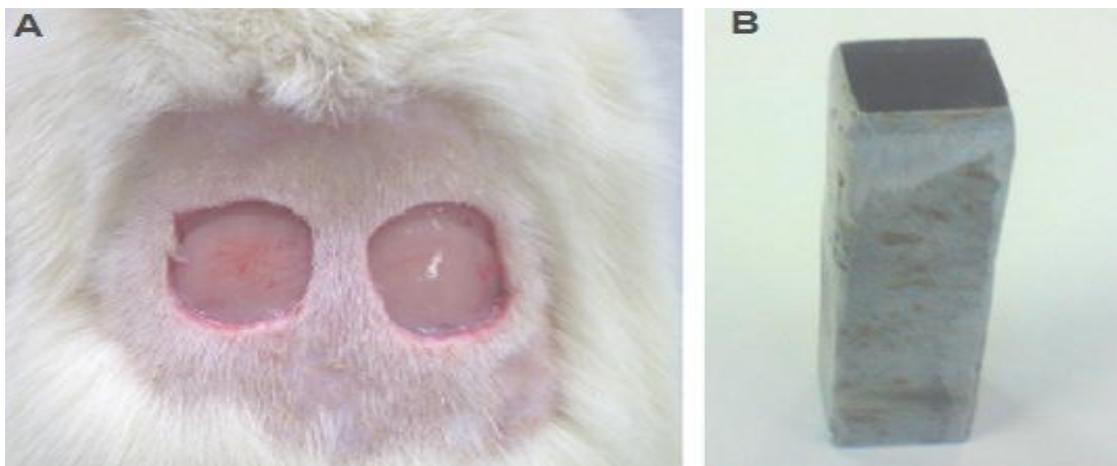


Figura 25 – (A) Feridas realizadas no dorso dos animais e (B) punch utilizado para marcação no dorso.

8.2.4.3 Preparação da pele para análise morfológica

Após o sacrifício foram retirados fragmentos de pele correspondentes ao local da ferida dos quatro grupos de tratamento e deixados por 24 h para fixação do material em solução de Bouin (ácido pícrico:ácido fórmico:ácido acético; 75:25:5 v/v), sendo posteriormente utilizados para análises histológicas. Foram realizados cortes semisseriados (6 μ m) a partir do centro da ferida, dispostos em duas lâminas, com 5 cortes cada, uma corada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e a outra por picro-Sírius (DAYAN et al., 1989).

As lâminas coradas com a técnica HE foram avaliadas em microscópio acoplado a um sistema de captura de imagem e analisadas pelo programa Image Pro-Plus® quanto à re-epitelização (comprimento e espessura) e número de metáfases. As lâminas coradas com a técnica picro-Sírius foram avaliadas em microscópio contendo luz polarizada para a quantificação das fibras colágenas tipo I e III através do programa Image Pro-Plus®.

8.2.4.4 Análise da re-epitelização

Aos 4 e 7 dias de tratamento foi realizada a medida do comprimento da língua re-epitelizada na parte superior da mesma, nos dois lados da ferida, seguindo-se até a verificação do tecido íntegro, como mostra a Figura 26. Os valores das medidas foram somados e utilizados para a comparação pelo programa de estatística Graph Pad Prism versão 5.0. Aos 12 e 17 dias de tratamento a ferida apresentou-se totalmente fechada,

sendo realizada a medida da espessura da epiderme recém formada em três pontos distintos na região central da mesma. As análises foram realizadas em 3 cortes por animal, com objetiva de 10X.

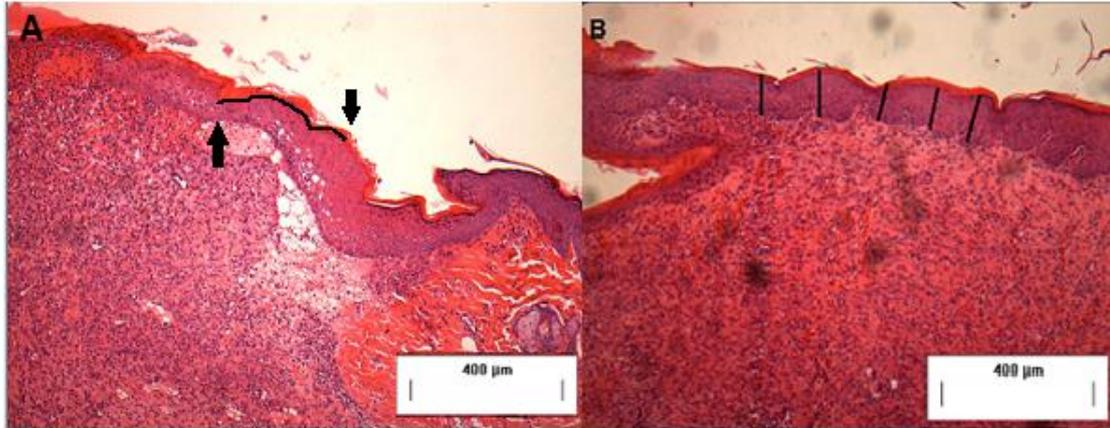


Figura 26 – Corte histológico de pele de rato. Figura representativa da medida do comprimento (A) e espessura (B) da área re-epitelizada. As setas indicam o início e fim da área re-epitelizada (6 µm; Hematoxilina-Eosina).

8.2.4.5 Contagem de metáfases

A contagem do número de metáfases foi realizada na camada basal e supra basal da área de re-epitelização, como mostra a Figura 27. Foram analisados 3 cortes de cada animal, com objetiva de 40X, totalizando um comprimento de 10000 µm, para a contagem das metáfases e o resultado expresso em metáfases/mm.

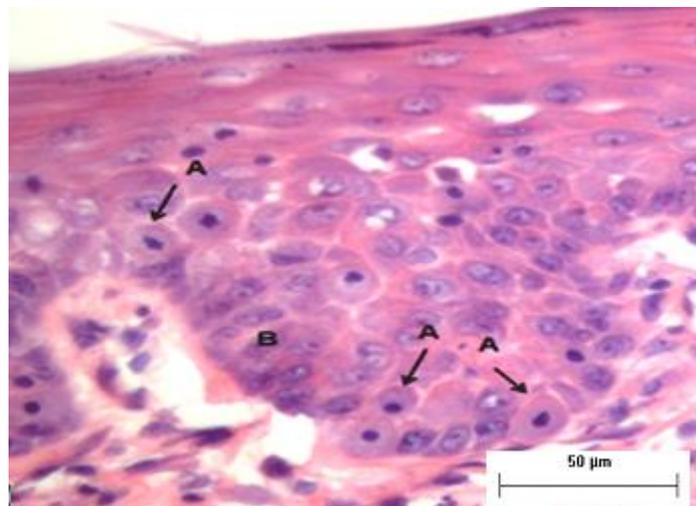


Figura 27 – Corte histológico de 6 µm de pele de rato corada por Hematoxilina-Eosina. Fotomicrografia das metáfases (A) presentes na camada basal/supra basal (B) da área de re-epitelização.

8.2.4.6 Análise das fibras colágenas

Para visualização das fibras colágenas através da birrefringência utilizou-se microscópio equipado com polarizador, no qual o fundo das lâminas apresenta coloração preta e as fibras colágenas coloração vermelho/amarelo e verde.

A quantificação das fibras foi realizada através do programa ImagePro Plus®, onde a área das proteínas coradas é calculada automaticamente (verde ou vermelho/amarelo) em relação à área do campo analisado. Para definir os pixels a serem contados pelo programa foram selecionados tons de vermelho, amarelo e verde. As fibras verdes foram consideradas como tipo III e as vermelhas/amarelas como tipo I, como pode ser observado na Figura 28. As análises foram realizadas em triplicada para cada lâmina e em cada corte histológico padronizou-se para a contagem o campo central e dois campos laterais da ferida da camada papilar da derme (CUTTLE et al., 2005). Foi utilizada objetiva de 20X para a quantificação das fibras.

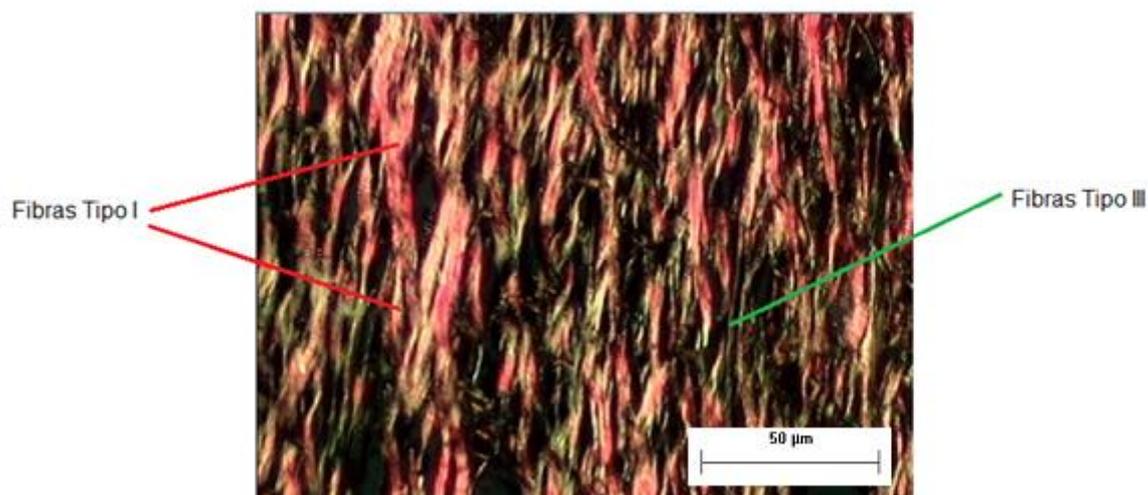


Figura 28 – Corte histológico de pele de rato. Fotomicrografia da birrefringência das fibras colágenas tipo I (vermelha/amarela) e III (verde) da camada papilar de pele (picro-Sírius 6 µm).

8.2.4.7 Análise de proteína VEGF por Western Blotting

Para a realização deste ensaio, os animais receberam o mesmo tratamento descrito no tratamento com gel de carbopol (seção 8.2.4.2).

Após 4, 7 e 12 dias as feridas foram fragmentadas em pedaços pequenos e homogeneizados com o mínimo de Tampão Tris (50 mmol l⁻¹, pH 6,8) contendo inibidores de protease PMSF e aprotinina em 10 e 2 mg/ml, respectivamente. A concentração (µg/ml) de proteínas totais presentes neste lisado foi determinada através do método de Bradford

(BRADFORD, 1976 apud MAGALHÃES; ARRUDA, 2007). As amostras foram congeladas em freezer -80 °C até o momento da realização do ensaio.

No dia do ensaio, as amostras foram descongeladas e diluídas até uma concentração de 1 µg/µl, juntamente com o tampão amostra. Este lisado foi fervido por 4 min em 95 °C.

O gel de separação e de empacotamento foi preparado, em duplicata, a 10% e 4% de poliacrilamida, respectivamente. Após a preparação dos géis e aplicação das amostras iniciou-se a corrida, com o tampão de corrida e uma corrente elétrica de 100 V. Foi aguardada a saída das amostras da linha de compensação e então o gel foi retirado da placa. Um gel foi corado com Comassie blue para visualização da separação das proteínas totais e o outro gel foi transferido para membrana de nitrocelulose e corado com Ponceau S, para realização do imunoblot ou imunodeteção. A membrana foi bloqueada com solução contendo 5% de proteína do leite por 1 h. A membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBST. Após, a mesma foi incubada por 2 h com o anticorpo primário, sendo posteriormente lavado com uma solução de TBST, 3 vezes por 15 minutos (solução tampão com Tween 20). A revelação da membrana foi feita utilizando um anticorpo secundário apropriado, conjugado com peroxidase por 1 h. (GUPTA et al., 2008). Para o procedimento de quimioluminescência utilizou-se um sistema de revelação com Novex® e posteriormente foi realizada sua visualização no equipamento Storm.

8.2.4.8 Análise de permeação cutânea

A análise foi realizada utilizando-se 2 animais por grupo de tratamento, 4, 7, 12 e 17 dias, conforme a seção 8.2.4.2, exceto pela aplicação do sulfato de vincristina e análises histológicas. A pele foi removida e encaminhada imediatamente ao laboratório de fotoacústica para análise da permeação cutânea. As espessuras das amostras de pele foram mensuradas com um micrômetro digital.

Previamente ao experimento com as feridas, o extrato bruto de barbatimão (liofilizado em pó), o gel contendo EB e o gel base foram submetidos à espectroscopia fotoacústica (Figura 29) para verificar a região espectral de absorção de seus componentes entre 200 e 800 nm. As amostras foram depositadas na cavidade do porta-amostra, dentro da câmara fotoacústica para medida de absorção. O gel base foi depositado em uma cubeta de quartzo alojada no caminho do feixe de luz, próximo ao foco, mas fora da câmara fotoacústica. Deste modo, detectou-se a absorção da substância por meio de uma medida de transmissão da luz, já que a luz que passa através da amostra é absorvida pelo liofilizado em pó (padrão) que se encontra, dentro da célula fotoacústica.

As amostras de pele foram analisadas na porção epidermal (parte externa) e porção dermal (parte interna) da ferida. As leituras obtidas foram comparadas para verificar se

houve ou não permeação do gel contendo EB a 1% de barbatimão. Para uma melhor avaliação da permeação cutânea realizou-se a subtração dos valores do espectro da porção dermal da ferida tratada com gel contendo EB e a tratada com o gel base.

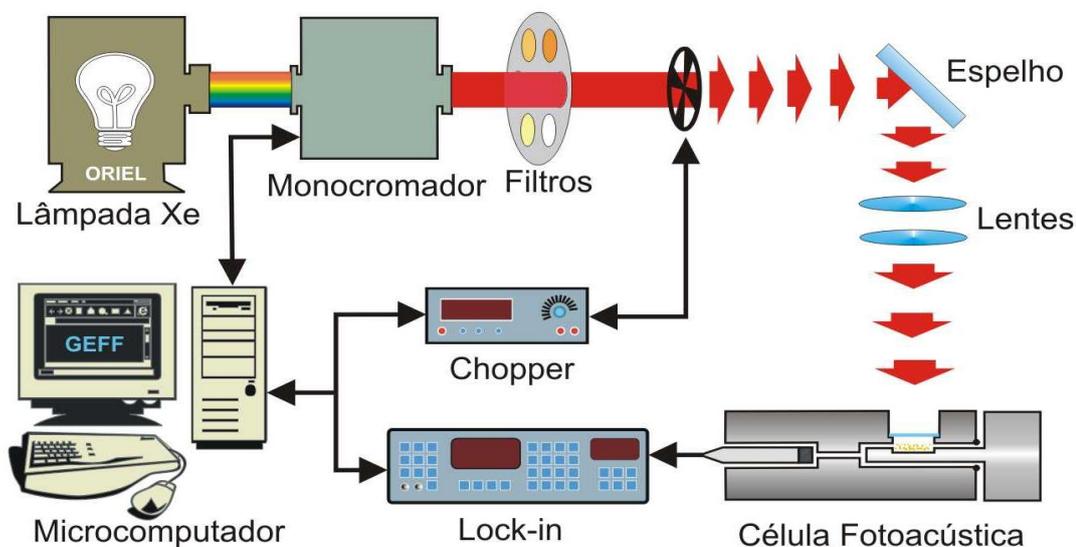


Figura 29 – Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para medidas *in vitro* (PEDROCHI, 2004).

8.2.5 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística através do programa Graph Pad Prism versão 5.0. Os dados foram apresentados como média±desvio padrão [coeficiente de variação (%)] utilizando-se análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Tukey, sendo considerado $P < 0,05$ como critério de significância.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 ANÁLISE DA RE-EPITELIZAÇÃO

A análise estatística efetuada pelo teste de variância (ANOVA) dos dados constantes na tabela 8 e na Figura 30 demonstra que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as medidas do comprimento da língua de re-epitelização do grupo tratado e grupo controle, com 4 dias de tratamento. O mesmo ocorreu com os animais sacrificados com 7 dias. Em ambos os grupos, o comprimento da área re-epitelizada foi significativamente maior nos animais tratados com EB.

Em relação à análise da espessura da área re-epitelizada (Figura 31) observou-se que, para animais de 12 dias, não houve diferença significativa entre o grupo tratado e controle. Já nos animais de 17 dias, a espessura medida foi significativamente maior ($P < 0,05$) no grupo tratado com EB.

Tabela 8 – Valores médios do comprimento (4 e 7 dias) e espessura (12 e 17 dias) da área re-epitelizada para as feridas tratadas com gel base e gel com EB (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base (μm) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB (μm) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
4	1051 \pm 11,78 [5,49]	1308 \pm 11,77 [4,93]
7	1339 \pm 23,96 [7,37]	1413 \pm 14,90 [4,59]
12	116,9 \pm 4,159 [14,23]	122,2 \pm 1,818 [5,36]
17	117,6 \pm 2,672 [10,16]	134,6 \pm 2,231 [7,59]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

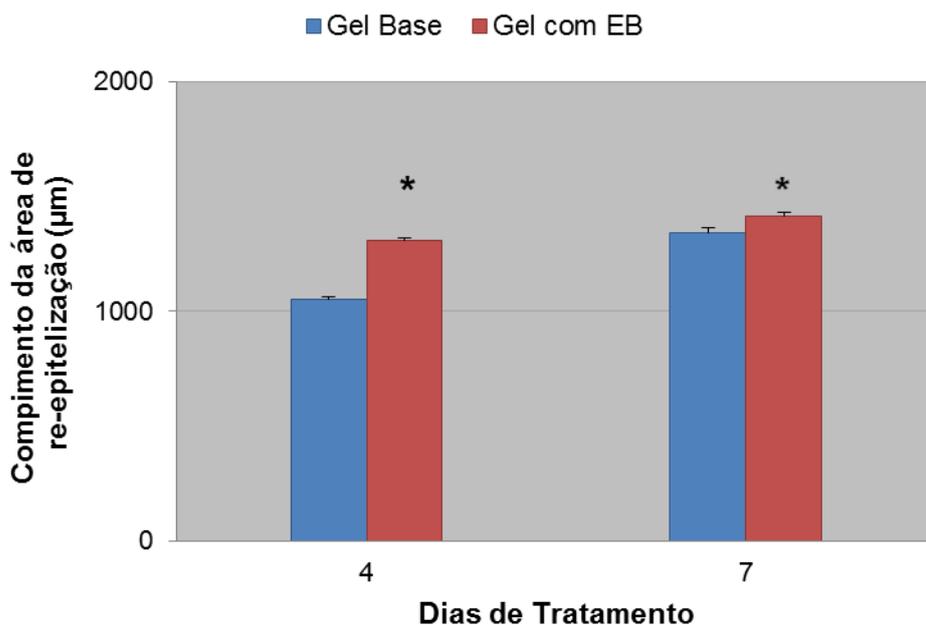


Figura 30 – Representação da média±desvio padrão da medida da língua de re-epitelização, em µm, aos 4 e 7 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada em ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.

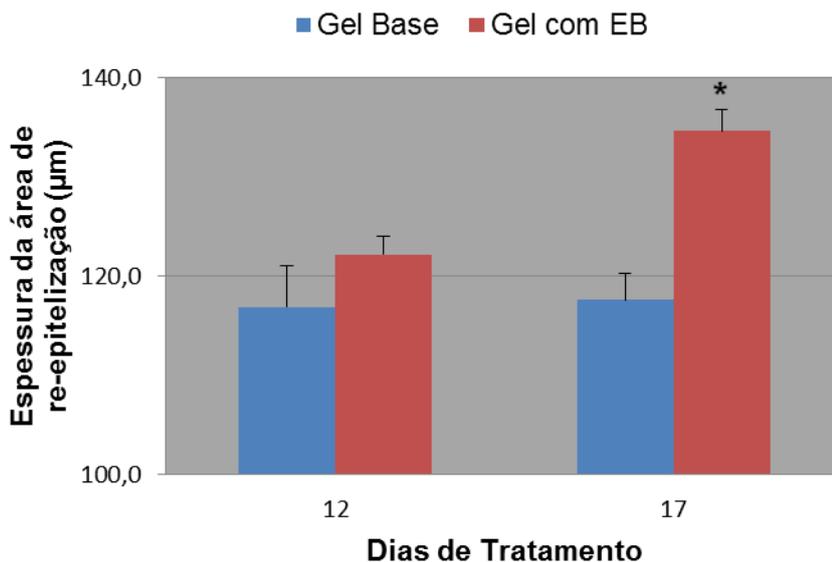


Figura 31 – Representação da média±desvio padrão da espessura da epiderme, em µm, aos 12 e 17 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.

Logo após a lesão da ferida (Figura 32) ocorre o processo de re-pitelização através de mecanismos de “efeitos de vizinhança livre”. Em resposta a esta lesão ocorre a migração

e proliferação de fibroblastos, células endoteliais e células epiteliais, deposição de tecido conjuntivo e contração da ferida (BALBINO et al., 2005; LOPES et al., 2005). Os resultados obtidos demonstram que o gel contendo extrato de barbatimão atuou positivamente na migração de queratinócitos, uma vez que nos animais tratados houve uma migração mais rápida até os sete dias de tratamento, observada pelo maior comprimento da língua de re-epitelização, enquanto dos 12 aos 17 dias, a maior espessura da epiderme nos animais tratados reflete uma maior migração celular para as camadas superiores. As maiores diferenças entre os valores dos grupos controle e tratado foram nas fases iniciais (quatro dias) e finais (17 dias) do processo de re-epitelização, indicando que o extrato de barbatimão atuou preferencialmente nessas fases.

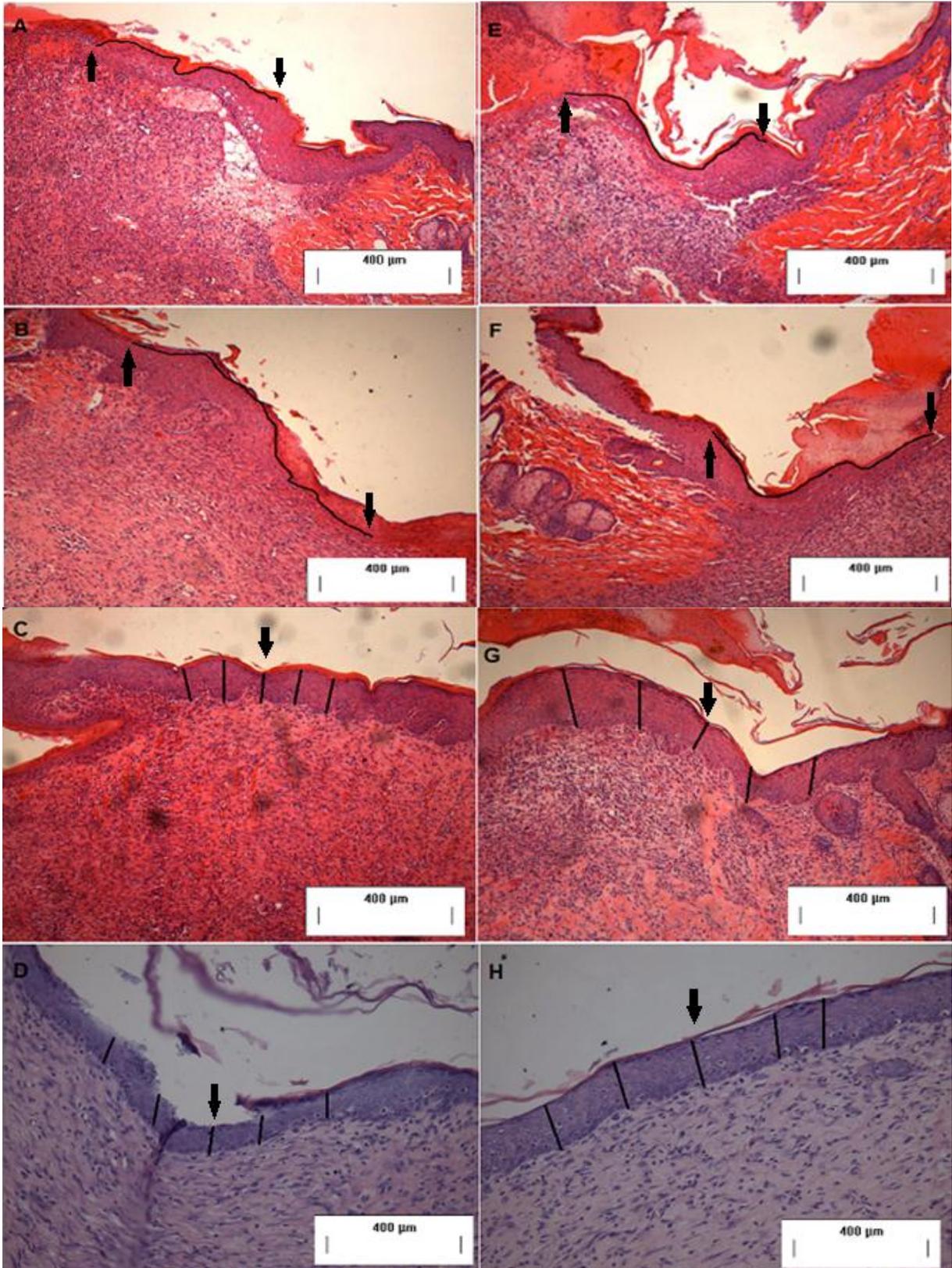


Figura 32 – Fotomicrografia de cortes histológicos da área re-epitelizada de um dos lados e do centro das feridas tratadas com gel contendo EB (A, B, C e D) e com o gel base (E, F, G e H), aos 4, 7, 12 e 17 dias, respectivamente (n=5). As setas indicam o início e fim da área re-epitelizada aos 4 e 7 dias e o centro da área aos 12 e 17 dias (HE, objetiva 10X).

Em tecido normal, as células próximas à camada basal aparecem em contato umas com as outras permanecendo inibidas e com potencial mitótico latente. Ao ocorrer uma lesão, este mecanismo inibitório desaparece fazendo com que as células apresentem efeito mitótico e ocorra a re-epitelização do tecido injuriado (BALBINO et al., 2005).

A proliferação celular pode ser analisada através da administração do sulfato de vincristina ao animal duas horas antes do sacrifício. O sulfato de vincristina através de ligações com a proteína tubulina resulta na interrupção da mitose e consequente bloqueio das células em metáfase. Na tabela 9 e Figura 33 pode-se observar a quantidade de metáfases em cada tratamento. Observa-se que o número de metáfases em 4 e 17 dias para o tratamento com o gel contendo EB foi maior que o tratamento com o gel base, no entanto em 7 e 12 dias, o tratamento contendo gel base teve um número maior de metáfases do que o tratamento com o gel contendo EB. Em 4 e 12 dias houve diferença significativa ($P < 0,05$) Esses resultados mostram que o gel contendo EB teve um efeito estimulador da proliferação dos queratinócitos principalmente na fase inicial do processo de re-epitelização, corroborando os resultados obtidos na análise da migração celular para quatro dias de tratamento.

Tabela 9 – Número de metáfases/mm encontradas na camada basal e supra basal da área re-epitelizada para os dois tratamentos (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base $(\bar{x} \pm dp \text{ [CV\%]})$	Gel com EB $(\bar{x} \pm dp \text{ [CV\%]})$
4	0,6±0,1 [16,67]	0,8±0,1 [12,5]
7	0,92±0,13 [14,17]	0,76±0,09 [11,77]
12	1,62±0,19 [11,87]	1,24±0,17 [13,49]
17	1,42±0,20 [14,43]	1,6±0,17 [10,83]

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

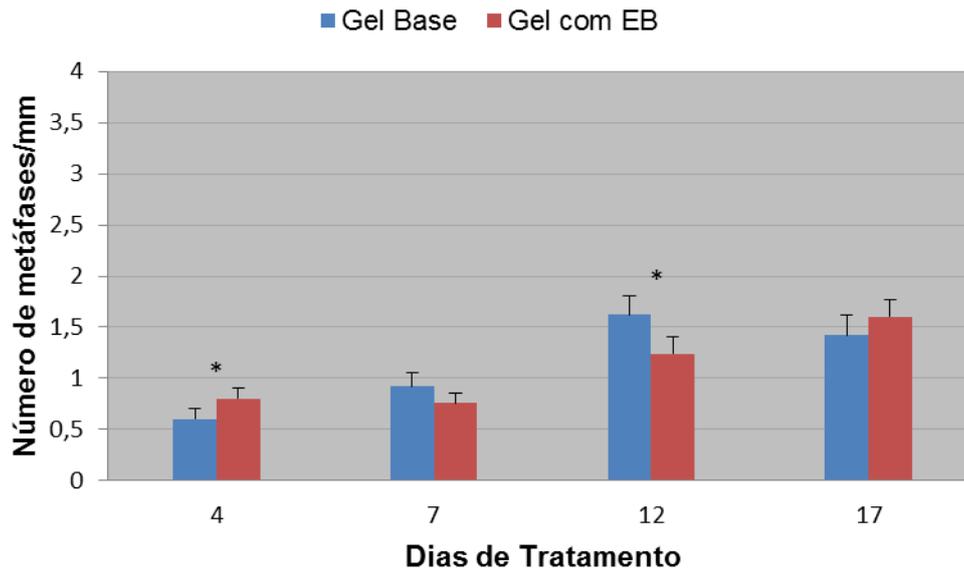


Figura 33 – Representação da média±desvio padrão do número de metáfases contadas na camada basal e suprabasal da área re-epitelizada das feridas com tratamento aos 4, 7, 12 e 17 dias (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.

9.2 AVALIAÇÃO DA FIBROPLASIA

Para avaliação da quantidade de fibras colágenas presente em um tecido, a técnica mais comum é a do picro-Sírius, na qual é empregado o corante Sirius red. O método é específico sendo capaz de detectar e diferenciar os tipos de fibras colágenas, devido sua capacidade de se ligar paralelamente a moléculas de colágeno intensificando a birrefringência normal das fibras, quando visualizadas por microscópio de polarização (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As fibras colágenas tipo I (maduras) são compactas e espessas apresentando birrefringência com coloração amarelo intenso e vermelho, enquanto as fibras colágenas tipo III (jovens) são extremamente finas e frouxas apresentando coloração verde (CUTTLE et al., 2005).

Aos 4 e 7 dias de tratamento não foram observadas fibras tipo III (jovens) (Tabela 10 e Figura 35) no local da ferida.

Aos 12 dias, a área de fibras tipo III foi significativamente maior nas feridas tratadas com gel EB a 1%, comparado às feridas controle ($P < 0,05$). Por outro lado, aos 17 dias houve uma diminuição de fibras tipo III nas feridas tratadas com o gel contendo EB em relação às feridas tratadas com gel base.

A quantidade de fibras colágenas tipo I (maduras) aos 4 dias apresentou-se maior nas feridas tratadas com gel base em relação ao gel contendo EB a 1%. Aos 7, 12 e 17 dias de tratamento, foi observada uma maior área de fibras colágenas tipo I nas feridas tratadas com gel contendo EB a 1%, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) somente aos 17 dias (Tabela 10 e Figura 35).

O fato de não ter sido observado a presença de fibras verdes aos 4 e 7 dias de tratamento em nenhum dos grupos pode ser devido ao tecido inflamatório estar muito intenso (Figura 34). Komesu et al. (2004), em estudos com ratos diabéticos, demonstraram que na fase inicial da cicatrização o processo inflamatório é lento e mais prolongado. Defeitos na fase inflamatória provocam deficiência no crescimento de fibroblastos e síntese de colágeno. Nas feridas diabéticas, o conteúdo de colágeno da pele encontra-se diminuído como um resultado de uma biossíntese reduzida e/ou uma degradação acelerada do colágeno recém sintetizado. A diabetes mellitus é responsável pela deficiência das células de defesa e falhas no tecido de reparação, além de reduzir a secreção de citocinas e fator de crescimento, prejudicando a deposição de colágeno em feridas diabéticas (KOMESU et al., 2004; GUTIERREZ; VARGAS, 2006; AKTUNC et al., 2010).

Nos grupos de 12 e 17 dias observou-se o surgimento de fibras verdes (tipo III), indicando uma neoformação de fibras colágenas. Nas feridas tratadas com o gel contendo EB a 1% pode-se observar que o aumento das fibras tipo III foi gradativo de 12 para 17 dias, ao mesmo tempo que se observou um aumento da quantidade de fibras maduras (tipo I), indicando uma atividade moduladora da fibroplasia deste gel.

Em contrapartida, nas feridas tratadas com gel base, houve um aumento brusco de fibras do tipo III de 12 para 17 dias, enquanto a porcentagem de fibras do tipo I diminuiu, indicando um retardo na maturação das fibras colágenas.

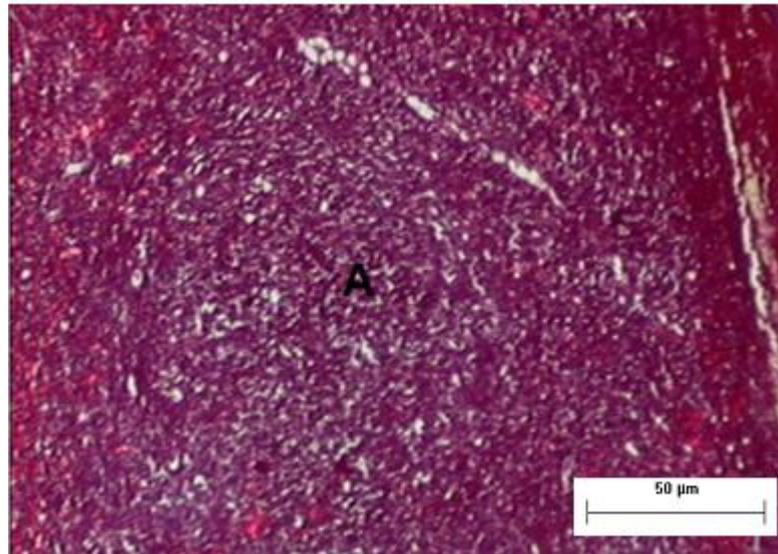


Figura 34 - Corte histológico de pele de rato Wistar, corado pela técnica de picro-Sírius. Captura de imagem de tecido de granulação (A) aos 4 dias de tratamento.

Tabela 10 – Porcentagem de fibras colágenas tipo I e III presentes no gel base e gel com EB aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base Fibras Tipo I (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel Base Fibras Tipo III (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB Fibras Tipo I (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB Fibras Tipo III (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
4	36,1±0,52 [1,44]	0	32,5± 3,67 [11,31]	0
7	34,8±0,55 [1,58]	0	38,1±2,32 [6,09]	0
12	43,3±1,77 [4,09]	1,4±0,22 [16,00]	45,0±3,54 [7,87]	2,0±0,18 [8,98]*
17	26,7±5,94 [22,26]	22,0±2,75 [12,52]	46,2±8,53 [18,45]*	6,9±0,86 [12,53]*

\bar{x} =média; dp=desvio padrão; CV=coeficiente de variação

*(P<0,05) comparado com o gel base

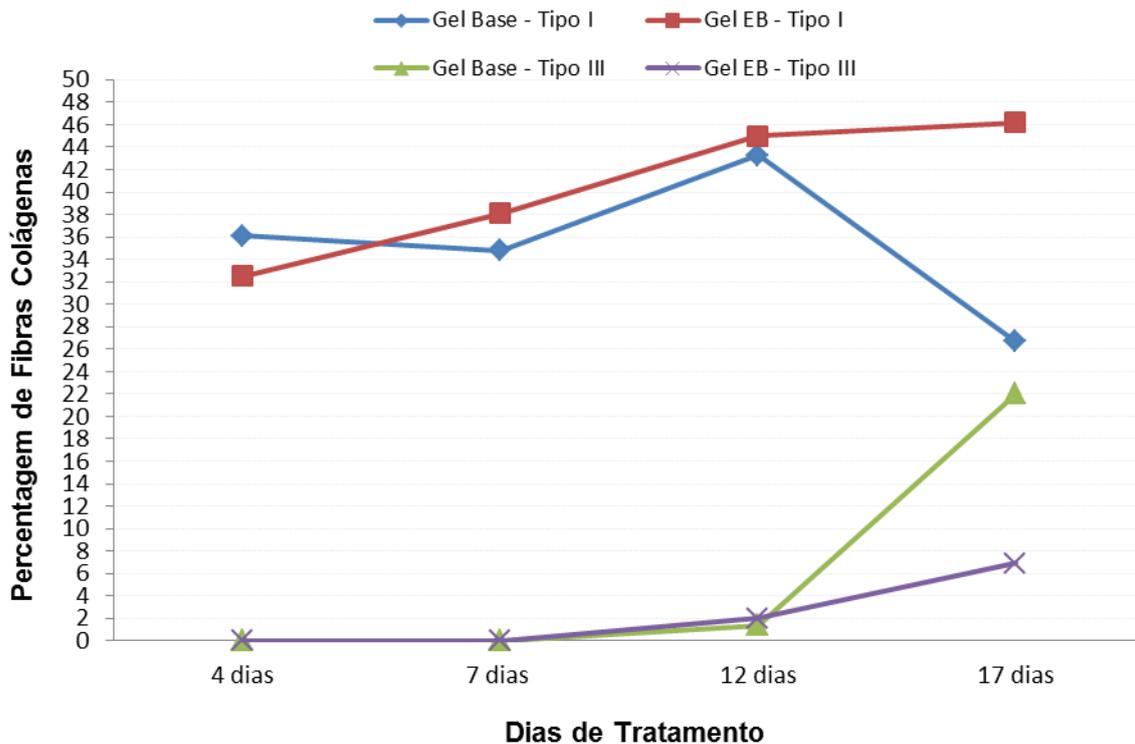


Figura 35 – Percentagem de fibras colágenas tipo III e tipo I aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento (n=5).

A ativação e migração de fibroblastos é intensificada com a presença de macrófagos, derivados de monócitos, onde na fase proliferativa passam a liberar mediadores químicos. Os fibroblastos são células responsáveis pela produção de colágeno para que a matriz extracelular comece a ser substituída por um tecido conjuntivo com resistência e elasticidade, formando o tecido de granulação (BALBINO et al., 2005). Este processo é denominado de fibroplasia e no processo de injúria do tecido encontra-se associado a produção de fibras colágenas jovens (tipo III), com posterior formação de um tecido mais vascularizado e resistente contendo fibras colágenas maduras (tipo I) (GONÇALVES et al., 2010). Na Figura 36 observa-se a substituição de fibras para formar um tecido conjuntivo mais denso e resistente.

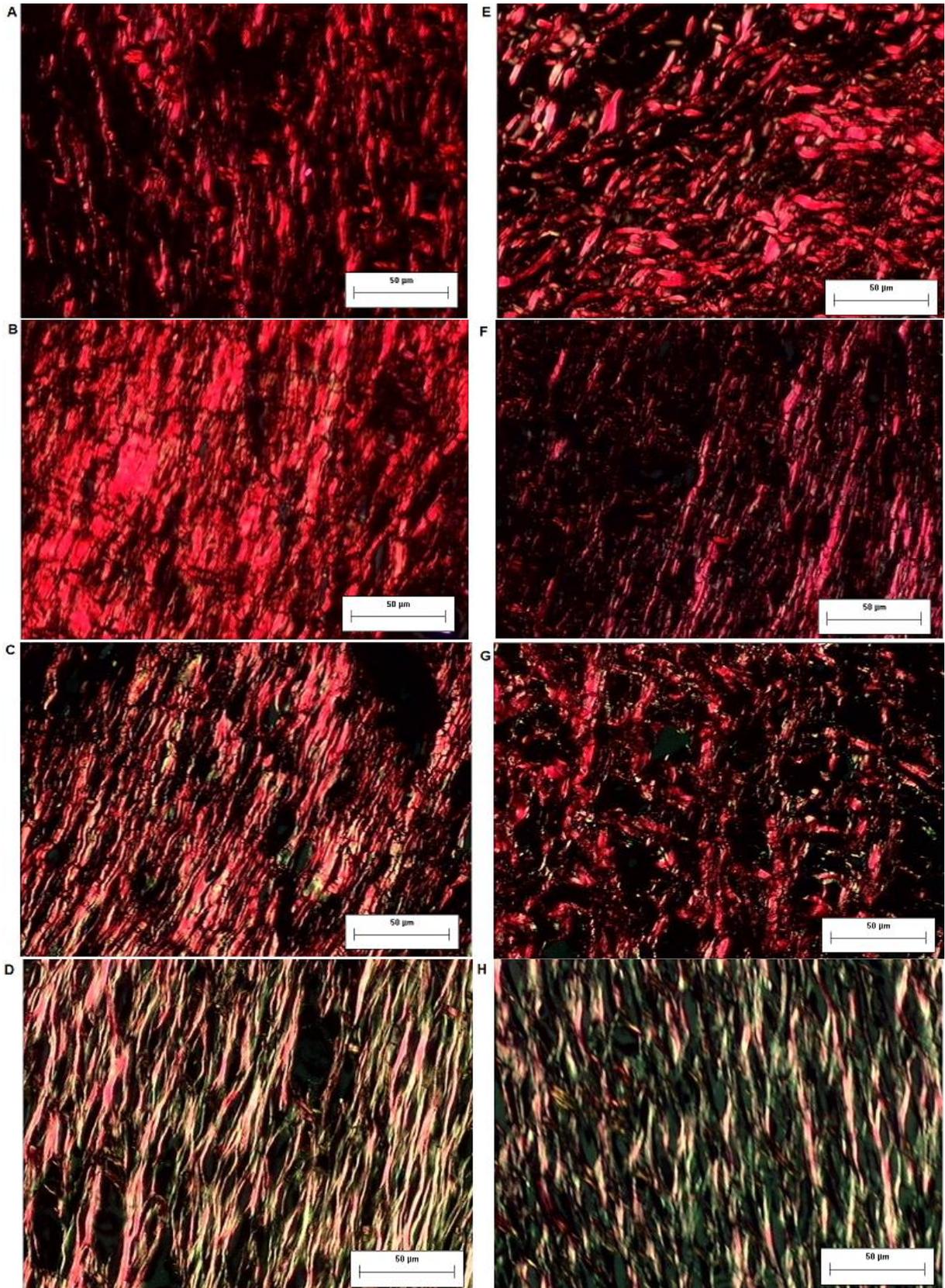


Figura 36 – Fotomicrografia da camada papilar da derme. Fibras colágenas aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento com gel contendo EB a 1% (A-D) e gel base (E-H), respectivamente (n=5).

9.3 ANÁLISE DE WESTERN BLOTTING

As análises de Western Blotting apresentaram resultados tanto para proteínas de alta massa molecular, aproximadamente 120 e 150 kDa, referentes aos receptores VEGFR, quanto para outras formas de menor massa molecular, aproximadamente 45 kDa anticorpo primário anti-VEGFR2 (Figura 37).

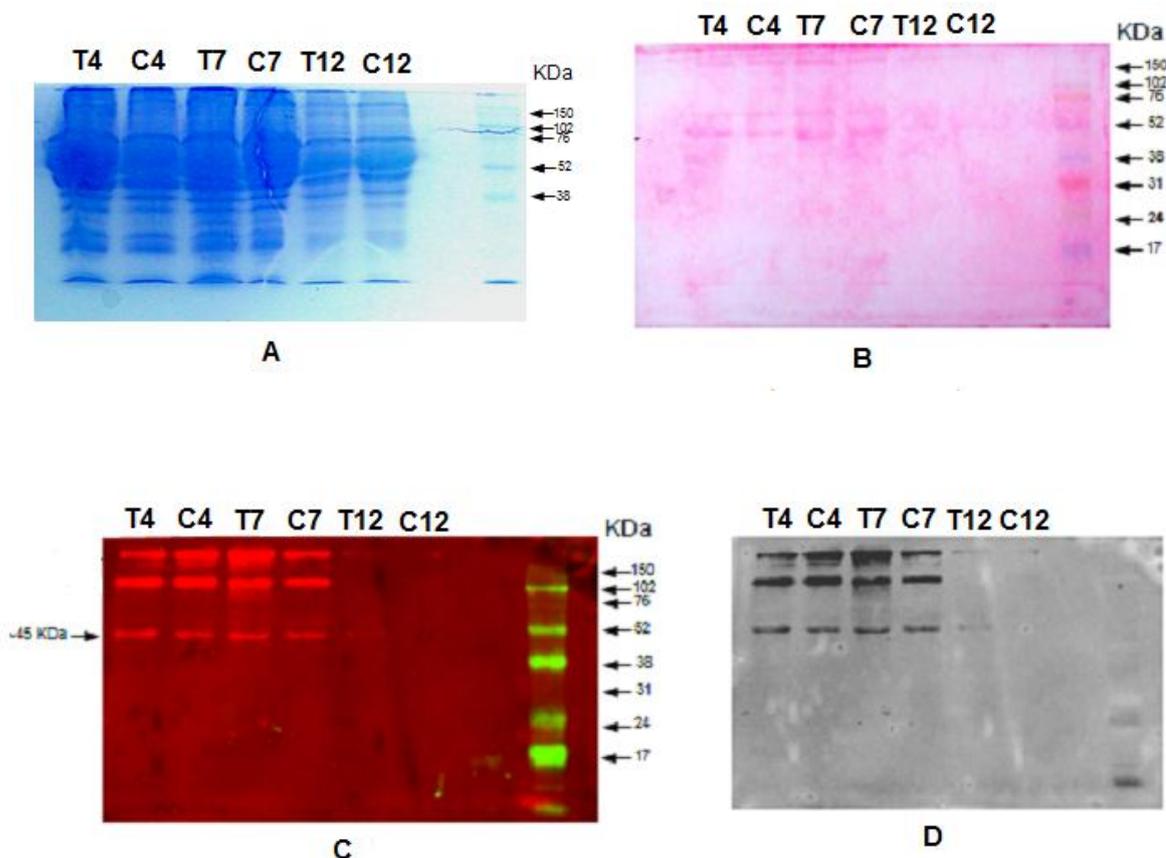


Figura 37 - (A) Gel corado com Comassie blue (B) membrana corada com Ponceau-S, (C) e (D) bandas positivas após detecção com anticorpo primário anti-VEGFR. Detecção positiva das formas de alto peso molecular referente aos receptores VEGFR. T= Tratamento com gel contendo EB e C= tratamento com gel base aos 4, 7 e 12 dias de tratamento.

As proteínas de alta massa molecular detectadas eram esperadas, já que os receptores apresentam massa molecular com o tamanho aproximado aos detectados no experimento. A Figura 37 mostra que estas formas maiores, no 7^o dia, parecem estar menos concentradas no controle quando comparado ao tratamento.

Formas de menor massa molecular também foram detectadas em experimentos complementares onde se utilizou o mesmo material, os mesmos anticorpos e os mesmos parâmetros usados anteriormente. Estas proteínas de menor massa molecular detectadas se apresentam como um grupo de bandas com tamanho molecular de aproximadamente 60

kDa, outro grupo com aproximadamente 45 kDa (Figura 38 B), e um terceiro grupo de bandas com aproximadamente 25 kDa. Já a figura 38 A, corada com Ponceau S mostra as bandas relacionadas às proteínas do padrão, entre 6 a 250 kDa.

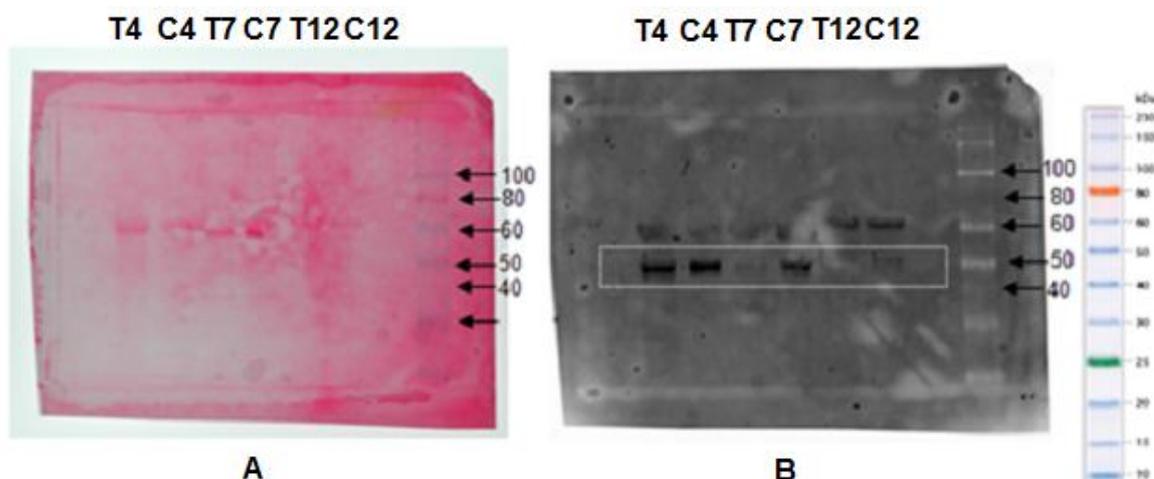


Figura 38 - Membrana de nitrocelulose após transferência submersa das proteínas separadas por SDS-page (10%). (A) membrana corada com Ponceau-S e (B) bandas positivas após detecção com anticorpo primário anti-VEGFR.

As bandas com menor tamanho molecular presentes em alguns géis são provavelmente referentes a proteínas envolvidas no processo de cicatrização, pertencentes à família do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que podem possuir epítomos similares ou complementares aos seus receptores. Dentre estas formas, em *Rattus norvegicus*, encontra-se o VEGF-C com massa molecular aproximada de 46 kDa, o que apresenta tamanho aproximado com um dos grupos de bandas detectado nos experimentos (Figuras 38 B e 39).



Figura 39 - Ampliação da região da banda de 45 kDa da análise de Western Blotting realizada com a pele tratada com o gel contendo EB (T) e pele tratada com gel base (C) em 4, 7 e 12 dias de tratamento.

Pode-se observar na figura 38 B que a proteína obtida a partir da fragmentação de pele tratada tanto com EB (T) quanto com a base (C) diminui significativamente ao longo do tratamento. Quando se compara o tratado com o controle (Figura 38 B), nota-se que a quantidade de proteína no tratado com EB encontra-se menor que no controle aos 4 dias de tratamento, e assim sucessivamente nos demais dias, desaparecendo antes que no controle.

Os resultados observados no experimento demonstrado na figura 39 demonstram claramente que as proteínas de menor peso molecular detectadas estão presentes em menores concentrações nas amostras tratadas com o gel contendo EB a 1% (T) quando comparado as tratadas com o gel base (C), especialmente após 7 dias de tratamento. Estes resultados indicam que o processo de neovascularização encontra-se mais acelerado nos animais tratados, estando de acordo com resultados das demais análises realizadas durante este experimento, e parecem indicar que as lesões quando tratadas com o gel contendo o extrato bruto do barbatimão apresentam um processo de cicatrização mais acelerado. Este fato pode ser observado clinicamente nos animais, onde o processo de cicatrização apresenta-se acelerado no grupo tratado. Assim, as proteínas envolvidas em diferentes etapas do processo se mostram em menores concentrações no decorrer do experimento como demonstram os resultados acima.

Sabe-se que a família VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e suas isoformas) participa ativamente do processo de cicatrização aumentando a permeabilidade vascular e a angiogênese, que envolve a formação de novos vasos a partir da proliferação mitótica das células endoteliais vasculares (DVORAK, 2005).

A quantidade de VEGF encontrada na análise pode ser explicada através do processo fisiológico que ocorre no local da lesão. Após a injúria, inicia-se um processo de homeostasia que gera sangramento e dano microvascular, ativando a cascata de coagulação e recrutando células para o local da injúria. Estas células liberam substâncias que atuam na vasodilatação e conseqüentemente no extravasamento de plasma e proteínas para dentro da ferida permitindo a entrada de células no local. Dentre estas células encontram-se as plaquetas e os monócitos que liberam o VEGF no coágulo (BATES; JONES, 2003; TANG et al., 2004). A formação do coágulo de fibrina é uma estrutura básica para a cicatrização da ferida e permite a migração das células efectoras. O aumento da permeabilidade vascular induzida pelas aminas vasoativas, mediadores inflamatórios e pela família VEGF reduz o fluxo de sangue para os tecidos, resultando em hipóxia do tecido e conseqüentemente aumento do VEGF. A hipóxia é uma característica de feridas e que leva ao aumento da expressão de RNAm de VEGF nas células endoteliais, responsáveis pela angiogênese (BATES; JONES, 2003). A diferença na quantidade de proteína presente nos grupos T e C pode estar relacionada com o que foi observado macroscopicamente nos

primeiros dias de tratamento. Na figura 40, aos 4 e 7 dias de tratamento, a ferida tratada com gel contendo EB a 1% apresenta-se mais escura (vermelho escuro) que a tratada com gel base (vermelho intenso). No quarto dia observou-se que a ferida T apresentava-se mais firme e seca que a C. Isto se deve ao processo de formação do coágulo que leva a hipóxia.

Esta hipóxia acentuada nas feridas tratadas com gel contendo EB a 1% é observada nos tecidos dos animais aos 4 dias de tratamento (Figura 40 A).

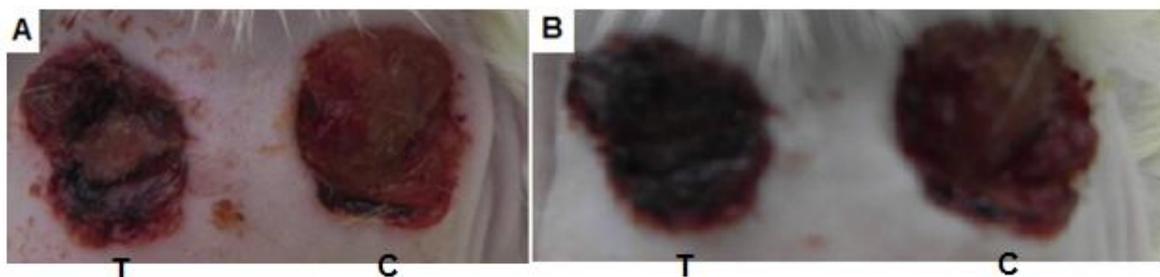


Figura 40 – (A) Ferida aos 4 e (B) 7 dias de tratamento. Ferida tratada com gel contendo EB – lado esquerdo (T) e com gel base – lado direito (C).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos através das análises histológicas realizadas, sugerindo que as feridas tratadas com gel contendo EB apresentam um processo de cicatrização acelerado já que a regeneração do tecido é evidentemente mais rápida, e o VEGF encontra-se em quantidade mais elevada nos tecidos tratados.

Os resultados obtidos demonstram que o gel contendo extrato de barbatimão atuou positivamente na migração de queratinócitos. Nos animais tratados houve uma migração mais rápida até os 7 dias de tratamento, observada pelo maior comprimento da língua de re-epitelização. Já entre os 12 e 17 dias, a maior espessura da epiderme nos animais tratados reflete uma maior migração celular para as camadas superiores. As maiores diferenças entre os valores dos grupos controle e tratado foram nas fases iniciais (4 dias) e finais (17 dias) do processo de re-epitelização, indicando que o extrato de barbatimão atuou preferencialmente nessas fases.

A dificuldade na cicatrização de feridas em pacientes diabéticos é geralmente devido a macro e micro-angiopatia, assim como a neuropatia.

Em todas as fases do processo de cicatrização da ferida são observadas falhas na sua regulação, tanto em níveis celulares quanto moleculares. Ocorre principalmente diminuição da resposta inflamatória, matriz extracelular, função dos macrófagos, re-epitelização, migração de queratinócitos e fibroblastos e proliferação de quimiocinas e citocinas, bem como produção do fator de crescimento.

Os macrófagos desempenham papel fundamental na cicatrização de feridas na fase inflamatória, no entanto, tem sua função fagocitária comprometida em pacientes diabéticos.

Em feridas de ratos diabéticos que tiveram os macrófagos isolados, foi constatado a redução da capacidade de limpar o tecido necrosado, que juntamente com outros fatores, prolongam a fase inflamatória, dificultando as fases subsequentes da cicatrização da ferida (RAFEHI et al., 2011).

Em pacientes diabéticos ocorrem inúmeras anormalidades no tecido conjuntivo, dentre eles a redução da síntese de colágeno, o que pode levar a uma cicatrização imperfeita (GUTIERREZ; VARGAS, 2006).

Estudos mostram que em feridas crônicas existem várias bactérias colonizando o local, sendo mais da metade *Pseudomonas aeruginosa* (52,2%). Além disso, feridas crônicas contendo *P. aeruginosa* apresentam uma área maior, quando comparadas às não infectadas. Este fato ocorre devido a uma inibição ou retardamento do processo de cicatrização (GIΦDSBΦL et al., 2006).

O estudo do processo da cicatrização envolve os aspectos da neoformação tecidual como também a verificação dos efeitos, sejam eles sistêmicos ou tópicos, de fármacos que atuam na evolução deste, verificando-se assim, que medicamentos de uso tópico aceleram o processo de cicatrização por segunda intenção (ROBBINS et al., 1991).

Lee et al. (2011), constataram que a aplicação tópica de células-tronco embrionárias em feridas de ratos diabéticos promove uma melhora na fase inicial da cicatrização. O transplante de células-tronco embrionárias fornece abordagens terapêuticas para o tratamento de feridas diabéticas.

Estudos comprovam as propriedades cicatrizantes de gel de *Aloe vera* L. na cura de feridas em ratos diabetizados, mostrando-se um estimulante da proliferação celular, síntese de colágeno e contração da ferida (CHITHRA et al., 1998). Segundo Gupta et al. (2008), uma formulação com combinação dos extratos de *Hippophae rhamnoides* L., *Aloe vera* L. e *Curcuma longa* L. mostrou aumento da proliferação celular e síntese de colágeno, evidenciando também a angiogênese com a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Hernandes et al. (2010), demonstraram que a aplicação tópica de uma pomada contendo 1% da fração acetato de etila de cascas de *Stryphnodendron adstringens* estimulou a proliferação epitelial, apresentando maior número de mitoses nas feridas.

9.4 ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTANÊA

Para a análise da permeação cutânea através da absorção óptica em espectrofotômetro fotoacústico utilizaram-se as bandas de absorção do barbatimão que servem como indicadores na demonstração da penetração ou não da mesma ao longo das feridas. Assim, o espectro de absorção do extrato bruto de barbatimão quando adicionado

ao gel base apresenta região de absorção em aproximadamente 280 nm, como mostrado na figura 41.

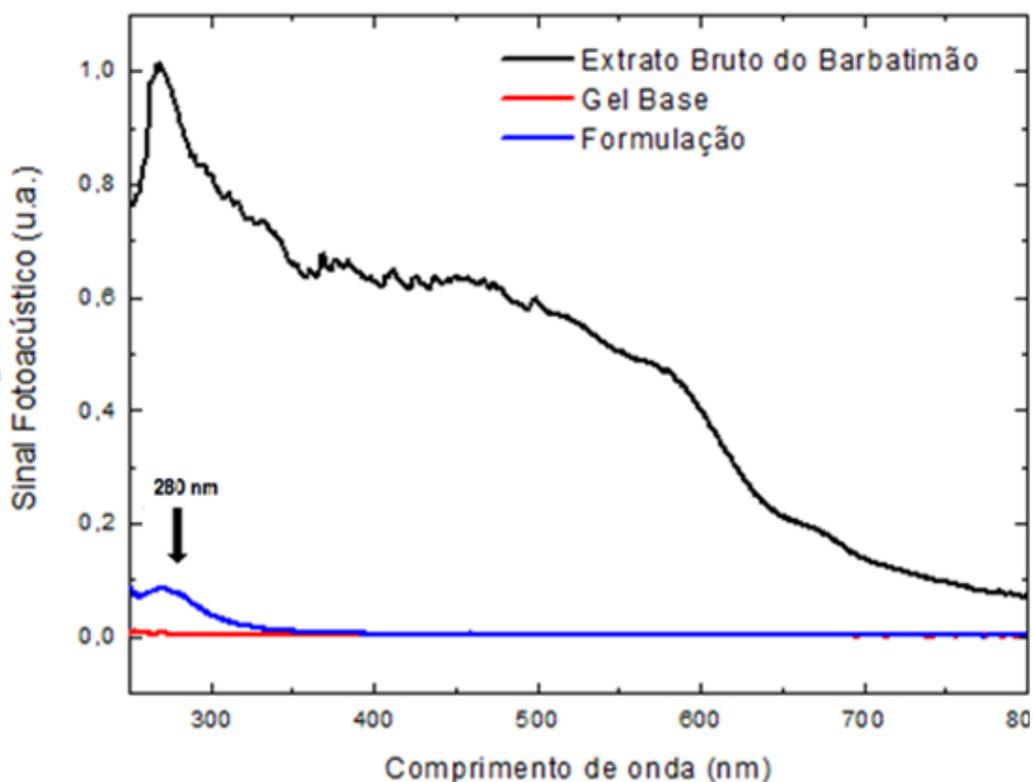


Figura 41 - Espectro de absorção óptica do gel base, EB de barbatimão e gel contendo EB a 1%. As setas indicam a região de absorção do gel contendo EB à 280 nm.

Após 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento dos animais, os dados da permeação foram plotados, referentes aos dias de tratamento, contendo a leitura da absorção do tratamento com gel base e gel contendo EB a 1%, na porção epidermal (lado 1) e porção dermal (lado 2). Ao se comparar os espectros da figura 42 nota-se que a absorção gerada pelo extrato bruto de barbatimão ocorre em comprimentos de onda muito próximos àqueles onde a pele também absorve (entre 260 a 410 nm) (SEHN et al., 2009). Isto dificultou a decomposição do espectro principalmente porque a concentração do EB de barbatimão no gel é muito pequena e assim a intensidade do espectro é determinada majoritariamente pela absorção da pele e do sangue.

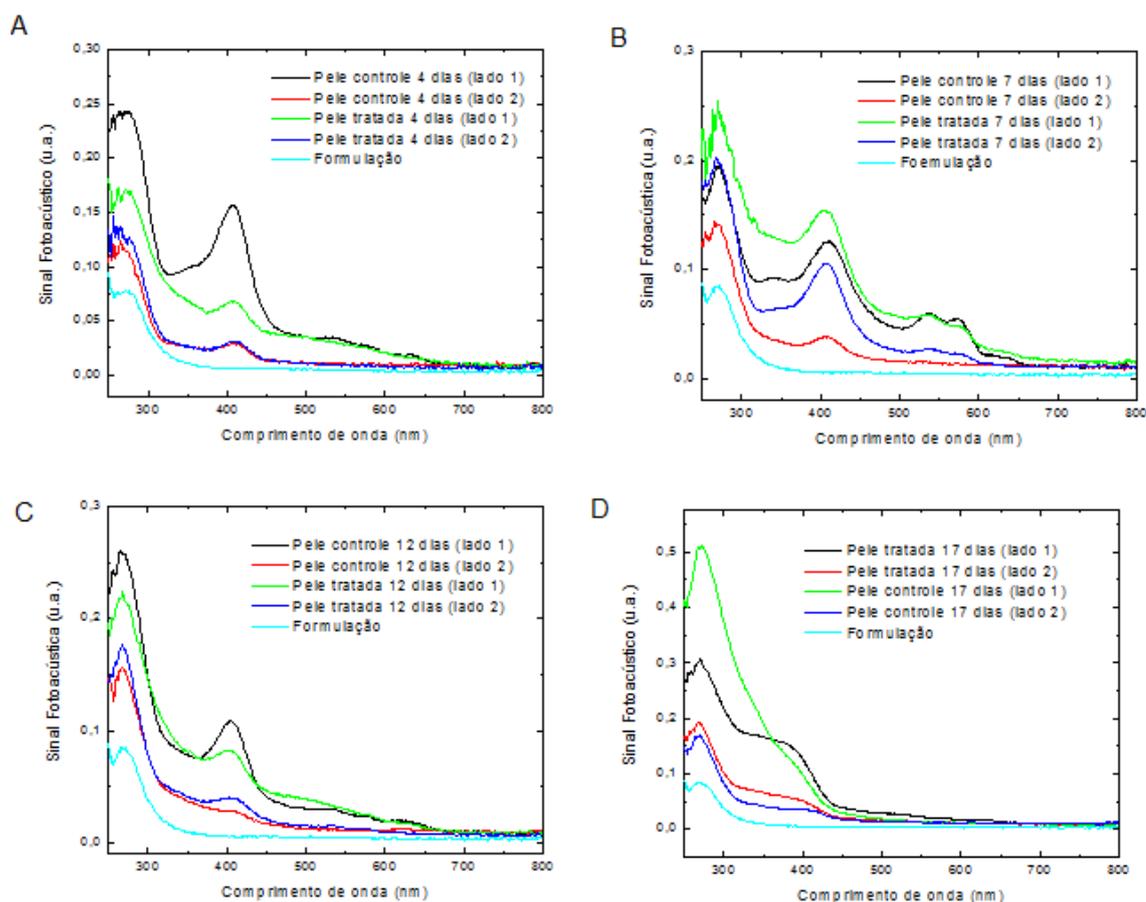


Figura 42 – Espectros de absorção aos 4, 7, 12 e 17 dias (A, B, C e D) de tratamento da ferida com o gel base e o gel contendo EB a 1%, e o gel contendo EB a 1%, sem tratamento (n=2).

Na figura 42 observa-se um pico de absorção em torno de 400 nm, que não foi visto no gel base, EB e gel contendo EB a 1% (Figura 41), que se refere ao sangue remanescente na área lesada (ROCHA et al., 2007). Como logo após o processo de inflamação inicia-se o processo de re-epitelização (Figuras 30 e 31) e a angiôgenese, provavelmente este sangue remanescente seja devido a formação desses novos vasos.

Para melhor visualizar a permeação cutânea nos dias de tratamento utilizou-se da diminuição das curvas da porção dermal (lado 2) referentes ao gel base e ao gel contendo o EB a 1% de barbatimão (Figura 43).

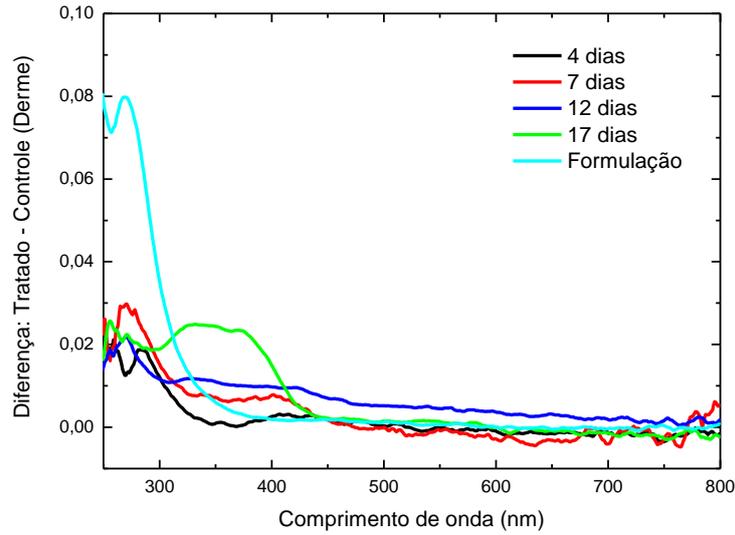


Figura 43 – Diferença dos espectros de absorção do gel contendo EB a 1% e gel base aos 4, 7, 12 e 17 dias de tratamento.

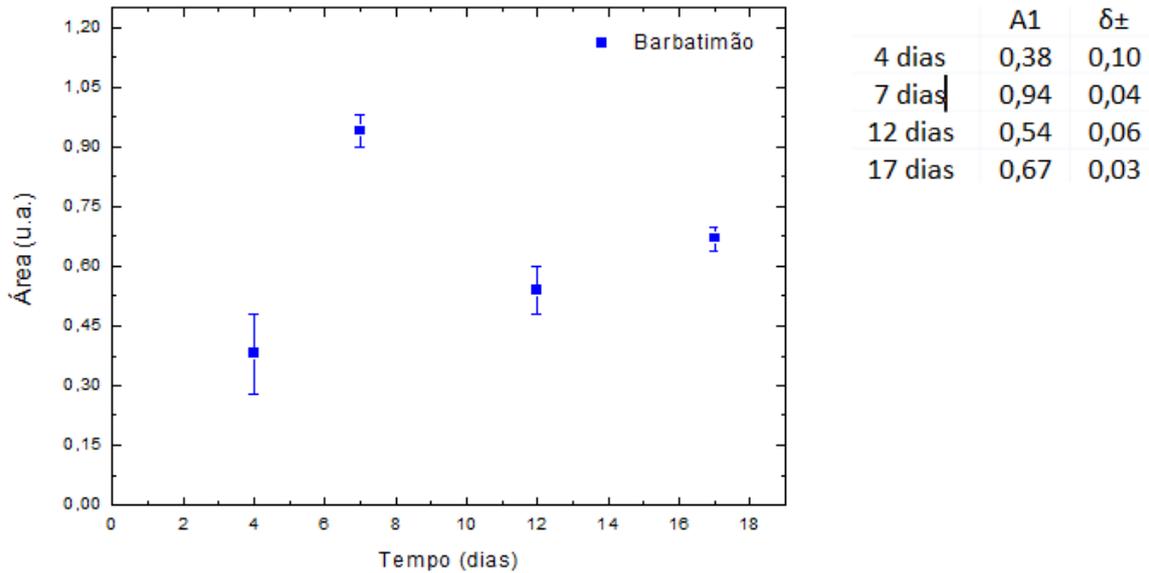


Figura 44 - Comportamento da permeação da formulação contendo 1% do EB.

Aos 4 dias de tratamento com o gel contendo EB a 1% de acordo com a figura 44, observa-se uma menor área de permeação, isto pode ser explicado devido ao processo inflamatório, que possivelmente dificulta a permeação do gel. Aos 7 dias de tratamento houve maior permeação, provavelmente pela presença de pequenos e novos vasos

sanguíneos indicados pela expressão do VEGFR (Figuras 37 e 39) e aos 12 e 17 dias houve uma diminuição devido a deposição de fibras colágenas e formação do epitélio.

10 CONCLUSÃO

O estudo químico de extratos semipurificados das cascas demonstrou que as formas de extração e fracionamento utilizadas foram adequadas ao isolamento de taninos condensados.

Foram isolados e identificados: 4'-O-metil-galocatequina, galocatequina, epigalocatequina e 4'-O-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-O-metil-galocatequina.

A determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH das frações e extrato bruto comprovou que quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra analisada maior é a atividade antioxidante. Assim, o extrato bruto e a fração acetato de etila possuem uma atividade antioxidante cerca de 1,3 e 1,5 vezes maior que a vitamina C, respectivamente.

A avaliação da atividade cicatrizante mostrou que o extrato bruto de *Stryphnodendron adstringens* possui ação sobre o reparo tecidual, apresentando condições que favorecem uma cicatrização mais rápida. As condições observadas são a permeação cutânea do EB a 1% de *Stryphnodendron adstringens*, formação de uma maior área re-epitelizada aos 4 e 7 dias de tratamento e mais espessa aos 17 dias de tratamento com maior número de metáfases aos 4 e 17 dias de tratamento, além de estimular a maturação das fibras colágenas e aumento da vascularização nos primeiros dias de tratamento. A análise por Western Blotting comprova a maior presença de vasos sanguíneos aos 7 dias pela expressão em grande quantidade de VEGFR, tanto de proteínas de baixa como de alta massa molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGREN, M.S. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. *Archives of Dermatological Research*, v.291, p.583-590, 1999.
- ALCANTARA, P.Jr. Espectroscopia molecular, 2002 apud SEHN, E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMANIA E. de FATIMA A.; SMANIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- AMARAL, C.F.S.; PEDROSO, E.R.P.; FONSECA, J.G.M.; ROCHA, M.O.C.; COUTO, R.C.; LEAL, S.S.; BRAGA, W.R.C. *Enciclopédia da Saúde - Diabetes Mellitus*, v.3, p.341-347, 2001.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, v.84, p.551-562, 2004.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyifolia* A. Cunn. Ex G.Don, Leguminosae-Mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.231-235, 2007.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.
- AKTUNC, E.; OZACMAK, V.H.; BARUT, F.; BUYUKATES, M.; KANDEMIR, O.; DEMIRCAN, N. N-acetyl cysteine promotes angiogenesis and clearance of free oxygen radicals, thus improving wound healing in an alloxan-induced diabetic mouse model of incisional wound. *Clinical and Experimental Dermatology*, v.35, p. 902-909, 2010.
- AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.V.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; ALVES, W.; CUMAN, R.K.N.; BERSANI-AMADO, C.A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, v.13, p.264-266, 1999.
- AUDI, E.A.; TOLEDO, C.E.M.; SANTOS, F.S.; BELLANDA, P.R.; ALVES-DO-PRADO, W.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V.; SAKURAGUI, C.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; MELLO, J.C.P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v.23, p.328-333, 2004.
- BALAS, L.; VERCAUTEREN, J. Extensive high-resolution reverse 2D NMR analysis for the structural elucidation of procyanidin oligomers. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.32, p.386-393, 1994.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.

- BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M.; EHRLICH, H.P.; BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, v.153, p.347–358, 2009.
- BARBOSA, R.B.; BARCELÓ, A.; MACHADO, C.A. Campanha nacional de detecção de casos suspeitos de diabetes mellitus no Brasil: relatório preliminar. *Revista Panamericana de Salud Pública*, v.10, n.5, p.324-327, 2001.
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, p.113-123, 2006.
- BARTOLI, M.; GU, X.; TSAI, N.T.; VENEMA, R.C.; BROOKS, S. E. MARRERO, M.B.; CALDWELL, R.B. Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p.33189–33192, 2000.
- BATES, D.O.; JONES, R.O.P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, v.2, p.107-120, 2003.
- BATES, D.O. Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular Research*, v.6, p.83-96, 2010.
- BHATTACHARYA, R.; KANG-DECKER, N.; HUGHES, D.A.; MUKHERJEE, P.; SHAH, V.; McNIVEN, M.A.; MUKHOPADHYAY, D. Regulatory role of dynamin-2 in VEGFR-2/ KDR-mediated endothelial signaling. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v.19, p.1692-1694, 2005.
- BELTRAME, F.L. Caracterização de duas espécies vegetais (*Trichilia catigua* e *Anemopaegma arvense*) usadas como “catuaba” por métodos cromatográficos hifenados a métodos espectroscópicos e análise multivariada. 2005. 153f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2005.
- BERSANI-AMADO, C.A.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J.C.P. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p.14, 1996.
- BEZERRA, J.C.B.; SILVA, I.A. FERREIRA, H.D.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian cerrado medicinal plants. *Fitoterapia*, v.73, p.428-430, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976. apud MAGALHÃES, C.S.; ARRUDA, M.A.Z. Sample preparation for metalloprotein analysis: a case study using horse chestnuts. *Talanta*, v.71, p.1958-1963, 2007.
- BURKILL, H.M. The useful plants of west tropical Africa, v.4. 2.ed. *Royal Botanic Gardens Kew*, p.88-134, 1997.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.33, n.2, p.179-189, 2000.

- CARVALHO, E.B. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. 2007. Tese (Doutorado em Química), Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2007.
- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. *Compostos fenólicos simples e heterosídicos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, cap.20, p.433-449, 2004.
- CARVALHO, S.S. Análise fotoacústica da cinética de penetração do fármaco *Cordia verbenacea* DC. (acheflan) na pele humana (massagem versus fonoforese). 2010. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2010.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.59, p.179-186, 1998.
- CLARK, R.A. The molecular and cellular biology wound repair. New York: Plenum Press, 2nd ed., 1996.
- COMIN, D.; GAZARINI, L.; ZANONI, J.; MILANI, H.; OLIVEIRA, R.M.W. Vitamin E improves learning performance and changes the expression of nitric oxide-producing neurons in the brains of diabetic rats. *Behavioural Brain Research*, v. 210, p.38-45, 2010.
- CORK, S.J.; KROCKERBERGER, A.K. Methods and pitfalls of extracting condensed tannins and other phenolics from plants: insights from investigations on *Eucalyptus* leaves. *Journal of Chemical Ecology*, v.17, p.123-134, 1991.
- CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Rheologic behavior of different hydrophylic gels. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.73-78, 2005.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia*. Lisboa: Editora Calouste Gilbenkian, 2002.
- COSTA, C.R.L.M.; BARJA, P.R.; VIEIRA, D.J.D. Proposta de caracterização fotoacústica ao nível de oleosidade da pele. *Revista Varia Scientia*, v.8, n.14, p.67-80, 2007.
- CRONQUIST, A. The evolution and classification of flowering plants. 2.ed., New York: *The New York Botanical Garden*, 1988, p. 261
- CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M. Collagen in the sacrless fetal skin wound: detection with picosirius-polarization. *Wound Repair and Regeneration*, v.13, p.198-204, 2005.
- DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of picosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, v.93, p.27-29, 1989.
- DVORAK, H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, v.20, p.4368-4380, 2002.

- DVORAK, H.F. Angiogenesis: update 2005. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v.3, p.1835-1842, 2005.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, v.2, p.669-673, 2010.
- FELIPE, A.M.M.; RINCÃO, V.P.; BENATI, F.J.; LINHARES, R.E.C.; GALINA, K.J.; TOLEDO, C.E.M.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.6, p.1092-1095, 2006.
- FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. *European Journal of Cancer*, v.3, p.2413-2422, 1996.
- FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nature Reviews Cancer*, v.2, p.795-803, 2002.
- FERRARA, N.; ALITALO, K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Natural Medicine*, v.5, p.1359-1364, 1999. apud GONÇALVES, S.B. Efeito da angiogênese pulpar e na apoptose. 2006. 153f. Tese (Doutorado), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.
- FERRARA, N.; GERBER, H.P.; LeCOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. *Natural Medicine*, v.9, p.669-676, 2003. apud GONÇALVES, S.B. Efeito da angiogênese pulpar e na apoptose. 2006. 153f. Tese (Doutorado), Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 2006.
- FERREIRA, F.B.; BURITY, C.H.F.; PISSINATTI, A. Histologia do tegumento em *Cebus robustus* (SILVA JR., 2001) e *Cebus xanthosternos* (WIED-NEUWIED, 1826): cativos, Cebidae-Primates. *Saúde & Ambiente em Revista*, v.2, p.50-67, 2007.
- FERRI, M.G. Plantas do Brasil: espécies do cerrado. São Paulo: Edgard Blucher, p.192, 1969.
- FLETCHER, A.C.; PORTER, L.J.; HASLAM, E.; GUPTA, R.K. Plant proanthocyanidins. Part 3. Conformational and configurational studies of natural procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction. I*, p.1628-1637, 1977.
- FOLKMAN, J.; BREM, H. Angiogenesis and inflammation. In: GALLIN, J.; GOLDSTEIN, I.; SNYDERMAN, R., Eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, p.821-839, 1992. apud BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M.; EHRLICH, H.P.; BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, v.153, p.347-358, 2009.
- FREITAS, P.G. Aplicação da espectroscopia óptica para diagnóstico e análise de compostos biológicos. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Catequine, andere Hydroxy-flavane und Hydroxy-flavene. *Fortschritte der Chemie Organischen Naturstoffe*, v.16, p.1-25, 1958.

- FREUNDENBERG, K.; WEINGES, K. Systematik und Nomenklatur der Flavonoide. *Tetrahedron*, v.8, p.336-349, 1960.
- GALIANO, R.D.; TEPPER, O.M.; PELO, C.R.; BHATT, K.A.; CALLAGHAN, M.; BASTIDAS, N.; BUNTING, S.; STEINMETZ, H.G.; GURTNER, G.C. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology*, v.164, p.1935-1947, 2004.
- GARCIA, J.; MASSOMA, T.; MORIN, C.; MPONDO, T.N.; NYASSÉ, B. 4'-O-methylgallo catechin from *Panda oleosa*. *Phytochemistry*, v.32, p.1626-1628, 1993.
- GJΦDSBΦL, K.; CHRISTENSEN, J.J.; KARLSMARK, T.; JΦRGENSEN, B.; KLEIN, B.M.; KROGFELT, K.A. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *International Wound Journal*, v.1, p.1-2, 2006.
- GONÇALVES, R.V.; MEZÊNCIO, J.M.S.; BENEVIDES, G.P.; MATTA, S.L.P.; SARANDY, M.M.; VILELA, E.F. Effects of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.43, p.350-355, 2010.
- GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sciences*, v.78, p.803-811, 2006.
- GÜLÇİN, I.; HUYUT, Z.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of acid. *Arabian Journal of Chemistry*, v.3, p.43-53, 2010.
- GUPTA, A.; UPADHYAY, N.K.; SAWHNEY, R.C.; KUMAR, R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, v.16, p.784-790, 2008.
- GUTIERREZ, R.M.P.; VARGAS, R.S. Evaluation of the wound healing properties of *Acalypha langiana*. *Fitoterapia*, v.77, p.286-289, 2006.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *International Journal of Pharmaceutics*, v.224, p.1-18, 2001.
- HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London: Chapman & Hall. 3.ed. 1998.
- HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal*, v.139, p.285-288, 1974.
- HASLAM, E.; HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall, v.9, p.505-560, 1975.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *Journal of Natural Products*, v.59, p.205-215, 1996.
- HASLAM, E. *Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge: Cambridge University Press. 1.ed., p.10-83, 1998.

- HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.38, p.717-720, 1990.
- HATTORI, K.; HEISSIG, B.; WU, Y.; DIAS, S.; TEJADA, R.; FERRIS, B.; HICKLIN, D.J.; ZHENPING, Z.; BOHLEN, P.; WITTE, L.; HENDRIKX, J.; HACKETT, N.R.; CRYSTAL, R.G.; MOORE, M.A.S.; WERB, Z.; LYDEN, D.; RAFIL, S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1+ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature Medicine*, v.8, p.841-849, 2002, apud LUCENA, D.; YAMANE, R. Antiangiogênicos no glaucoma. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.67, p.313-320, 2008.
- HEYWOOD, V.H. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press: New York, p.335, 1993.
- HERNANDES, L.; PEREIRA, L.M.S.; PALAZZO, F.; MELLO, J.C.P. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.46, n.3, p.432-436, 2010.
- HERZOG-SOARES, J.D.; ALVES, R.K.; ISAC, E.; BEZERRA, J.C.B.; GOMES, M.H.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista Brasileira Farmacognosia*, v.12, p.1-2, 2002.
- HELSPER, J.P.F.G.; KOLODZIEJ, H.; HOOGENDIJK, J.M.; VAN NOREL, A. *Characterization and trypsin inhibitor activity of proanthocyanidins from Vicia faba*. *Phytochemistry*, v.34, n.5, p.1255-1260, 1993.
- HESS, C.T. *Tratamento de feridas e úlceras*. Ed. Reichmann & Affonso 4. ed. 2002.
- HOLETZ, F.B.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.4, p.397-401, 2005.
- HUTCHINSON, J. *The genera of flowering plants (Angiosperms)*. Oxford: Oxford University, 1967.
- ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.942-949, 2006.
- ISHIDA, K.; ROZEMAL, S.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on grown, capsule size and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.8, n.29, 2009.
- INFANGER, M.; SCHIMIDT, O.; KOSSMEHL, P.; GRAD, S.; ERTEL, W.; GRIMM, D. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns*, v.30 p.305-311, 2004.

- JAYAPRAKASHA, G.K.; NEGI, P.S.; JENA, B.S.; JAGAN MOHAN RAO, L. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, p.330–336, 2007.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 11^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.
- KHELLADI, Y.B.; MAURIN, O.; HURTER, J.; BANK, M.V.D. The evolutionary history and biogeography of Mimosoideae (Leguminosae): an emphasis on African acacias. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v.57, p.495-508, 2010.
- KOMESU, M.C.; TANGA, M.B.; BUTTROS, K.R.; NAKAO, C. Effects of acute diabetes on rat cutaneous wound healing. *Pathophysiology*, v.11, p.63-67, 2004.
- LAING, T.; HANSON, R.; CHAN, F.; BOUCHIER-HAYES, D. Effect of pravastatin on experimental diabetic wound healing. *Journal of Surgical Research* v.161, p.336–340, 2010.
- LAU, T.W.; CHAN, Y.W.; LAU, C.P.; LAU, K.M.; LAU, C.B.S.; FUNG, K.P.; LEUNG, P.C.; HO, Y.Y. Radix astragali and radix rehmanniae, the principal components of two antidiabetic foot ulcer herbal formulae, elicit viability promoting effects on primary fibroblasts cultured from diabetic foot ulcer tissues. *Phytotherapy Research*, v.23, p.809-815, 2009.
- LEE, K.B.; CHOI, J.; CHO, S.B.; CHUNG, J.Y.; MOON, E.S.; KIM, N.S.; HAN, H.J. Topical embryonic stem cells enhance wound healing in diabetic rats. *Journal of Orthopaedic Research*, v.29, p.1554-1562, 2011.
- LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, v.246, p.1306-1309, 1989; KECK, P.J.; HAUSER, S.D.; KRIVI, G.; SANZO, K.; WARREN, T.; FEDER, J.; CONNOLLY, D.T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, v.246, p.1309-1312, 1989, apud BAO, P.; KODRA, A.; TOMIC-CANIC, M.; GOLINKO, M.; EHRLICH, H.P.; BREM, H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, v.153, p.347–358, 2009.
- LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W.J.; GOEDDEL, D.V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, v.246, p.1306-1309, 1989, apud LUCENA, D.; YAMANE, R. Antiangiogênicos no glaucoma. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.67, p.313-320, 2008.
- LEVY, A.P.; LEVY, N.S.; WEGNER, S.; GOLDBERG, M.A. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*. v.270, p.13333-13340, 1995, apud LUCENA, D.; YAMANE, R. Antiangiogênicos no glaucoma. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.67, p.313-320, 2008.
- LI, X.; ERIKSSON, U. Novel VEGF family members: VEGF-B, VEGF-C and VEGF-D. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v.33, p.421-426, 2001.
- LI, J.; ZHANG, Y.; KIRSNER, R.S. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microscopy research and technique*, v.60, p.107-114, 2003.

- LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; DE SOUZA, P.T.JR. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. *Phytotherapy Research*, v.12, p.218-220, 1998.
- LOPES, G.C.; MACHADO, F.A.V.; TOLEDO, C.E.M.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, p.925-931, 2009.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.265-272, 2005.
- LUCENA, M.N.; MENDES, M.M.; BRANDEBURGO, I.H. Avaliação da estabilidade da pomada à base de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e sua eficácia na neutralização dos efeitos locais induzidos pela peçonha de *Bothrops pauloensis*. *Horizonte Científico*, v.3, n.1, p.2-29, 2009.
- LUCK, G.; LIAO, H.; MURRAY, N.J.; GRIMMER, H.R.; WARMINSKI, E.E.; WILLIAMSON, M.P.; LILLEY, T.H.; HASLAM, E. Polyphenols, adstringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, v.37, n.2, p.357-371, 1994.
- LUIZE, P.S.; TIUMAN, T.S.; MORELLO, L.G.; MAZA, P.K.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; CORTEZ, D.A.G.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p.1-10, 2005.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, n.3, 2002.
- MARTINS, D.T.O.; LIMA, J.C.S.; RAO, V.S.N. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. *Phytotherapy Research*, v.16, p.427-431, 2002.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. review. *Phytochemistry*, v.24, p.639-652, 1985.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Modern separation methods. *Natural Product Reports*, v.8, p.391-413, 1991.
- MELO, J.O.; ENDO, T.H.; BERSANI-AMADO, L.E.; SVIDZINSKI, A.E.; BARONI, S.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences*, v.43, n.3, p.466-469, 2007.
- MELLO, J.C.P. Untersuchung zur Struktur der Flavan-3-ole und Proanthocyanidine aus der *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Mimosaceae). 1995. 263f. Tese (Doutorado), Universidade de Münster, Alemanha, 1995.
- MELLO, J.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v.41, p.807-813, 1996a.

- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v.42, n.3, p.857-862, 1996b.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric prodelphinidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v. 51, p.1105-1107, 1999.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.84, p.257-262, 2009.
- MILMAN, M.H.S.A.; LEME, C.B.M.; BORELLI, D.T.; KATER, F.R.; BACCILI, E.C.D.C.; ROCHA, R.C.M.; SENGER, M.H. Pé diabético: avaliação da evolução e custo hospitalar de pacientes internados no conjunto hospitalar de Sorocaba. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v.45, p.447-451, 2001.
- MORAES, S.P.; CHAVES, F.R.; BANCI, S.; ROVER, P.A.; GEORGETTI, F.; NETO, J.A.R. Zinco e cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias*, v. 27, n.5, p.394-399, 2000.
- MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.315-320, 2009.
- NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.553-556, 2009.
- NG, Y.S.; KRILLEKE, D.; SHIMA, D. T. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*, v.312, p.527-537, 2006.
- NOGAMI, M.; HOSHI, T.; KINOSHITA, M.; ARAI, T.; TAKAMA, M.; TAKAHASHI, I. Vascular endothelial growth factor expression in rat skin incision wound. *Medical Molecular Morphology*, v.40, p.82-87, 2007.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v.52, p.1-31, 1989.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v.32, p.507-521, 1993.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, v.27, p.124-129, 1993.
- PARK, J.E.; KELLER, G.A.; FERRARA, N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Molecular Biology of the Cell*, v.4, p.1317-1326, 1993, apud LUCENA, D.; YAMANE, R. Antiangiogênicos no glaucoma. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v.67, p.313-320, 2008.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, v.187, p.11S-16S, 2004 apud MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.84, p.257-262, 2009.

- PEDROCHI, F. Estudo de sistemas biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*” utilizando a Espectroscopia Fotoacústica. 2004. 96f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.
- PETEREIT, F.; KOLODZIEJ, H.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Cistus incanus*. *Phytochemistry*, v.30, p.981-985, 1991.
- POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H.; STIRTON, C.H. *Evolution and systematics of the Leguminosae*. In: POLHILL, R.M.; RAVEN, P.H. (Ed.) *Advances in legume systematics*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, v.1, p.1-26, 1981.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidante power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.48, p.3396-3402, 2000.
- QIU, Z.; KWON, A-H.; KAMIYAMA, Y. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Surgical Research*, v.138, p.64-70, 2007.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 5.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.
- RATMAN, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHARA, D.K.; KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v.113, p.189-207, 2006.
- RAFEHI, H.; EL-OSTA, A.; KARAGIANNIS, C.T. Genetic e epigenetic events in diabetic wound healing. *International Wound Journal*, v.8, n.1, p.12-21, 2011.
- RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p. 603-613, 2001.
- REBECCA, M.A.; ISHII-IWAMOTO, E.L.; GRESPAN, R.; CUMAN, R.K.N; CAPARROZ-ASSEF, S.M.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, p.101-104, 2002.
- ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. *Patologia estrutural e funcional*. 4.ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, cap.2, p.33-72, 1991.
- ROCHA, J.C.B.; PEDROCHI, F.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P.; BAESSO, M.L. *Ex vivo* evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v.587, p.132-136, 2007.
- ROMPE, P.C.B.; ANJOS, F.H; MARTIN, A.; MANSANARES, A.M; SILVA, E.C; AVALOS, D.A; BARJA, P.R. Characterization of human skin through photoacoustic spectroscopy. *Optical Diagnostics and Sensing IV*, v.5325, p.136-142, 2004.
- SANCHES, A.C.C.; MUNDO, S.R.; SILVA, P.E.R. NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P., NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P.; Pharmacognostic study and antibacterial activity of the stem bark extract *Stryphnodendron obovatum* Benth, Leguminosae. *Revista Fitoterapia*, v.2, n.1, p.301, 2002.

- SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.1-7, 2005.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. *Taninos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap.24, p.517-544.
- SANTOS, V.R.; GOMES, R.T.; OLIVEIRA, R.R.; CORTÉS, M.E.; BRANDÃO, M.G.L. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). *International Journal of Dentistry*, v.8,p.1-5, 2009.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v.91, p.21-40, 2001.
- SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxicologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.
- SEHN, E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. 2006. 56f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S.L.; GONÇALVES, C.C.M.; BAESSO, M.L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Analytica Chimica Acta*, v.635, p.115-120, 2009.
- SENGER, D.R.; CONNOLLY, D.T.; WATER, L.V.; FEDER, J.; DVORAK, H.F. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Research*, v.50, p.1774-1778, 1990, apud NG, Y.S.; KRILLEKE, D.; SHIMA, D.T. VEGF function in vascular pathogenesis. *Experimental Cell Research*, v.312, p.527-537, 2006.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- SOARES, S.P.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microorganismos da cárie dental. *Revista Odonto Ciência*, v.23, p.141-144, 2008.
- SOUZA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

- TANG, K.; BREEN, E.C.; WAGNER, H.; BRUTSAERT, T.D.; GASSMANN, M.; WAGNER, P.D. HIF and VEGF relationships in response to hypoxia and sciatic nerve stimulation in rat gastrocnemius. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v.144, p.71–80, 2004.
- TOLEDO, C.E.M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Covile, Leguminosae. 2002. 92f Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP, Araraquara, 2002.
- THOMPSON, R.S.; JACQUES, D.; HASLAM, E.; TANNER, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part 1. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transaction I*, p.1387-1399, 1972.
- TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, n.2, p.290-306, 2006.
- VIEIRA, F.C.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Cicatrização cutânea em feridas de ratos após aplicação tópica de pomadas de barbatimão e nebacetin. In: *Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Águas de Lindóia-SP, Resumos*, p.15, 1998.
- VICENTE, S.J.V. Caracterização antioxidante do café (*Coffea arabica* L.) e efeitos da sua administração oral em ratos. 2009. ???f. Tese (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2009.
- VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia de DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.384-387, 2007.
- WANG, W.; LIN, S.; XIAO, Y.; HUANG, Y.; TAN, Y.; CAI, L.; LI, X. Acceleration of diabetic wound healing with chitosan-crosslinked collagen sponge containing recombinant human acidic fibroblast growth factor in healing-impaired STZ diabetic rats. *Life Sciences*, v.82, p.190-204, 2008.
- WEINGES, K.; BÄHR, W.; EBERT, W.; GÖRITZ, K.; MARX, H.D. Konstitution, Entstehung und Bedeutung der Flavonoid-Gerbstoffe. *Fortschritte der Chemie Organischer Natursturstoffe*, v.27, p.158-260, 1969.
- YAN, X.; CHEN, B.; LIN, Y.; LI, Y.; XIAO, Z.; HOU, X.; TAN, Q.; DAI, J. Acceleration of diabetic wound healing by collagen-binding vascular endothelial growth factor in diabetic rat model. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.90, p.66-72, 2010.
- ZANONI, J.N.; BUTTOW, N.C.; BAZOTTE, R.B.; NETO, M.H.M. Evaluation of the population of NADPH-diaphorase-stained and myosin-V myenteric neurons in the ileum of chronically streptozotocin-diabetic rats treated with ascorbic acid. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, v.104, p.32–38, 2003.

ANEXO 1



Universidade Estadual de Maringá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Condução Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em: 2 /2 /2010 Parecer nº 141/2010

Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello Setor: DFF

Título: Protocolo nº 056/2009

Caesalpinia peltophoroides e Stryphnodendron adstringens: Análise fitoquímica, tecnológica e biológica in vitro e in vivo

Entrada: 18/11/2009 Início: 1/12/2009 Término: 30/11/2011

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e aprovação do relatório final.

Considerações e Parecer:

Em 16.12.2009 foi protocolado a resposta a este parecer (119/2009-CEAE).

Considerando que os autores esclarecem todas as dúvidas, sou de parecer favorável a aprovação do mesmo.



Dr. Vânia Antunes
Presidente do CEAE/UEM

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado