



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**Departamento de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**



***Poincianella pluviosa*: ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR E  
PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS *IN*  
*VITRO*, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS  
DIABÉTICOS E NORMOGLICÊMICOS**

**FERNANDA GIACOMINI BUENO**

Tese apresentada por ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello

**Maringá, 2014**

**FERNANDA GIACOMINI BUENO**

***Poincianella pluviosa*: estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos *in vitro*, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos**

Tese apresentada por ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Co-Orientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello

**Maringá, 2014**

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

B928p Bueno, Fernanda Giacomini, 1982-  
*Poincianella pluviosa* : estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos in vitro, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos / Fernanda Giacomini Bueno. -- Maringá, 2014.  
102 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eneir Vieira de Souza Leite Mello.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em em Ciências Farmacêuticas, 2014.

1. *Poincianella pluviosa* - Atividade cicatrizante. 2. *Poincianella pluviosa* - Viabilidade e proliferação - Queratinócitos e fibroblastos in vitro. 3. Cicatrização de feridas in vivo. 4. Normoglicêmicos - *Poincianella pluviosa* - Atividade cicatrizante. 5. Diabéticos - *Poincianella pluviosa* - Atividade cicatrizante. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Mello, Eneir Vieira de Souza Leite, coorint. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.32

GV5-001918

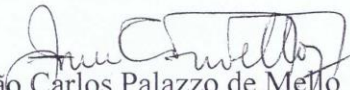
**FERNANDA GIACOMINI BUENO**

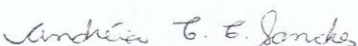
***POINCIANELLA PLUVIOSA: ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR  
E PROLIFERAÇÃO DE FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS *IN*  
VITRO, E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS  
DIABÉTICOS E NORMOGLICÊMICOS***

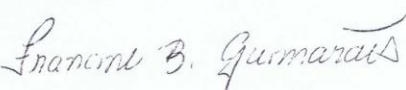
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 05 de dezembro de 2014

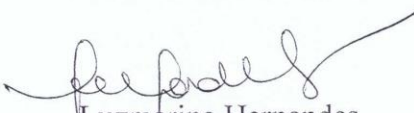
**BANCA EXAMINADORA**

  
João Carlos Palazzo de Mello  
Universidade Estadual de Maringá

  
Andréia Cristina Conegero Sanches  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

  
Francine Baesso Guimarães  
Universidade Estadual de Maringá

  
João Ernesto de Carvalho  
Universidade Estadual de Campinas

  
Luzmarina Hernandes  
Universidade Estadual de Maringá

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Farmacêutica - Palafito (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), no Laboratório de Histologia (Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello), no Laboratório de Física (Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso) e empregando também equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá. Uma parte do experimento foi complementado durante seis meses de doutorado sanduíche realizado no Institut of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry, Münster, Alemanha sob orientação do Professor Dr. Andreas Hensel. Agradecimentos ao CNPq e ao Programa Ciências sem Fronteiras pela bolsa de estudos no país e no exterior e apoio financeiro fornecidos para o desenvolvimento deste trabalho.**

“Desejo que você: Não tenha medo da vida, tenha medo de não vivê-la. Não há céu sem tempestades, nem caminhos sem acidentes. Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo. Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la. Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência. Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina, pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas. Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama”.

*August Curry*

## BIOGRAFIA



Fernanda Giacomini Bueno nasceu em Toledo, PR, no dia 26 de novembro de 1982. Em 1999, concluiu o ensino médio no Colégio La Salle. Em 2003 iniciou o curso de Farmácia Generalista pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná e neste período foi bolsista pelo CNPq e Fundação Araucária. Participou de diversos projetos e grupos de pesquisa. Recebeu Prêmio de Menção Honrosa no EAIC – Encontro Anual de Iniciação Científica (2007) devido a projeto desenvolvido na Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Realizou estágio curricular no Centro de Estudos Biofarmacêuticos – Biocinese na área de Equivalência Farmacêutica, formando-se em 2008. Permaneceu no mesmo centro como Responsável Técnica Substituta no período de 2008 a 2009. Iniciou em 2009 o curso de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello no Laboratório de Biologia Farmacêutica - Palafito finalizando em 2010. Foi professora assistente na Faculdade Ingá entre 2010 e 2011. Ainda em 2010, iniciou o doutorado no mesmo programa sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello com a Co-orientação da Profa. Dra. Eleri Vieira de Souza Leite Mello. Em 2012 realizou uma parte experimental (doutorado sanduíche pelo Programa Ciências sem Fronteiras) no Institut für Pharmazeutische Biologie and Phytochemie, Münster, Alemanha sob orientação do Professor Dr. Andreas Hensel. Atualmente é professora colaboradora da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

## RESUMO

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que devido a doenças como o diabetes *mellitus* pode ser prejudicado. Devido aos elevados custos e diminuição da qualidade de vida das pessoas, a busca de novas drogas para acelerar o processo de cura tem se destacado. Este trabalho objetivou avaliar a atividade cicatrizante do extrato bruto (EB) de *Poincianella pluviosa* e suas subfrações em um modelo de estudo bioguiado *in vitro*, assim como sua ação em feridas cutâneas de ratos normoglicêmicos e diabéticos. No estudo bioguiado *in vitro* foi avaliada a viabilidade e proliferação celular de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (pNDHF), e a fração com atividade foi caracterizada por  $^{13}\text{C}$  RMN de sólidos e LC-MS/MS. A atividade cicatrizante em ratos normoglicêmicos foi avaliada aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel contendo 1% do EB através do comprimento e espessura da superfície re-epitelizada, da análise de permeação cutânea pela técnica de espectroscopia fotoacústica (PAS), da quantidade de células em metáfases, e fibras colágenas (tipo I e III) e da quantificação de proteínas (fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), ciclooxigenase 2 (COX-2) e superóxido dismutase 2 (SOD-2)). A atividade cicatrizante em ratos diabéticos foi avaliada aos 4, 7, 10, 14 e 21 dias com o mesmo gel através da determinação do comprimento e espessura da superfície re-epitelizada e também pela quantificação de proteínas. Os estudos *in vitro* mostraram que o EB e a subfração FC1 estimularam a atividade mitocondrial em ambos os tipos de células e a proliferação de queratinócitos. A caracterização da subfração FC1 mostrou a presença de polifenóis e taninos hidrolizáveis. A avaliação da ação do gel contendo 1% de EB em ratos normoglicêmicos mostrou migração de queratinócitos no dia 4 e sua proliferação nos dias seguintes, com uma quantidade significativamente ( $p > 0.005$ ) aumentada de células em metáfase aos 7 dias de tratamento. As fibras colágenas do tipo I foram formadas mais rapidamente no tratamento com EB. A PAS mostrou que houve permeação do EB através da pele. Em relação às proteínas, o VEGF foi estimulado aos 4 dias e SOD-2 e COX-2 aos 7 dias. Os resultados sugerem que o EB promoveu a regulação das proteínas e a angiogênese precoce e também contribuiu para acelerar os processos envolvidos na cicatrização. Isto levou a um aumento na superfície re-epitelizada, com proliferação mitótica significativa. A maturação das fibras colágenas foi aumentada, o que poderia influenciar a resistência da matriz extracelular. Tendo em vista os resultados obtidos o EB de *P. pluviosa* apresenta potencial para tornar-se um produto fitoterápico promissor com uma função de cura.

Palavras-chave: *Poincianella pluviosa*, queratinócitos e fibroblastos *in vitro*, cicatrização de feridas *in vivo*, ratos normoglicêmicos e diabéticos.

## ABSTRACT

Wound healing is a dynamic and complex process that due to diseases such as diabetes *mellitus* may have an impaired tissue repair. Due to the high costs and decreased life quality, the search for new drugs to improve the healing process has been outstanding. This research aimed to evaluate the wound healing activity of the crude extract (CE) of *Poincianella pluviosa* and subfractions through bioguided study with *in vitro* model, as well as the action on wounds skin in normoglycemic and diabetic rats. In the bioguided study, *in vitro* cell viability and proliferation of keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (pNDHF) were evaluated, and the fraction with activity was characterized by solid  $^{13}\text{C}$  NMR and s LC-MS/MS. The healing activity was measured in normoglycemic mice at 4, 7, 10 and 14 days of treatment with the gel containing 1% EB by evaluating the length and thickness of the re-epithelialized surface of skin, cutaneous permeation analysis by photoacoustic spectroscopy technique (PAS), number of cells in metaphase and collagen fibers (type I and III) and quantification of proteins (vascular endothelial growth factor (VEGF), cyclooxygenase 2 (COX-2) and superoxide dismutase 2 (SOD-2)). The healing activity in diabetic rats was evaluated at 4, 7, 10, 14 and 21 days with the same gel by evaluating the length and thickness of the re-epithelialized surface and quantification of proteins. *In vitro* evaluations have shown that CE and subfraction FC1 stimulated mitochondrial activity in both types of cells and the proliferation of keratinocytes. The characterization of subfraction FC1 showed the presence of polyphenols and hydrolysable tannins. The evaluation of the effect of the gel containing 1% CE in normoglycemic mice revealed migration of keratinocytes on day 4 and their proliferation in the following days, with a significantly ( $p < 0.005$ ) increased amount of cells in metaphase after 7 days of treatment. The collagen type I fibers were formed more rapidly on treatment with CE. PAS showed that there was CE permeation through the skin. With relation to the proteins, VEGF was stimulated at day 4 and SOD-2 and COX-2 at day 7. The results suggest that CE promoted the regulation of proteins, early angiogenesis and contributed to accelerate the processes involved in wound healing. This led to an increase in re-epithelialized surface with significant mitotic proliferation. The maturation of collagen fibers was increased, which could influence the strength of the extracellular matrix. Accordingly, the results obtained from *P. pluviosa* crude extract might become an efficient and promising herbal medicine for enhancing the wound healing process.

Key-words: *Poincianella pluviosa*, *in vitro* keratinocytes and fibroblasts, *in vivo* wound healing, normoglycemic and diabetic rats.

## LISTA DE FIGURAS

|          |                                                                                                                                                                                                           |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Figura 1. (A) <i>Poincianella pluviosa</i> . (B) Folhas e folhetos (C) e cascas da sibipiruna.....                                                                                                        | 25 |
| Figura 2 | Camadas da pele: A) Tecido epitelial. B) Fotomicrografia de corte histológico de pele humana (colocação HE, 20X).....                                                                                     | 26 |
| Figura 3 | Fotomicrografia de corte histológico de pele humana (colocação HE, 20X). (A) Camadas da epiderme: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. (B) Camadas da derme: papilar e reticular.....            | 27 |
| Figura 4 | Fases da cicatrização de feridas através do tempo.....                                                                                                                                                    | 29 |
| Figura 5 | Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato aos 4 dias de tratamento (colocação HE, 4X). (A) Tecido íntegro, (B) Língua de re-epitelização, (C) Tecido de granulação, (D) coágulo..... | 30 |
| Figura 6 | Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato (coloração HE, 4X). (A) epiderme recobrendo a ferida, (B) tecido de granulação com presença de fibroblastos.....                           | 31 |
| Figura 7 | Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato (coloração Picro-Sírius, 20X). Verde: fibras colágenas tipo III. Amarelo/Vermelho: fibras colágenas tipo I.....                            | 33 |

## CAPÍTULO 1

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 | Bioassay-guided fractionation of EtOH-water extract from <i>Poincianella pluviosa</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 45 |
| Figure 2 | Influence of FC1, FC2, FC3, and FC4 on cellular dehydrogenase activity (MTT assay) of HaCaT keratinocytes (A) and dermal fibroblasts pNHDF (B). Influence of FC1 and FC2 on mitogenic cell proliferation (BrdU assay) of HaCaT keratinocytes is displayed in (C). The results are expressed as mean $\pm$ SD. Values are mean of 3 independent experiments, n = 8 replicates. NC: untreated negative control; PC: positive control 5% FCS; * $p < 0.05$ compared to NC..... | 49 |
| Figure 3 | Solid state $^{13}\text{C}$ NMR spectra of FC1 indicating signals typical for gallic acid and hexose (Hex).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 52 |
| Figure 4 | Structural features of compounds from fraction FC1 from the stem bark of <i>Poincianella pluviosa</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 53 |

## CAPÍTULO 2

|                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1                        | (A) Photography of excisional wounds in second day of treatment: CE treatment and Control; (B) Photomicrography of histological sections stained in hematoxylin-eosin: skin at days 4, 7, 10 and 14 of CE treatment and Control. The original magnification was 2x. (●) Representative re-epithelialized surface. (┐) 500 $\mu$ m. CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.....                                                                                                                                                                               | 64 |
| Figure 2                        | (A) Length at days 4 and 7 and (B) thickness at days 10 and 14 of the re-epithelialization surface. (C) Number of cells in metaphasis/mm in basal and supra-basal re-epithelialized surface at days 4, 7, 10 and 14. (■) CE treatment and (□) Control. The results are expressed as mean $\pm$ standard desviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (* $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.....                                    | 65 |
| Suplementar<br>Information<br>1 | (A) Photomicrography of histological sections stained in Sirius Red: type I collagen (yellow/orange/red) and collagen type III (green) at days 10 and 14, for the CE treatment and Control. The original magnification was 2x. (┐) 500 $\mu$ m. CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 66 |
| Figure 3                        | Percentages of (A) collagen type III (imature) and (B) type I (mature) collagen at days 4, 7, 10, and 14. (■) CE treatment and (□) Control. The results are expressed as mean $\pm$ standard desviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (* $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.....                                                                                                                                               | 67 |
| Figure 4                        | (A) Western blot analyses of COX-2, SOD-2, VEGF and GAPDH protein at days 4, 7, and 10 of CE treatment (T) and Control (C). (B) Measurement obtained from the ratio between optical densities of proteins bands from treatments and loading control (GAPDH). GAPDH have been set to 100%. The results are expressed as mean $\pm$ standard desviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (* $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel..... | 68 |

|          |                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 5 | Figure 5. (A) Scan spectrum of the crude extract of CE, CE gel, and base gel, and subtraction the inner side of the CE treatment and Control wound (B) in photoacoustic spectroscopy. CE: crude extract..... | 69 |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO 3

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Representação da média±desvio padrão da (A) medida do comprimento (µm) da superfície de reepitelização, aos 4 e 7 dias e (B) da espessura (µm), aos 10 e 14 dias de tratamento (n=5). Análise estatística realizada em ANOVA com $*(p<0,05)$ comparado com o gel base. (■) Tratado com EB e (□) Controle. Tratado com EB: ferida tratada com gel contendo 1% de extrato bruto; Controle: ferida tratada com gel base..... | 79 |
| Figura 2 | Cortes histológicos de feridas cutâneas coradas em HE aos (A,F) 4, (B,G) 7, (C,H) 10, (D,I) 14 e (E,J) 21 dias de tratamento com EB e gel base, respectivamente. (—) comprimento da superfície de re-epitelização; (■) espessura da superfície de re-epitelização. HE: hematoxilina-eosina.....                                                                                                                           | 80 |
| Figura 3 | Densitometria das proteínas (A) COX-2, (B) VEGF, (C) SOD-1 e (D) SOD-2 do (■) Tratado com EB e (□) Controle. O GAPDH foi definido como 100%. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão. Os valores são a média de três testes independentes. Os dados estatísticos foram usados para comparação entre os dias de tratamento ( $*p<0,05$ ).....                                                               | 81 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

|         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1 | Influence of CE and subfractions FA, FB and FC on cellular dehydrogenase activity (MTT assay) and mitogenic cell proliferation (BrdU assay) of HaCaT keratinocyte cell line and primary dermal fibroblasts (pNHDF) at 1, 10, 25, 50 and 100 µg/mL. The results are expressed as mean ± SD. Values are mean of 3 independent experiments with n = 8 replicates. NC: untreated negative control; PC: positive control (5% FCS); n.p.: not performed; $* p < 0.05$ compared to NC..... | 47 |
| Table 2 | MS and MS/MS data of compounds detected in subfraction FC1 obtained from the stem bark of <i>P. pluviosa</i> and correlation to published data from literature.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 52 |

## LISTA DE APÊNDICE

|        |                                                                                                                                                                          |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela | Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPM) encontrados em                                                                                                 |    |
| A1     | 1000 eritrócitos policromáticos. CP: controle positivo; CN: controle negativo; S3: 3 g/kg de extrato bruto de <i>P. pluviosa</i> ; DP: desvio padrão; * $p < 0,05$ ..... | 99 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| a.C.             | Antes de Cristo                               |
| ANVISA           | Agência Nacional de Vigilância Sanitária      |
| BrdU             | Bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina)   |
| CAT              | Catalase                                      |
| CE               | Extrato bruto de <i>P. pluviosa</i>           |
| CLAE             | Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência       |
| CO <sub>2</sub>  | Gás carbônico                                 |
| COX-2            | Ciclooxigenase 2                              |
| °C               | Grau Celsius                                  |
| DL <sub>50</sub> | Dose Letal capaz de matar 50% dos animais     |
| DMEM             | Meio Eagle modificado por Dulbecco            |
| DPPH             | 2,2-difenil-1-picrilhidrazila                 |
| EEF              | Fração acetato de etila                       |
| ELISA            | Ensaio imunoenzimático                        |
| Et-OH            | Etanol                                        |
| EtOAc            | Acetato de etila                              |
| FCS              | Soro fetal bovino                             |
| g                | Gramas                                        |
| GHS              | Sistema Global Harmonizado                    |
| h                | Horas                                         |
| HaCaT            | Queratinócitos imortalizados                  |
| HE               | Coloração de Hematoxilina e Eosina            |
| Hex              | Hexose                                        |
| IC <sub>50</sub> | Concentração que inibe 50% dos radicais livre |
| IL               | Interleucina                                  |
| iNOS             | Óxido nítrico sintase induzível               |
| kV               | Kilo volts                                    |
| L                | Litro                                         |
| LDH              | Lactato desidrogenase                         |

|            |                                                          |
|------------|----------------------------------------------------------|
| µg         | Micrograma                                               |
| µs         | Micro segundos                                           |
| MEM        | Meio Eagle modificado                                    |
| mL         | Mililitro                                                |
| MPLC       | Cromatografia líquida de média pressão                   |
| MTT        | 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo |
| MS/MS      | Massa/Massa                                              |
| <i>m/z</i> | Massa/Carga                                              |
| <i>N</i>   | Normalidade                                              |
| NC         | Controle negativo                                        |
| ng         | Nanograma                                                |
| NMR ou RMN | Ressonância magnética nuclear                            |
| PAS        | Espectroscopia fotoacústica                              |
| PC         | Controle positivo                                        |
| PDGF       | Fator de crescimento derivado de plaquetas               |
| PITC       | Fenilisotiocianato                                       |
| pNHDF      | Célula primária de fibroblastos dermais                  |
| s          | Segundo                                                  |
| SD         | Desvio padrão                                            |
| SOD-1      | Superóxido dismutase 1                                   |
| SOD-2      | Superóxido dismutase 2                                   |
| ROs        | Espécies reativas de oxigênio                            |
| TNF        | Fator de necrose tumoral                                 |
| V          | Voltagem                                                 |
| VEGF       | Fator de crescimento endotelial vascular                 |
| v/v        | Volume/volume                                            |
| UV         | Ultravioleta                                             |
| WF         | Fração aquosa                                            |

## SUMÁRIO

|                                                                                                       |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                                                     | 17     |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                                          | 21     |
| 2.1 ASPECTOS GERAIS.....                                                                              | 22     |
| 2.1.1 Família Fabaceae.....                                                                           | 22     |
| 2.1.2 Gênero <i>Caesalpinia</i> .....                                                                 | 22     |
| 2.1.3 <i>Poincianella pluviosa</i> (DC.) L.P.Queiroz.....                                             | 24     |
| 2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS.....                                                                      | 26     |
| 2.2.1 Pele.....                                                                                       | 26     |
| 2.2.2 Processo de cicatrização de feridas.....                                                        | 28     |
| 2.2.3 Fatores que afetam a cicatrização de feridas.....                                               | 34     |
| 2.3 FITOTERÁPICOS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS.....                                                     | 35     |
| 3 OBJETIVOS.....                                                                                      | 38     |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....                                                                               | 39     |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                        | 39     |
| <br><b>CAPÍTULO 1. Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vitro</i></b> .....                      | <br>40 |
| Abstract.....                                                                                         | 41     |
| 1 Introduction.....                                                                                   | 42     |
| 2 Material and Methods.....                                                                           | 43     |
| 2.1 General experimentation procedures.....                                                           | 43     |
| 2.2 Extraction and Fractionation.....                                                                 | 44     |
| 2.3 Solid-State <sup>13</sup> C NMR and ESI-MS/MS.....                                                | 46     |
| 2.4 HaCaT keratinocytes and fibroblasts <i>in vitro</i> cell culture.....                             | 46     |
| 2.5 Statistical analysis.....                                                                         | 47     |
| 3 Results and Discussion.....                                                                         | 47     |
| 4 Conclusion.....                                                                                     | 53     |
| References.....                                                                                       | 54     |
| <br><b>CAPÍTULO 2. Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i> em ratos normoglicêmicos...</b> | <br>57 |
| Abstract.....                                                                                         | 58     |
| 1 Introduction.....                                                                                   | 59     |
| 2 Material and Methods.....                                                                           | 60     |
| 2.1 Plant material and crude extract (CE) preparation.....                                            | 60     |
| 2.2 Antioxidant capacity and total polyphenol content.....                                            | 60     |

|                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.3 Gel formulation.....                                                                           | 60        |
| 2.4 Ethics Statement and Experimental animals.....                                                 | 60        |
| 2.5 Histological study.....                                                                        | 61        |
| 2.5.1 Analyses of re-epithelialization.....                                                        | 61        |
| 2.5.2 Collagen fibers.....                                                                         | 61        |
| 2.6 Analysis of protein by Western blot.....                                                       | 61        |
| 2.7 Photoacoustic spectroscopy (PAS) measurements.....                                             | 62        |
| 2.8 Statistical analysis.....                                                                      | 62        |
| 3 Results.....                                                                                     | 62        |
| 3.1 Histological study.....                                                                        | 63        |
| 3.2 Analysis of protein by Western blot.....                                                       | 67        |
| 3.3 Photoacoustic spectroscopy (PAS) measurements.....                                             | 68        |
| 4 Discussion.....                                                                                  | 69        |
| 5 Conclusion.....                                                                                  | 71        |
| References.....                                                                                    | 71        |
| <br><b>CAPÍTULO 3. Avaliação da atividade cicatrizante <i>in vivo</i> em ratos diabéticos.....</b> | <b>75</b> |
| Resumo.....                                                                                        | 76        |
| 1 Introdução.....                                                                                  | 76        |
| 2 Materiais e Métodos.....                                                                         | 78        |
| 2.1 Introdução do diabetes e das feridas cutâneas .....                                            | 78        |
| 2.2 Análises histológicas e de proteínas por western blot.....                                     | 78        |
| 2.4 Análise estatística.....                                                                       | 79        |
| 3 Resultados.....                                                                                  | 79        |
| 3.1 Análises histológicas.....                                                                     | 79        |
| 3.2 Análise de proteínas por western blot.....                                                     | 80        |
| 4 Discussão.....                                                                                   | 80        |
| Referências.....                                                                                   | 83        |
| <br>4 CONCLUSÕES.....                                                                              | 85        |
| 5 PERSPECTIVAS.....                                                                                | 87        |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                   | 89        |
| APÊNDICE.....                                                                                      | 97        |
| ANEXOS.....                                                                                        | 100       |

## *1    INTRODUÇÃO*



A pele apresenta função de barreira protetora contra o ambiente externo, protegendo o organismo. Quaisquer danos causados, sejam eles físicos, químicos ou biológicos, desencadeiam de imediato sinais que caracterizam o processo inflamatório. Os danos causados são feridas que apresentam interrupções da estrutura anatômica e da função normal do tecido. O reestabelecimento da integridade desse tecido ocorre através de um processo complexo e dinâmico, a cicatrização. No entanto, por serem eventos traumáticos, as lesões raramente possuem a mesma restauração estrutural e funcional completa observada no tecido original (BALASUBRAMANI; KUMAR; BABU, 2001).

Os processos envolvidos na cicatrização têm como objetivo promover a regeneração do tecido lesado de maneira homeostática. A cicatrização de feridas passa por três fases: fase inflamatória, fase proliferativa (que incluem re-epitelização, síntese da matriz extracelular e neovascularização) e fase de remodelagem, sendo o tempo fundamental para que ocorra uma boa reparação tecidual da lesão (SINGER; CLARK, 1999). No entanto, o tempo de cicatrização pode ser alterado devido a diversos fatores que incluem desde a idade até a uma infecção local ou casos patológicos como a diabetes *mellitus*. Essa doença por ser uma doença metabólica e que afeta a oxigenação dos tecidos, leva em muitos casos a uma deficiência na cicatrização de feridas e pode levar a amputação do membro afetado. Em 2000, a Federação Internacional de Diabetes estimou que a prevalência de diabéticos fosse de 171 milhões de pessoas, com uma projeção para 2030 de 366 milhões (WILD et al., 2004). Onze anos depois, o número estimado passou a 382 milhões de pessoas com diabetes, sendo que o esperado para 2035 é que esse número aumente em 50% (GUARIGUATA et al., 2014).

A estimativa mundial é que cerca de 6 milhões de pessoas apresentam feridas não cicatrizadas (KUMAR et al., 2007) e que os custos anuais nos EUA com este problema atinge um bilhão de dólares (YOUNG; McNAUGHT, 2011). Há uma despesa substancial por meio de cuidados de saúde e perda da liberdade pessoal, da qualidade de vida e produtividade. Além do problema econômico e social, há a preocupação com a redução da qualidade de vida (KUMAR et al., 2007; JIANG, 2011), saúde mental e física (JIANG, 2011) e que suas complicações possam causar morbidade e mortalidade (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009). As feridas devem ser tratadas com o intuito de promover o alívio do paciente, devolvendo-o ao convívio social no menor tempo possível.

Devido aos elevados custos de tratamento de doenças associadas a uma má cicatrização de feridas, a busca de novos fármacos para acelerar o processo de cura tem sido destacada, principalmente para o tecido recém-formado. Para este processo se tornar eficaz, é necessário que a ferida seja rapidamente fechada e que a cicatriz resultante seja esteticamente satisfatória e resistente.

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, verificando-se assim, que medicamentos de uso tópico aceleram o processo de cicatrização por segunda intenção.

A utilização de produtos que auxiliam na aceleração da cicatrização são conhecidos desde 2000 a.C. Desde os tempos antigos, o homem se preocupa com o bem estar e com a integridade física. Os egípcios utilizavam um tipo de bandagem embebida no mel e graxa obtida de gordura animal, atuando com ação antibacteriana (SHAH, 2011). O mel também foi utilizado em outros locais, como na Índia, integrando de diversos tipos de curativos. Na Grécia, Hipócrates, o pai da medicina moderna, utilizava vinho para limpar a ferida e posteriormente a recobria com folhas de figo (BHATTACHARYA, 2012). Na Índia, seu sistema tradicional de medicina, Ayuverda, Siddha e Unani, descrevem o uso de plantas como agentes para auxiliar na cicatrização de feridas (KUMAR et al., 2007) tais como *Aloe vera* (L.) Burm.f. (HEGGERS et al., 1996), *Centella asiatica* (L.) Urb. (SHETTY et al., 2006) e *Cinnamomum zeylanicum* Ness (KAMATH; RANA; CHOWDHURY, 2003). Também a Medicina Tradicional Chinesa há anos utiliza-se de técnicas e outras formas no tratamento de doenças, como o uso de plantas medicinais.

Nos últimos anos, com a medicina moderna, as plantas ganharam espaço significativo na reparação de tecidos (KUMAR et al., 2007), atuando em conjunto com formulações para melhorar sua absorção na pele lesionada (ESIMONE; NWORU; JACKSON, 2008; SEHN et al., 2009; SASIDHARAN; LOGESWARAN; LATHA, 2012). Diversas plantas vêm sendo estudadas quanto à ação cicatrizante (TRAKUR et al., 2011), no entanto esse número é pequeno perto da biodiversidade existente. Extratos de plantas são utilizados como estratégia para redução das espécies reativas de oxigênio (ROS) e micro-organismos, redução do processo inflamatório, estimulação da proliferação e/ou diferenciação de queratinócitos e fibroblastos, produção de colágeno, e como estímulo para acelerar a cicatrização de feridas (HOUGHTON et al., 2005).

Atualmente muito tem se estudado sobre a eficácia de produtos naturais nas etapas do processo de cicatrização. 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). Testes *in vitro* (DETERS et al., 2001; AGYARE et al., 2011; WANG et al., 2013) e *in vivo* (LOPES et al., 2005; HERNANDES et al., 2010; GEETHALAKSHMI et al., 2013) envolvendo diversos modelos de cicatrização de feridas e mecanismos de ação desses extratos são utilizados para avaliação da ação cicatrizante (TRAKUR et al., 2011).

Diversas são as preparações de extratos, as formulações e métodos de análise para se comprovar a atividade farmacológica de uma planta *in vitro* e *in vivo*. Os modelos de cultura de células se tornaram importantes em testes de citotoxicidade e triagem de fármacos (estudo bioguiado), pois diminuem o número de animais e reagentes utilizados. Além de que os testes *in vitro* são essenciais durante a investigação da possível ação do extrato frente às diversas condições existentes no processo de cicatrização que envolvem fatores de crescimento, citocinas, células inflamatórias, entre

outros (HOUGHTON et al., 2005). No entanto, apenas os testes *in vitro* são insuficientes para comprovar cientificamente a atividade de um extrato vegetal ou substância isolada sendo necessários os testes em animais e humanos (HOUGHTON et al., 2005). A eficácia de um medicamento fitoterápico é fornecida por ensaios farmacológicos, pré-clínicos e clínicos realizados com a forma farmacêutica a ser empregada (KLEIN et al., 2009). Os testes *in vivo* visam avaliar além do extrato vegetal, os estudos da farmacocinética da forma farmacêutica a ser empregada.

Durante a avaliação de extratos vegetais *in vitro*, o extrato bruto proveniente das cascas da *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz apresentou uma atividade significativa na viabilidade e proliferação celular de queratinócitos e fibroblastos humanos (BUENO et al., 2014). Assim, este trabalho visou realizar um estudo bioguiado com este extrato, além de avaliar a ação do extrato bruto presente na forma farmacêutica de gel na cicatrização de feridas em ratos normoglicêmicos e diabéticos.



## 2.1 ASPECTOS GERAIS

### 2.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae, ou também conhecida como Leguminosae, compreende mais de 700 gêneros e 20.000 espécies sendo a terceira maior família de Angiospermas (BRITANNICA, 2014). No Brasil, são encontrados cerca de 213 gêneros e 2754 espécies que crescem em campos abertos e regiões de cerrado (FLORA DO BRASIL, 2014). São plantas conhecidas devido ao seu uso como alimento (arroz, milho, e outros cereais), com grande importância econômica, e com função ornamental. As espécies da família Fabaceae são utilizadas popularmente na medicina tradicional sendo considerada a segunda família com o maior número de plantas medicinais no mundo (GAO et al., 2010).

A família Fabaceae vem sendo dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoidae e Papilionoidae (QUEIROZ, 2009). A subfamília Casealpinioideae é muito bem representada no Brasil, sendo utilizada na arborização de cidades e na indústria madeireira (JOLY, 2002). Apresentam como característica folhas pinadas ou bipinadas, raramente simples, com flores geralmente zigomorfas e pétalas livres, corola com perfloração imbricada ascendente ou carenal. Os estames são geralmente duplos ao das pétalas. Relações filogenéticas, como através da análise do DNA cloroplastídico e nuclear, são realizadas nessas famílias para melhor entender sua origem e diversificação ecológica. As subfamílias Mimosoidae e Papilionoidae são consideradas como monofiléticas, ou seja, que inclui o ancestral e todos os descendentes.

A subfamília Casealpinioideae pode ser monofilética ou não. Esta subfamília foi subdividida em quatro tribos (Cercideae, Detarleae, Cassieae e Caesalpineae) de acordo com a classificação proposta por Lewis et al. (2005) apud QUEIROZ (2009). As tribos Cassieae e Caesalpineae são consideradas parafiléticas, ou seja, que possui um ancestral em comum, mas não inclui todos os descendentes. A tribo Caesalpineae possui um histórico taxonômico complexo, na qual o gênero *Caesalpinia* faz parte. De acordo com Lewis et al. (2005) apud Queiroz (2009), gêneros que não são monofiléticos apresentam divisão em gêneros menores. Lewis (1998) apud Queiroz (2009) realizou uma revisão do gênero *Caesalpinia* organizando novos grupos, os quais foram reorganizados em 2005 em: *Coulteria*, *Erythrostemon*, *Guilandina*, *Libidibia*, *Mezoneiron*, *Poincianella* e *Tara*. A *Poincianella* é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia*, o qual possui aproximadamente 35 espécies, sendo 6 pertencentes à caatinga (LEWIS, 2005 apud QUEIROZ, 2009)

### 2.1.2 Gênero *Caesalpinia*/*Poincianella*

O gênero *Caesalpinia* pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, possui cerca de 500 espécies existentes no mundo. As espécies de *Caesalpinia* e seus compostos vêm sendo estudadas quanto as mais diversas atividades biológicas: analgésica, antiúlcera, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante, antidiabética e outras (ZANIN et al., 2012). Na medicina

tradicional Indiana, a *Caesalpinia* é um dos gêneros utilizados no tratamento de feridas e outros tipos de injúrias (JAIN, 1991 apud AYYANAR; IGNACIMUTHU, 2009).

A *Caesalpinia pulcherrima* Swartz é muito utilizada em Taiwan para o tratamento de diversas enfermidades. Chew et al. (2011) mostraram a atividade antioxidante do extrato bruto das flores e folhas de *C. pulcherrima*. Hsu et al. (2012) isolaram 13 compostos desse extrato e identificaram como compostos alguns polifenóis como ácido gálico, metil galato, 6-*O*-galoil-D-glicose, metil 6-*O*-galoil- $\alpha$ -D-glicose, metil 3,6-di-*O*-galoil- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo e outros. Os compostos encontrados apresentaram atividade antioxidante *in vitro*. An e Nayeem (2012) avaliaram o extrato das folhas de *C. pulcherrima* quanto à ação na cicatrização de feridas. O extrato acelerou o período de reparação tecidual da ferida.

A *Caesalpinia sappan* Linn. é conhecida pelo seu uso na medicina tradicional chinesa e tem atividade anti-inflamatória conhecida. Na Índia, suas sementes são utilizadas pela população na cicatrização de feridas (CHOPDA; MAHAJAN, 2009). Wu e colaboradores (2011) demonstraram a inibição de citocinas pré-inflamatórias como interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral (TNF) quando avaliaram o extrato de *C. sappan*. Srinivasan e colaboradores (2012) mostraram a ação antimicrobiana de *C. sappan* contra *Pseudomonas aeruginosa*, além de encontrar como constituintes taninos, flavonoides, saponinas e esteroides.

O extrato dos frutos da *Caesalpinia ferrea* C. Mart. foi avaliado quanto à ação antitumoral contra o vírus Epstein-Barr, sendo seus constituintes com atividade o ácido gálico e o metil galato (NAKAMURA et al., 2012). O extrato das cascas de *C. ferrea* apresentou ação antiúlcera com uso oral e intraperitonal (BACCHI et al., 1995). Ainda o estudo fitoquímico mostrou a presença de aproximadamente 9% de taninos nas cascas o que pode auxiliar na cicatrização das úlceras. Oliveira e colaboradores (2010) conseguiram resultados significativos na avaliação da cicatrização de feridas cutâneas de caprinos com o uso das cascas de *C. ferrea*. Dias e colaboradores (2013) ao avaliarem uma matriz contendo extrato de *C. ferrea* comprovaram que o mesmo pode auxiliar na cicatrização de feridas devido ao seu efeito anti-inflamatório no local, através da regulação da expressão de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ).

Na medicina tradicional da Índia a *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming é utilizada como hipoglicemiante (CHAKRABARTI et al., 2005) e também na cicatrização de feridas (CHOPDA; MAHAJAN, 2009). A ação como secretagogo de insulina na diabetes *mellitus* tipo 2 foi comprovada por (CHAKRABARTI et al., 2005). Shukla et al. (2010) mostraram que o óleo extraído das sementes de *C. bonducella* ao ser testado em edema de pata induzido por carregenina mostrou ação anti-inflamatória, analgesia e antipirética nos animais testados.

As cascas e raízes de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. & Zarucchi são utilizadas popularmente no tratamento de infecções tópicas e feridas. Devido a este relato, Dickson et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana e antioxidante das substâncias isoladas do extrato de éter de petróleo

das cascas e raízes levando em consideração que as feridas normalmente são impedidas de cicatrizar pela presença de alguns microorganismos, como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., e espécies reativas de oxigênio. Deste extrato foi isolado, dois diterpenos, designados de bentaminina 1 e 2 e outro deoxicaesaldecarina C. A bentaminina 1 apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus flavus*. A bentaminina 2 apresentou maior atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH e IC<sub>50</sub> de 42,7 µM. Deoxicaesaldecarina C apresentou ambas atividades antibacteriana e antioxidante. Dickson et al. (2012) isolaram a bentaminina 3 que apresentou atividade significativa contra bactéria resistentes como *Staphylococcus aureus* meticilina resistente, tetraciclina resistente e eritromicina resistente.

### 2.1.3 *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz

A espécie *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz (Figura 1), conhecida popularmente como “sibipiruna” ou “falso pau Brasil” é utilizada como planta ornamental e possui potencial madeireiro (Figura 1B). Possui como sinonímia *Caesalpinia peltophoroides* Benth., *Caesalpinia pluviosa* DC., *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) G.P. Lewis e *Poincianella pluviosa* var. *Peltophoroides* (Benth.) L.P. Queiroz. No Brasil, a sibipiruna é encontrada na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Paraná, Espírito Santo e na região do Pantanal no estado do Mato Grosso (CORTE et al., 2008). Ela ocorre na Bolívia, Paraguai e norte da Argentina (QUEIROZ, 2009).

O extrato das cascas de *P. pluviosa* apresentou atividade antimalárica *in vitro* frente ao agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum*, cloroquina resistente, apresentando um IC<sub>50</sub> de 8,3 µg/mL (BAELMANS et al., 2000). Mais tarde, Kayano et al. (2010) ao estudarem o extrato hidroetanólico das cascas de *P. pluviosa* encontraram atividade antimalárica frente ao mesmo agente com IC<sub>50</sub> de 3,41 µg/mL e fração semipurificada com IC<sub>50</sub> de 0,7 µg/mL.

Flores e colaboradores (2006) identificaram nas cascas de *P. pluviosa* os compostos fenólicos galato de etila e rhuschalcona IV, além de lupeol, ácido betulínico e estigmasterol. Kayano et al. (2011) relatou a presença de quercetina nas cascas de sibipiruna.

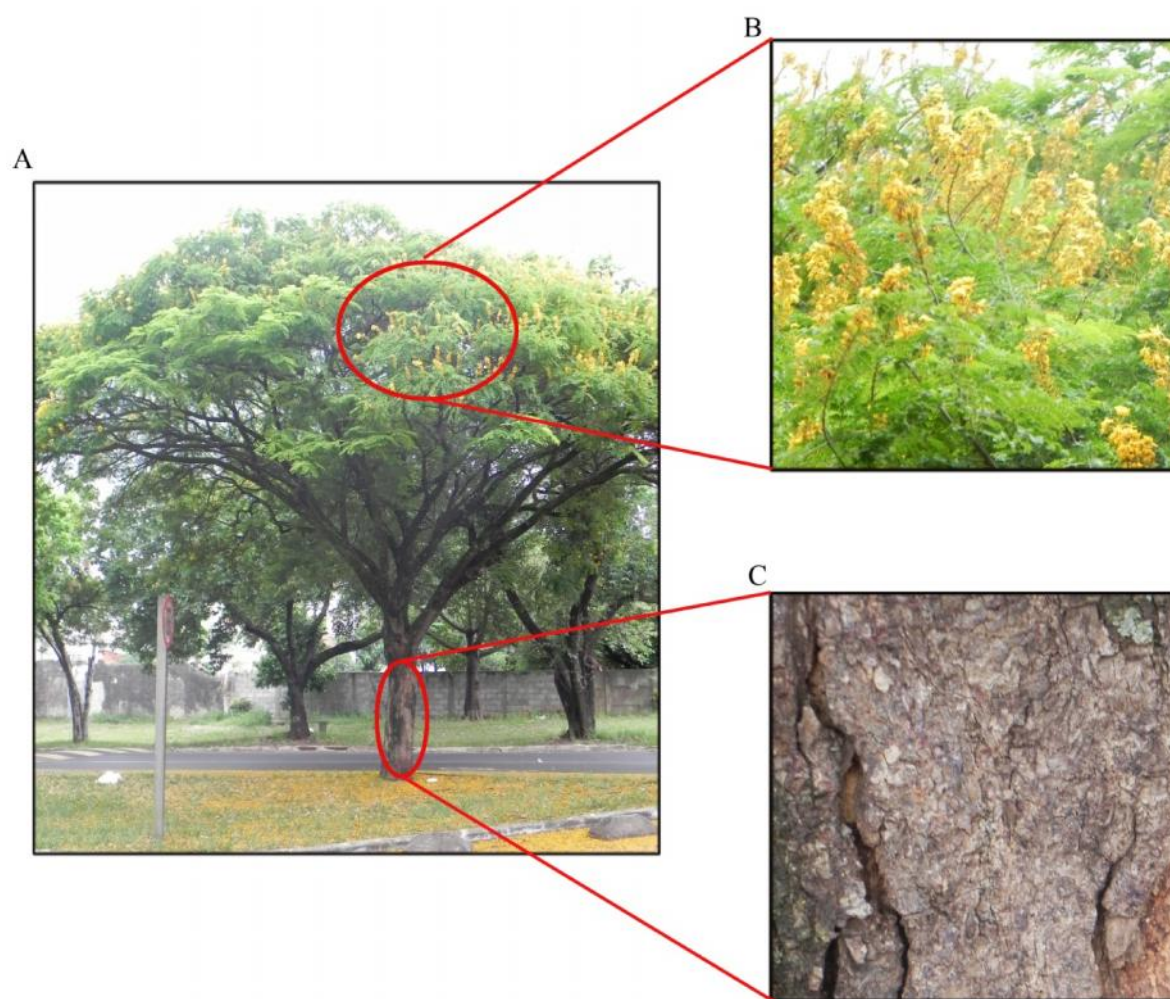


Figura 1. (A) *Poincianella pluviosa*. (B) Folhas e folhes (C) e cascas da sibipiruna. Foto: Fernanda Bueno.

## 2.2 ASPECTOS HISTOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

### 2.2.1. Pele

A pele corresponde cerca de 16% do peso corporal e é considerada o maior órgão do corpo humano. Apresenta-se como uma barreira protetora contra o ambiente externo e micro-organismos, além de regular a temperatura corporal e evita perda de água. Essas funções só são possíveis devido à constituição da pele em origens embrionárias diferentes (Figuras 2A e 2B): a epiderme, com origem do ectoderma e a derme, com origem do mesoderma intraembrionário. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não pertence à pele, mas atua como suporte para ela (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

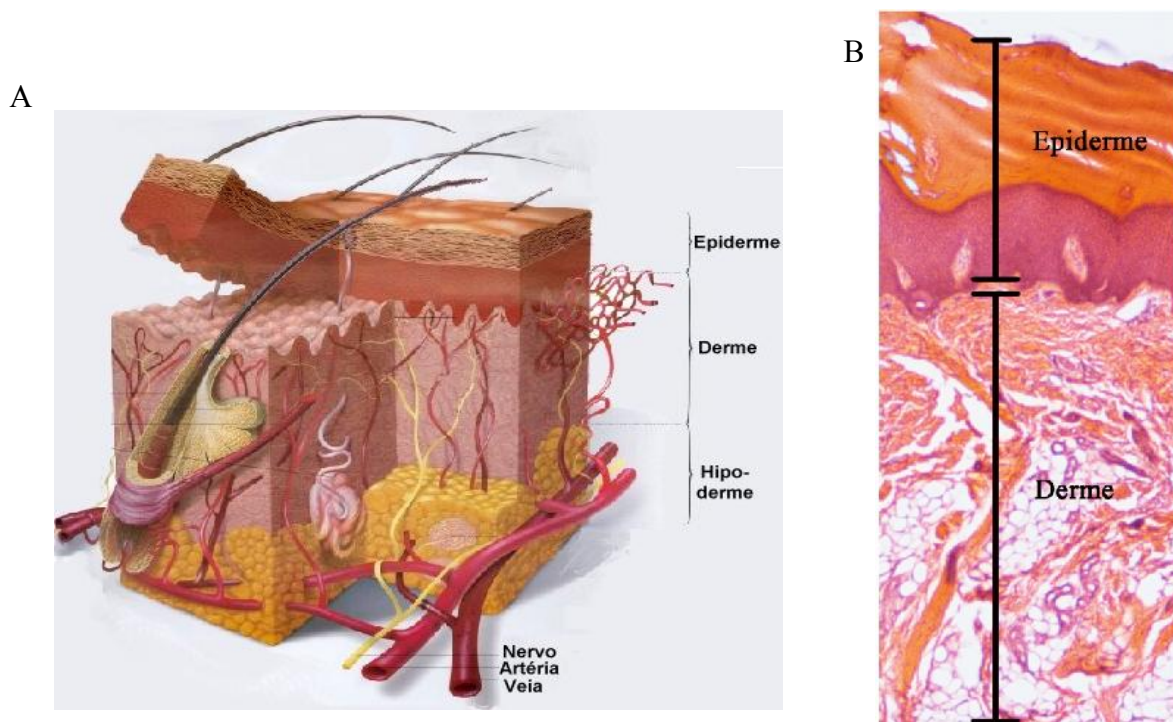


Figura 2. Camadas da pele: A) Tecido epitelial. Fonte: adaptado de <http://www.saudetotal.com.br/prevencao/tópicos/histologia.asp> acessado em 10-05-12. B) Fotomicrografia de corte histológico de pele humana (colocação HE, 20X). Foto: Fermanda Bueno. HE: Hematoxicilina-eosina.

A epiderme é formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado composto principalmente de queratinócitos (barreira mecânica, produção de citocinas), melanócitos (formadores de pigmentos que protegem contra luz ultravioleta), células de Langerhans (apresentadoras de antígenos) e células de Merkel (mecano receptores) (FERREIRA et al., 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A epiderme é dividida em várias camadas: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal (Figura 3A). O estrato córneo é superficial e suas células anucleadas se enchem de queratina. Essa camada pode se tornar mais espessa em alguns locais como a palma das mãos. O estrato lúcido vem em

seguida do córneo, e também é rico em queratina (GARTNER; HIATT, 2007), que proporciona proteção para a pele contra micro-organismos e água. A camada granulosa se encontra logo abaixo da camada lúcida e não é queratinizada. Ela é composta por grânulos citoplasmáticos ricos em cistina e histidina que são liberados por exocitose e formam uma camada rica em lipídeos sobre a membrana plasmática (GARTNER; HIATT, 2007). Essa camada impermeabiliza a epiderme, sendo uma proteção para ela. Na camada espinhosa, ou supra-basal, possui algumas camadas de células com prolongamentos citoplasmáticos. Há presença de desmossomos que permitem a união entre as células e uma resistência da pele ao atrito (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A supra-basal é formada por queratinócitos com atividade mitótica pequena. A camada que se encontra ancorada na derme e é denominada de camada basal ou germinativa, pois há presença de células-tronco nesta porção. É importante devido à intensa atividade mitótica dos queratinócitos levando a renovação celular da epiderme (GARTNER; HIATT, 2007). A presença dos desmossomos permite que as células basais se liguem entre si e entre os queratinócitos (ROSS; PAWLINA, 2008). Com a atividade mitótica, os queratinócitos vão de encontro com o estrato espinhoso realizando migração destas células para as demais camadas da pele. Esta divisão mitótica finaliza quando a célula se torna uma célula queratinizada (ROSS; PAWLINA, 2008).

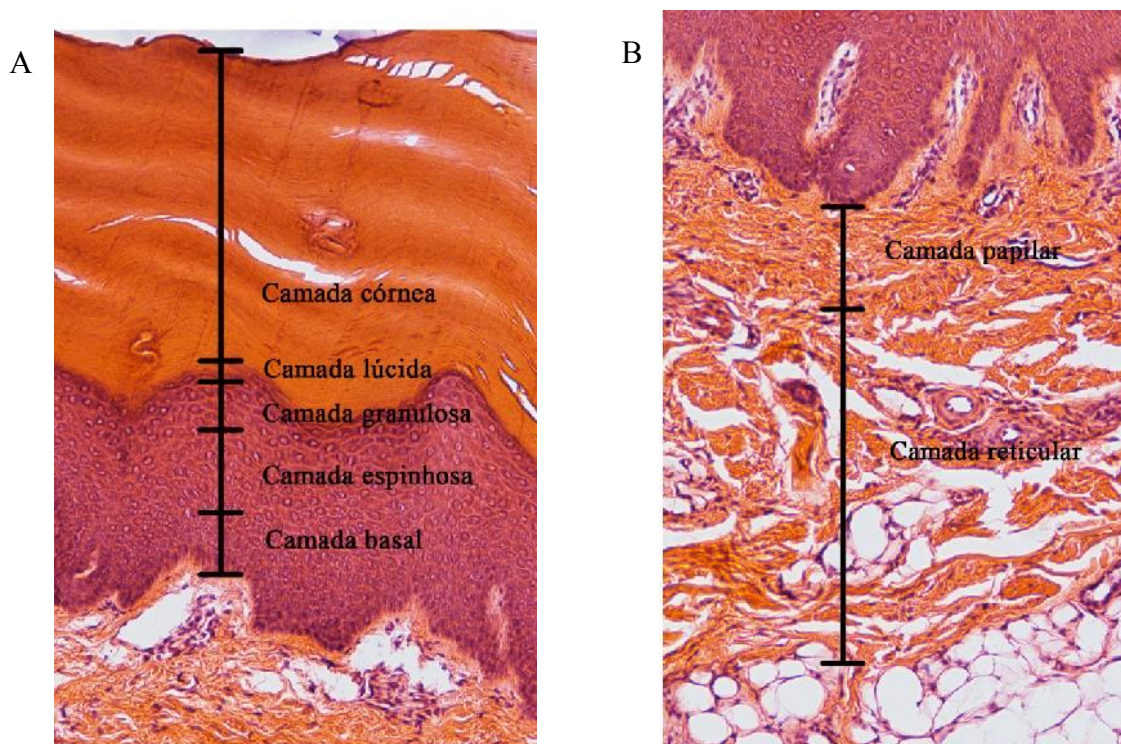


Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de pele humana (colocação HE, 20X). (A) Camadas da epiderme: córnea, lúcida, granulosa, espinhosa e basal. (B) Camadas da derme: papilar e reticular. Foto: Fernanda Bueno. HE: Hematoxilina-eosina.

Abaixo da epiderme encontra-se a derme, constituída de tecido conjuntivo. Este tecido é composto por fibras elásticas e colágenas, responsáveis pela elasticidade e tonicidade da pele, além de vasos sanguíneos e terminações nervosas, responsáveis por nutrir e sustentar a epiderme. A derme é constituída de duas camadas: papilar (superficial) e reticular (profunda) (Figura 3B). A camada papilar encontra-se em contato com a camada basal da epiderme constituída de tecido conjuntivo frouxo, com presença de fibras colágenas tipo III. Essas fibras fazem parte de 8 a 12% do colágeno existente na derme. A camada possui também grande número de fibroblastos e substância fundamental, constituída de glicosaminoglicanas, proteoglicanas e glicoproteína fornecendo força e rigidez a matriz extracelular (SAMPAIO; RIVITTI, 2007; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os fibroblastos são células responsáveis pela produção de colágeno que ajudam a isolar e reparar o tecido lesado, sendo importantes na formação do tecido de granulação (BALBINO et al., 2005). A camada reticular é mais espessa e formada por um tecido conjuntivo denso, com fibras colágenas tipo I que se entrelaçam com as fibras elásticas sustentando a epiderme (FERREIRA et al., 2007). As fibras colágenas tipo I representam 80 a 90% do colágeno existente na derme, são espessas e conferem a resistência contra a tensão presente na pele (SAMPAIO; RIVITTI, 2007). É composta de vasos linfáticos e sanguíneos, folículos pilosos, glândulas e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### **2.2.2 Processo de cicatrização de feridas**

A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que envolvendo três etapas que se sobrepõem: inflamação, proliferação e remodelação do tecido (Figura 4) (SINGER; CLARK, 1999). Autores como Goisan e DiPietro (2004), consideram o processo como quatro fases, sendo a homeostase e a inflamação as duas primeiras, seguidas da proliferação e remodelamento. Estas etapas são essenciais para evitar uma contaminação da ferida por micro-organismos, além do reestabelecimento da integridade do tecido lesado (SINGER; CLARK, 1999).

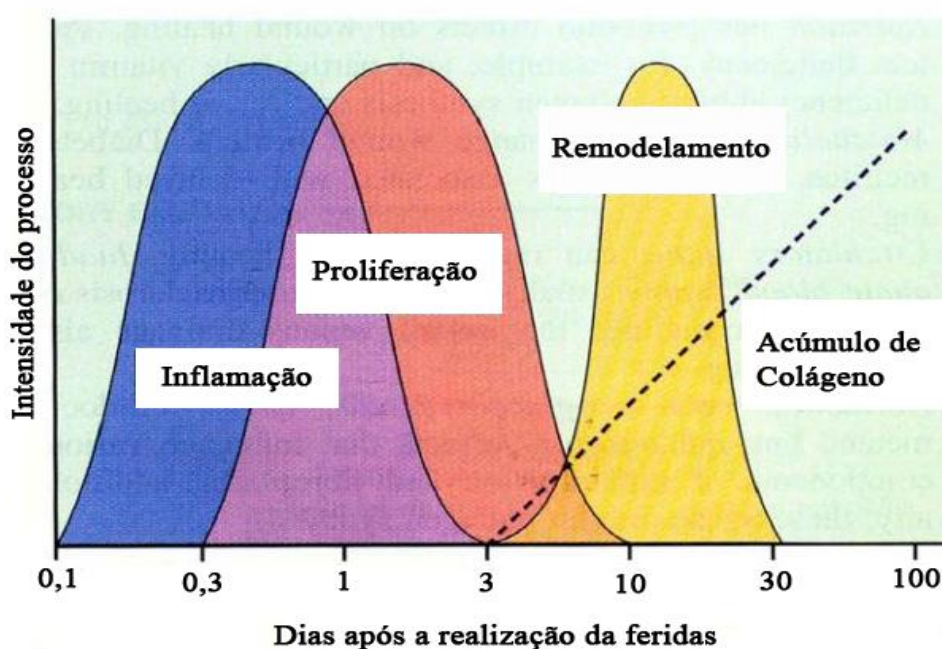


Figura 4. Fases da cicatrização de feridas através do tempo. Adaptado de Francischetti et al. (2009).

A revisão do processo de cicatrização foi baseada em Singer e Clark (1999), Guo e DiPietro (2010), Rodero and Khosrotehrani (2010) e Young e McNaught (2011).

A fase inflamatória ocorre assim que o tecido é lesionado resultando em inchaço, rubor, calor e dor (MACKAY; MILLER, 2003). No início do processo cicatricial ocorre rapidamente um extravasamento de sangue e a formação de um coágulo de fibrina formado através da ativação das plaquetas. O coágulo de fibrina passa a ser um suporte para a sustentação das células que irão se infiltrar na ferida e é importante para restabelecer a homeostase. Tanto o tecido lesado quanto o coágulo passam a estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas pré-inflamatórias, como o fator de crescimento de derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ). O TGF- $\beta$  facilita o aparecimento de células polimorfonucleares (PMN) através dos vasos sanguíneos. Logo, o tecido lesado fica cheio de células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Com a ativação destas células imunes há um aumento da produção de ROS, que são essenciais na remoção de microrganismos, debridamento das células mortas, além da ativação de fatores que aumentam a produção de enzimas inflamatórias, como a cicloxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (PARK et al., 2011). Os ROS acabam sendo produzidos em alta concentração causando danos às células. Assim, produtos antioxidantes são produzidos para amenizar a ação dos ROS, como a superóxido dismutase 1 e 2 (SOD-1 e SOD-2) e a catalase (CAT). Além disso, os macrófagos são responsáveis pela secreção de outros fatores que também influenciam no processo cicatricial, como a interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF).

A segunda fase, proliferativa, compreende a angiogênese, formação do tecido de granulação, início da deposição de colágeno (tecido conjuntivo vascularizado), re-epitelização (recobrimento da

ferida por um novo epitélio) e contração da ferida (SINGER; CLARK, 1999; YOUNG; McNAUGHT, 2011). A hipóxia presente inicialmente no processo de cicatrização é importante para facilitar a re-epitelização e estimular a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) juntamente com outras citocinas, induzindo a neovascularização do local (YOUNG; McNAUGHT, 2011). Estes estímulos locais levam a migração e proliferação de células endoteliais como os queratinócitos presentes nas bordas da ferida. A migração celular ao centro da ferida ocorre com o intuito de recobrir a matriz provisória (SANTORO; GAUDINO, 2005) em função do gradiente quimiotático. A proliferação celular é responsável por formar um epitélio hiperproliferativo chamado de língua de re-epitelização (SANTORO; GAUDINO, 2005) (Figura 5). Uma forma de se analisar a proliferação celular é a partir da administração do sulfato de vincristina ao animal em jejum duas horas antes do sacrifício. O sulfato de vincristina é um quimioterápico que atua ligando-se à tubulina, impedindo a formação de microtúbulo, o que resulta na interrupção da mitose na fase de metáfase (FARO et al., 2008).

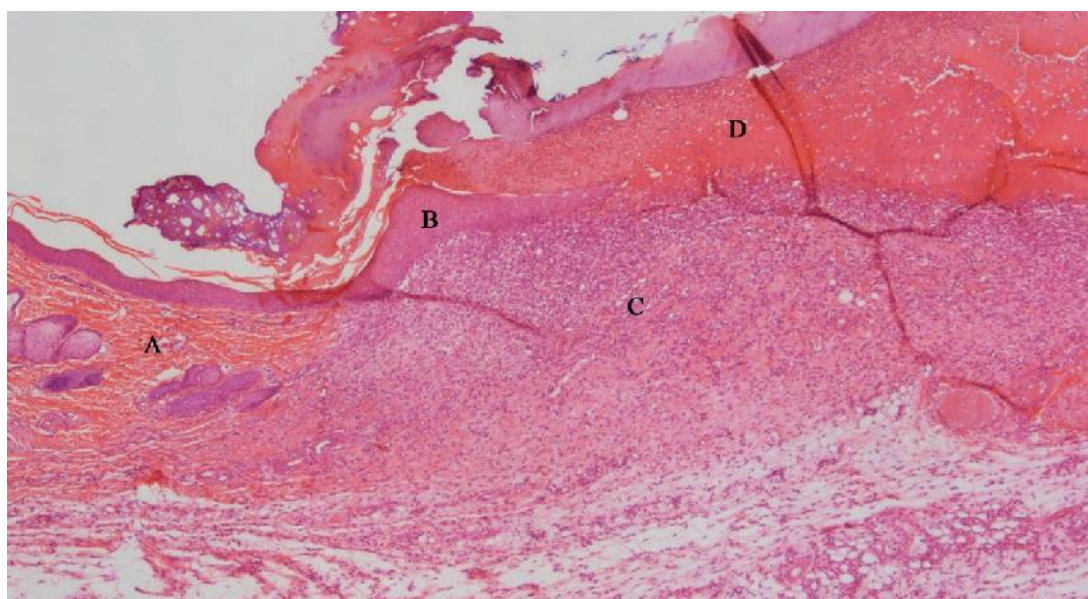


Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato aos 4 dias de tratamento (colocação HE, 4X). (A) Tecido integro, (B) Língua de re-epitelização, (C) Tecido de granulação, (D) coágulo. Foto: Fermanda Bueno. HE: Hematoxilina-eosina.

Os fatores de crescimento produzidos também favorecem a proliferação e diferenciação das células com intuito de restaurar a integridade da pele. Com este estímulo, os fibroblastos também migram para o centro da ferida estimulando a formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia). Estas células são essenciais para a formação do tecido de granulação por serem responsáveis pela produção de colágeno local juntamente com a neovascularização do tecido (angiogênese) (BALBINO

et al., 2005). O tecido de granulação é formado por células tais como: fibroblastos, macrófagos, componentes neovasculares e da matriz extracelular (glicosaminoglicanas, fibronectina e colágeno) (Figura 6). É um tecido edematoso formado por vasos imaturos que se rompem facilmente. O ressecamento da crosta presente na ferida auxilia na contração da mesma diminuindo seu tamanho e arrastando o tecido para o centro da ferida (BALBINO et al., 2005).

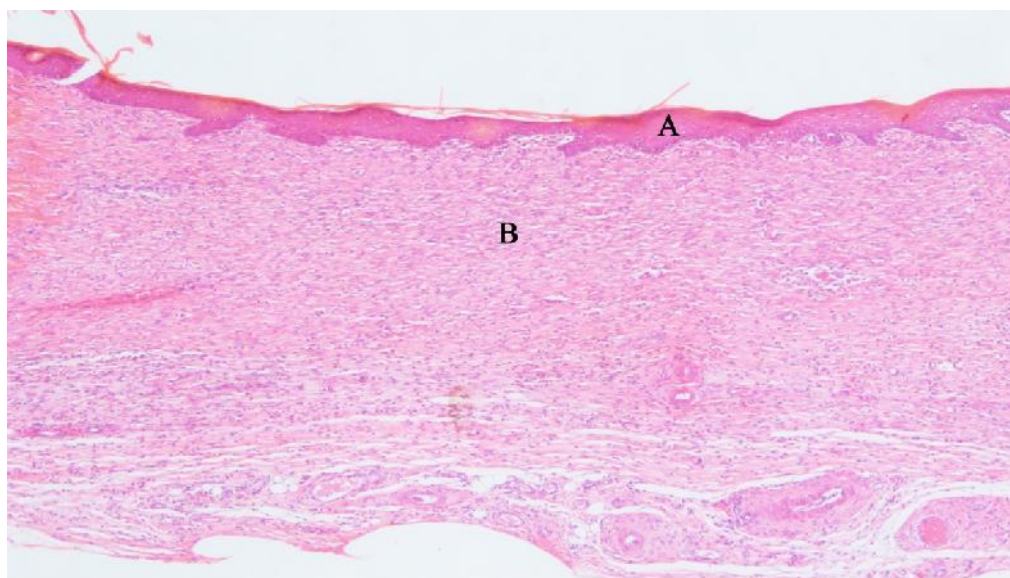


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato aos 10 dias de tratamento (coloração HE, 4X). (A) epiderme recobrendo a ferida, (B) tecido de granulação com presença de fibroblastos. Foto: Fernanda Bueno. HE: Hematoxilina-eosina.

Por volta do décimo dia a ferida encontra-se toda preenchida pelo tecido de granulação, neovascularizada e na presença de fibras colágenas, iniciando-se a última fase do processo cicatricial, o remodelamento. Nesta fase, o tecido continua a ser enrijecido por mais fibras colágenas obtendo aparência de cicatriz (BALBINO et al., 2005), podendo durar anos. O colágeno é responsável pela resistência e integridade do tecido e dos novos vasos dependendo do tipo e quantidade das fibras formadas. O colágeno é estimulado por fatores de crescimento presentes na injúria, e envolve na sua composição três tipos de aminoácidos: lisina, glicina e prolina. Nos fibroblastos presentes no tecido de granulação ocorre a hidroxilação da lisina e prolina na formação não helicoidal, com formação de hidroxiprolisina e hidroxiprolina. A glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina formam três cadeias de polipeptídeos, as cadeias  $\alpha$ , que se entrelaçam formando uma tripla hélice, o procolágeno (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998). O procolágeno se combina para formar as fibrilas de colágenas que posteriormente se agregam e formam as fibras colágenas (STADELMANN; DIGENIS;

TOBIN, 1998). Assim, a quantificação da hidroxiprolina pode determinar a quantidade de colágeno presente na pele.

Existem diversos tipos de fibras colágenas, sendo o colágeno tipo I e o colágeno tipo III responsáveis pela maioria da resistência à tração no corpo (MACKAY; MILLER, 2003). O colágeno tipo I representa cerca de 90% do colágeno corporal e é encontrado principalmente na pele, tendão e ossos, e é conhecido como fibra madura (CUTTLE et al., 2005). O colágeno tipo III é encontrado na pele, artérias, intestino e útero, e é conhecido como fibra jovem (CUTTLE et al., 2005). A derme é constituída de colágenos do tipo I (80%) e tipo III (20%) (STADELMANN; DIGENIS; TOBIN, 1998). Nos estágios iniciais da cicatrização o colágeno tipo III está presente em grande quantidade (LI; CHEN; KIRSNER, 2007). O colágeno tipo III (imaturo) é composto por filamentos finos, além de ser altamente solúvel. Com a injúria os fibroblastos passam a secretar este colágeno e com o remodelamento, ele vai sendo degradado por enzimas e substituído pelo colágeno tipo I (GOODMAN; FULLER, 2009). O colágeno tipo I, é um colágeno maduro e insolúvel que irá fornecer maior força de tensão e resistência da pele (GOODMAN; FULLER, 2009). O fator de transformação do crescimento beta(TGF-  $\beta$ ) é capaz de regular o equilíbrio entre o colágeno do tipo I e o colágeno tipo III durante o processo de cicatrização (SHERRAT; DALLON 2002). Ao final desta fase, os anexos da pele (foliculos pilosos e glândulas) começam a aparecer na parte cicatrizada.

Técnica como a coloração com picro-Sírius, ensaio de quantificação de hidroxiprolina, coloração com tricômio de Masson, hibridização *in situ* de RNAm e a imunohistoquímica são utilizadas para avaliação da quantidade de fibras colágenas presentes em um tecido. A imunohistoquímica é muito utilizada, no entanto é um processo caro pela necessidade de anticorpos específicos. Uma técnica que apresenta baixo custo, é simples e confiável é a que utiliza o corante Sírius red, descrita por Junqueira e colaboradores (JUNQUEIRA et al., 1978 apud CUTTLE et al., 2005). Ela é baseada na birrefringência natural que o colágeno possui, resultante do modo de disposição de suas fibras e na presença do corante picro-Sírius quando visualizado por microscopia de polarização. Esta propriedade é destacada podendo assim se diferenciar os tipos de fibras colágenas. As fibras colágenas tipo III (jovens) por serem finas e frouxas apresentam a birrefringência com coloração verde, enquanto as fibras colágenas tipo I (maduras) são compactas e espessas apresentando coloração de amarelo intenso e vermelho (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

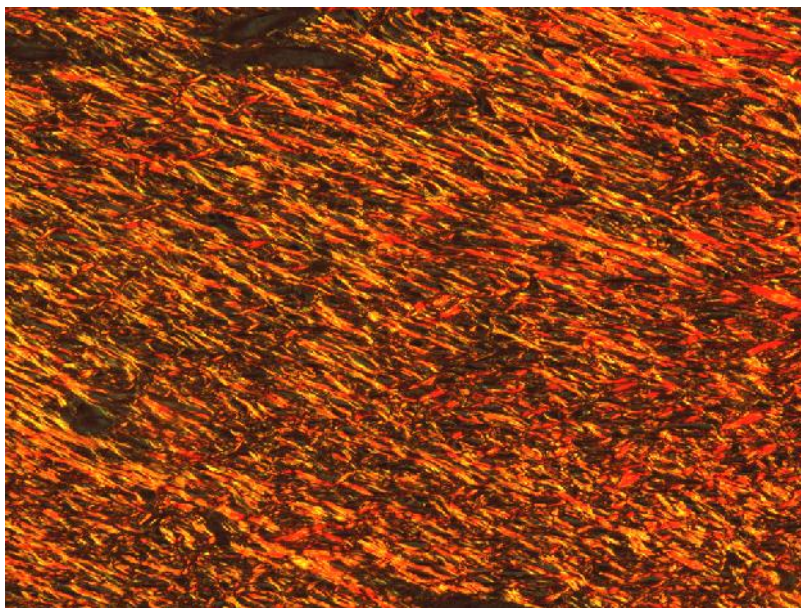


Figura 7. Fotomicrografia de corte histológico da ferida da pele de rato (coloração Síríus red, 20X). Verde: fibras colágenas tipo III. Amarelo/Vermelho: fibras colágenas tipo I. Foto: Fernanda Bueno.

Outros métodos envolvem a hidroxiprolina, um aminoácido que faz parte do colágeno e é utilizado na quantificação desta proteína (HOFMAN et al., 2011). Um dos ensaios mais utilizados é espectrofotométrico onde o reagente de Erlich (4-(N,N-dimetilamino) benzaldeído) está envolvido com a oxidação da hidroxiprolina. Foram diversas as modificações desse método e atua utilização para diversos fins, como quantificação na urina e tecidos (WOESSNER, 1961; STEGEMANN E STALDER, 1967; REDDY; ENWEMEKA, 1996). O maior avanço na técnica foi o uso do agente oxidante cloramina T o qual é neutralizado com ácido perclórico para reagir com o reagente de Erlich (WOESSNER, 1961). O preparo das amostras também é uma etapa crucial do método, onde deve haver uma hidrólise ácida para que ocorra a liberação de aminoácidos livres das proteínas e posteriormente neutralização da mesma. Autores como Reddy e Enwemeka (1996) substituíram a hidrólise ácida pela hidrólise básica nas amostras.

Ainda podem ser utilizados métodos cromatográficos para a determinação dos aminoácidos essenciais e não essenciais como no método de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato (PITC). Neste método a derivatização dos aminoácidos ocorre antes do processo de separação em coluna de fase reversa (BIDLINGMEYER; COHEN; TARVIN, 1984). A partir deste método é possível se determinar a quantidade de cada aminoácido essencial e não essencial presente na pele. Não se utiliza o método de derivatização com orto-ftaldialdeído (OPA) no caso de quantificação de hidroxiprolina, pois este método não é capaz de reagir com aminas secundárias que estão presentes na prolina e hidroxiprolina (MOLNÁR-PERL, 2005).

### 2.2.3 Fatores que afetam a cicatrização de feridas

As fases do processo de cicatrização devem ocorrer a partir de uma sequência e tempo de duração. Em um processo normal as três fases ocorrem: inflamação (0-3 dias), a proliferação (3-12 dias) e remodelação do tecido (3-6 meses) (KUMAR et al., 2007; HEMMATI et al., 2011). No entanto, o tempo destas fases pode ser aumentado quando se tem uma cicatrização de feridas deficiente ou uma falha. Estas falhas na cicatrização podem gerar feridas crônicas com atraso em uma das fases do processo cicatricial. Muitos são os fatores envolvidos em uma cicatrização prejudicada como a idade, genética, fumo, álcool, estado nutricional, obesidade, infecção do tecido, medicamentos, hipóxia, excesso ou deficiência de citocinas inflamatórias e imunossupressão (GUO; DIPIETRO, 2010; YOUNG; McNAUGHT, 2011).

Os fatores locais presentes na lesão e que podem afetar a cicatrização são a infecção e a oxigenação. A partir da lesão, micro-organismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp., entram na pele e acabam causando uma infecção no local. Uma ferida não tratada corretamente pode levar a formação de feridas crônicas, dificilmente havendo cura. O processo inflamatório, envolvendo o recrutamento de células, auxilia na remoção desses micro-organismos. Quando essa descontaminação não é adequada, a inflamação pode ser prolongada afetando a reparação tecidual (GUO; DIPIETRO, 2010).

O metabolismo das células depende do fator oxigenação. Inicialmente na ferida há alto consumo de oxigênio pelas células e com a interrupção do fluxo sanguíneo pela ausência dos vasos causados pela lesão, pode ocorrer a hipóxia local. Uma hipóxia temporária pode auxiliar na cicatrização de feridas, no entanto, o prolongamento desta hipóxia pode levar a um retardamento da mesma (BISHOP, 2008). A hipóxia gera um aumento de ROS, da angiogênese e dos fatores de crescimento no início da reparação tecidual. Em casos de hipovolemia o volume de sangue na circulação é insuficiente transportando uma menor quantidade de oxigênio e nutrientes para o tecido e células, retardando, assim, o processo de cicatrização.

A dificuldade na cicatrização de feridas pode ser uma consequência também de estados patológicos associados à diabetes *mellitus*, perturbações-imune, isquemia e estase venosa e, em ferimentos, tais como queimadura. Estas condições prejudicam a cicatrização de feridas, incluindo a homeostase, inflamação, angiogênese e deposição de matriz (GALIANO et al., 2004).

A diabetes *mellitus* é um problema de saúde pública levando a diminuição da qualidade de vida e altos custos financeiros devido à dificuldade em seu controle. A diabetes é considerada uma desordem hiperglicêmica crônica que apresenta aumento de infecções e graves alterações metabólicas (KOMESU et al., 2004). A doença afeta o metabolismo de células e tecidos impedindo uma boa cicatrização de feridas. A diabetes prejudica numerosos componentes presentes no processo de cicatrização, incluindo hemostasia e inflamação, deposição de matriz, angiogênese, produção de fatores de crescimento, além da migração e proliferação de queratinócitos e fibroblastos. 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 à 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). Muitas vezes ocorre devido à alta concentração de açúcar no sangue, ou mesmo por problemas cardiovasculares, promovendo uma hipóxia prolongada nos membros. Como visto anteriormente, a hipóxia e a hiperglicemia geram um estresse oxidativo que retarda a cicatrização. Além disso, as feridas diabéticas são propensas à infecção devido à insuficiência de granulócitos e da quimiotaxia. O estado geral da diabetes pode levar a um estresse oxidativo (causado por um excesso de ROS), hipóxia (com diminuição da angiogênese e neovascularização), neuropatias e desregulação na diferenciação e proliferação de queratinócitos e fibroblastos (GUO; DIPIETRO, 2010).

### 2.3 EXTRATOS VEGETAIS E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS

As plantas possuem um grande potencial no tratamento de feridas. Desde a antiguidade são utilizadas por diversas culturas em feridas, queimaduras e outros problemas de pele. Em algumas investigações o uso tradicional é considerado no momento da escolha da planta medicinal a ser estudada. Este uso de partes das plantas na cicatrização de feridas começou a ser estudada por cientistas com intuito de se obter um extrato vegetal, fração ou mesmo composto isolado capaz de modular os processos de reparação tecidual.

Na busca de agentes farmacológicos que atuem na cicatrização de feridas os testes *in vitro* são utilizados na avaliação preliminar da ação anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, sobre a proliferação e diferenciação de queratinócitos e fibroblastos, formação de colágeno e citotoxicidade (HOUGHTON et al., 2005). Deters e colaboradores (2001) avaliaram as cascas de *Hamamelis virginiana* L. e encontraram polissacarídeos (arabanas e arabinogalactanas) sem atividade em queratinócitos, no entanto, as proantocianidinas estimularam sobre a proliferação celular dos queratinócitos, sem que houvesse diferenciação dessas células.

Agyare e colaboradores (2011) avaliaram as folhas de *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Excell, nas quais isolaram e identificaram os elagitaninos: geranina e furosina. Estas substâncias induziram a proliferação celular de queratinócitos e fibroblastos, a diferenciação de queratinócitos e a produção de colágeno pelos fibroblastos.

Wang e colaboradores (2013) investigaram plantas utilizadas na medicina tradicional chinesa com uso na cicatrização de feridas. O extrato da casca da raiz de *Paeonia suffruticosa* Andrews mostrou aumento na viabilidade celular de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (pNHDF). Durante o estudo bioguiado isolaram o composto 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- $\beta$ -D-glicose (PGG) que estimulou a viabilidade celular e a proliferação de queratinócitos.

Na antiguidade a *Moringa oleifera* Lam. foi muito utilizada popularmente por romanos, gregos e egípcios. Atualmente é utilizada pela população em desordens de pele e devido ao seu valor nutricional (MUHAMMAD et al., 2013). Diversas são as ações farmacológicas descobertas da *M. oleifera*, tais como: antimicrobiana (KEKUDA et al., 2010), anti-inflamatória (MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007) e antioxidante (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009). Em estudo bioguiado realizado por Muhammad et al. (2013), a fração aquosa das folhas de *M. oleifera* promoveu estímulo da proliferação e viabilidade celular de fibroblastos. O composto majoritário encontrado nesta fração foi o vicenin-2 (apigenina-6,8-di-C-glicosídeo).

Os testes *in vitro* possuem diversas vantagens como rapidez, custo e seu uso para a realização de triagem de extratos, frações e substâncias isoladas. Devido a problemas éticos com o uso de animais e consequente diminuição do seu uso em ensaios, estes não são descartados por completo (TRAKUR et al., 2011). São muitos os fatores envolvidos para se comprovar a eficácia de um extrato, fração ou composto vegetal, sendo necessários testes pré-clínicos para comprovar a sua atividade farmacológica. Extratos e frações vegetais vêm sendo incorporados a formas farmacêuticas como géis, cremes, pomadas e membranas de liberação controlada para melhorar o processo de cicatrização. O estudo de produtos naturais como agente cicatrizante vem se intensificando devido às substâncias que podem influenciar em uma ou mais fases da cicatrização (SCHULZ et al., 2002).

Lopes e colaboradores (2005) utilizaram o extrato bruto (EB) da casca de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. incorporado a uma pomada *in vivo* e observaram que o EB estimulou a proliferação celular da epiderme verificando um aumento no número de células bloqueadas em metáfase na camada basal e a contração da ferida aos 7 dias de tratamento, além de efeito contra *Staphylococcus aureus* e atividade antioxidante. Hernandez e colaboradores (2010) avaliaram outra espécie, *S. adstringens*, e concluíram que a espécie é capaz de estimular os queratinócitos presentes na epiderme, mas não atuam estimulando a contração da ferida. Os autores atribuíram seus resultados à presença de taninos nas espécies.

Gupta et al. (2008) avaliaram uma pomada contendo extratos das folhas de *Hippophae rhamnoides* L. e *Aloe vera* L. e do rizoma de *Curcuma longa* L. O uso tópico levou ao aumento da proliferação celular e da síntese de colágeno, além de promover a angiogênese no local da ferida.

Geethalakshmi et al. (2013) avaliaram a *Sphaeranthus amaranthoides* Burm.f. na cicatrização de feridas com o uso de uma pomada contendo o extrato metanólico e outra contendo a fração enriquecida de flavonoides, comprovando seu uso popular. A presença de compostos fenólicos na formulação contribuiu para a melhora na contração da ferida, além de diminuir a área de re-epitelização.

Recentemente, um biomaterial de colágeno foi desenvolvido e caracterizado por Muthukumar e colaboradores (2013) incorporando extrato de *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. No ano seguinte, Muthukumar e colaboradores (2014) ao investigar a ação do biomaterial sobre feridas

cutâneas *in vivo* observaram que a *M. uniflorum* foi capaz de reduzir o processo inflamatório a partir da supressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS). Além disso, o extrato foi capaz de regular os fatores de crescimento presentes no processo cicatricial, tal como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que foi estimulado aos 4 dias de tratamento.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho avaliou a ação do extrato hidroetanólico das cascas de *Poincianella pluviosa* em queratinócitos e fibroblastos *in vitro*, com avaliação dos constituintes químicos, e a reparação celular de feridas cutâneas de ratos normoglicêmicos e diabéticos *in vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a ação do extrato bruto de *P. pluviosa* em queratinócitos e fibroblastos *in vitro*.

Realizar estudo bioguiado para a determinação de frações com atividade *in vitro*.

Pesquisar os possíveis compostos responsáveis pela atividade *in vitro*.

Avaliar a re-epitelização celular, a quantidade de células em mitose e a quantidade de fibras colágenas tipo I e III presente nas feridas de ratos normoglicêmicos e diabéticos quando tratadas com extrato bruto de *P. pluviosa*.

Avaliar as proteínas (SOD-1, SOD-2, VEGF, COX-2) presentes nas feridas de ratos normoglicêmicos e diabéticos quando tratadas com extrato bruto de *P. pluviosa*.

Avaliar a permeação cutânea do gel contendo extrato bruto de *P. pluviosa* nas feridas de ratos normoglicêmicos e diabéticos.

**Dessa forma a tese foi organizada em três capítulos na forma de artigos, a saber:**

- Capítulo 1. “Hydrolysable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its potential wound-healing properties: influence on *in vitro* cell physiology on human keratinocytes and dermal fibroblasts”.
- Capítulo 2. “Enhanced cutaneous wound healing *in vivo* by *Poincianella pluviosa* standardized crude extract”.
- Capítulo 3. Efeito do gel de *Poincianella pluviosa* na cicatrização de feridas em ratos com diabetes induzida pela estreptozotocina.

## ***CAPÍTULO 1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE IN VITRO***

---

---

Este capítulo consiste no artigo publicado na revista *Fitoterapia* (2014) 99: 252-260. (DOI: 10.1016/j.fitote.2014.10.007) sobre a avaliação da atividade cicatrizante *in vitro* de *Poincianella pluviosa* e a composição da fração detentora da atividade.

**Hydrolysable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and influence on *in vitro* cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts**

Fernanda Giacomini Bueno<sup>1</sup>, Gean Pier Panizzon<sup>1</sup>, Eneir Vieira Souza de Leite Mello<sup>2</sup>, Matthias Lechtenberg<sup>3</sup>, Frank Peterleit<sup>3</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1</sup>, Andreas Hensel<sup>3,\*</sup>

**Affiliation**

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, Brazil.

<sup>2</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brazil.

<sup>3</sup> University of Münster, Institute of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry, Corrensstr. 48, D-48149 Münster, Germany.

**\* Corresponding author.**

Tel. +49 251 8333380

Fax: +49 251 838341

e-mail: [ahensel@uni-muenster.de](mailto:ahensel@uni-muenster.de)

**Abstract**

Extracts from *Poincianella pluviosa* stem bark are used in traditional medicine of South America for its wound healing properties. For validation of this traditional use and for rationalizing a potential pharmaceutical development towards standardized preparations bioassay-guided fractionation of EtOH-water (1:1 v/v) extract (crude extract, CE) of *Poincianella pluviosa* bark was performed. HaCaT keratinocytes cell line and human primary dermal fibroblasts (pNHDF) were used as *in vitro* systems. Significant stimulation of mitochondrial activity was found for CE on both cell types, which caused a strong increase of cell proliferation of keratinocytes. Fractionation of CE over Sephadex LH20 revealed two inactive fractions (FA and FB) and an active fraction FC, which was further fractionated by MPLC into 4 subfractions. Subfraction FC1 increased mitochondrial activity and proliferation of keratinocytes and dermal fibroblasts in a dose dependent manner (10 to 100 µg/mL) and did not show necrotic cytotoxicity on keratinocytes (LDH release assay). FC1 was investigated by ESI-MS/MS and solid-state <sup>13</sup>C NMR which confirmed the presence of various polyphenols and hydrolysable tannins.

MS studies suggests the presence of pyrogallol (1), gallic acid (2), gallic acid methyl ester (3), ellagic acid (4), corilagin (5), 1,4,6-tri-*O*-galloyl-glucose (6), tellimagrandin I (7), 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-glucose (8), mallotinic acid (9), tellimagrandin II (10), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-glucose (11), geraniin (12), and mallotusinic acid (13).

**Keywords:** *Poincianella pluviosa*, keratinocytes, dermal fibroblasts, polyphenols, tannins.

## 1. Introduction

Wounds have a tremendous impact on the healthcare economy and intensified research for improvement of wound-healing is still a major goal. While in Europe and U.S. acute wounding is mostly treated by systematic disinfection and surgical procedures, less developed countries rely on the topical application of wound-healing plant extracts or natural compounds [1]. On the other side chronic wounds still represent a major health burden and drain on healthcare resources in the developed and undeveloped countries [2]. In many cases this plant-based preparations are based on traditional local medicine. The treatment and healthcare by using plant extracts with wound healing properties is inexpensive and can be managed easily by basically trained health workers [1]. Most of these medicinal plants have been used for a long time and are assessed to be cheaper and safer than isolated or chemical synthesized active compounds. Therapeutic strategies for chronic wounds have been published and are implemented in clinical therapy in developed countries but in many cases the success of such therapies is still very limited and many patients are suffering for chronic wounds over long time periods. In U.S. nearly 6 million people are estimated to suffer from unhealed wounds [3], and cost of this problem reaches about ten billion dollars annually [4]. The skin forms a barrier that protects the body from intentional or accidental damage. Skin wounds are essentially the disruption of functional continuity of cells and tissues of the skin at the site of injury, and can be caused by physical, chemical, microbiological or immunological insults, which can compromise its function [5]. The integrity of the tissue can be reestablished by the wound-healing process, which is complex and involves several biological events, including vascular and cellular changes, epithelial proliferation, collagen synthesis and deposition, fibroblast proliferation and migration, revascularization, and wound contraction. The normal process involves three stages: inflammation, proliferation, and tissue remodeling. However, this process may be impaired and the healing time extended by some factors like severity and type of wounds, microbial infection, conditions of health, medications, sex, age, stress situations, immunity status, obesity and environment around the site of the wounds.

The need to search for compounds that have evident ability to accelerate the healing process is obvious. Natural products can play an important role in this sense, acting in stimulation of cellular proliferation and differentiation of keratinocytes [6,7] and dermal fibroblasts [8], on induction of collagen synthesis [7] and improvement of innate immune response in the wound area. Especially

polyphenols and polysaccharides have been published to act specifically on the relevant skin cells [9-11]. The research for new products is important for discovering new lead compounds.

The genus *Caesalpinia* consists worldwide of about 500 species [12] and many medical uses of species from the genus are related to antimalarial [13], antiulcer [14], anti-inflammatory [15], or wound healing activity [16,17]. *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz is native from Brazil, common known as "sibipiruna" or "false Brazil wood", and is also reported under its synonyms *Caesalpinia peltophoroides* (Benth.), *Caesalpinia pluviosa* DC., and *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) GP Lewis. [18]. In Brazil is primarily found in the Atlantic Forest and Pantanal region [19] and is used in afforestation of Brazilian cities. The popular use of the bark of *P. pluviosa* found in Bolivia in cases of dysentery [13]. Recently, it has been shown that an extract of *P. pluviosa* showed antimalarial activity [20]. Concerning the phytochemical composition of the species presence of sterols, tannins, flavonoids and saponins as determined by colorimetric group determinations has been confirmed, while alkaloids were found to be absent [21]. The essential oil of the flowers was shown to be dominated by long chain alkanes [22]. The flowers are described to contain brevifoincarboxylate, 5-hydroxymethylfurfural, luteolin, gallic acid, gallic acid ethyl ester, sitosterol, glucosylated sitosterol and squalene [23]. From the stem bark of *C. pluviosa* gallic acid, gallic acid ethyl ester, rhuschalcone VI, lupeol, betulinic acid and stigmasterol have been isolated [24].

The aim of the following study was the evaluation of a hydroalcoholic extract (CE) from the stem bark of *P. pluviosa* on potential wound healing activity by determination of its influence on cell *in vitro* physiology of human skin cells. Especially viability and proliferation of human keratinocytes as key players of human epidermis was to be investigated besides the activity of the extract and its fractions against dermal fibroblasts, representing the major cells from the skin dermis. Additionally, fractions obtained were to be investigated phytochemically by ESI-MS/MS and solid- state  $^{13}\text{C}$  NMR analysis.

## 2. Materials and Methods

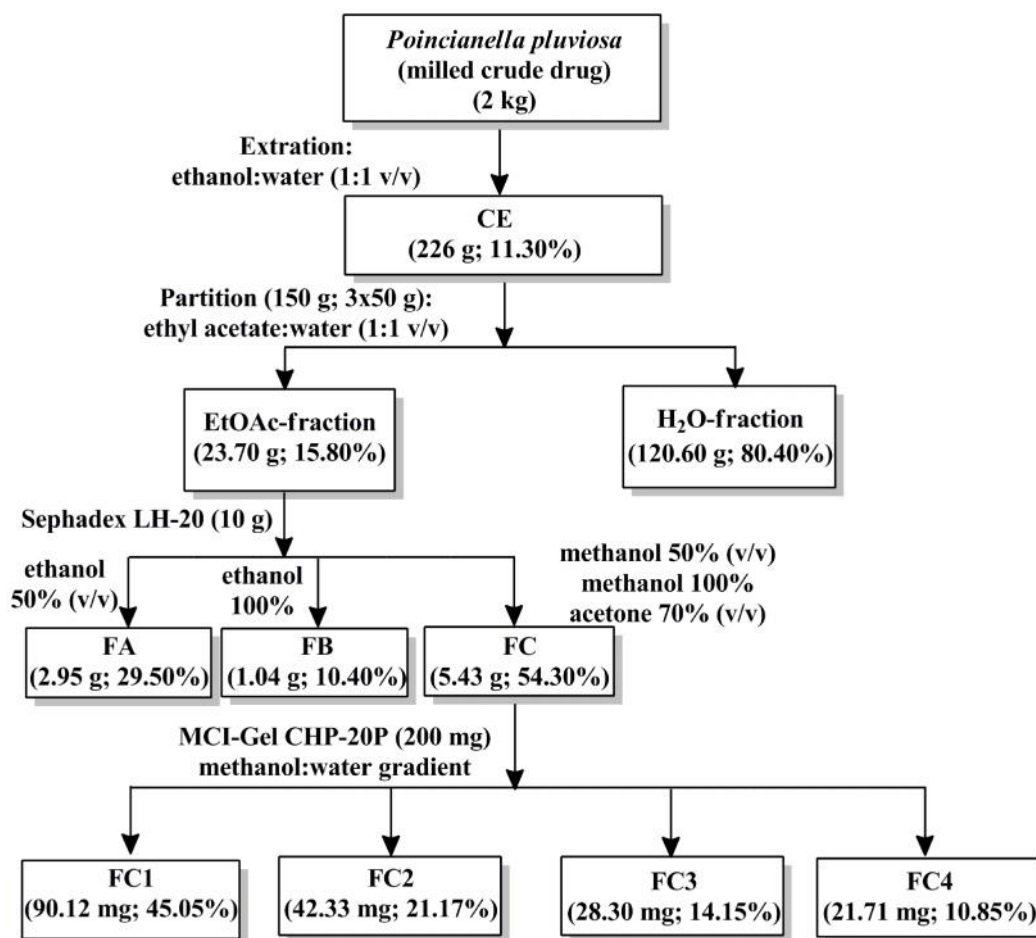
### 2.1 General experimentation procedures

If not stated otherwise all chemicals were purchased from Sigma (Deisenhofen, Germany) or VWR (Darmstadt, Germany). Bark of *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz was collected at the Universidade Estadual de Maringá Campus, Maringá, Brazil, and identified by Prof. Dr. Cássia Mônica Sakuragui. Voucher species are deposited in the herbarium of the Universidade Estadual de Maringá and Universidade Federal do Rio de Janeiro under numbers 12492 HUEM and RFA 39925, respectively.

## 2.2 Extraction and Fractionation (Figure 1)

Dried and milled bark material (2 kg) was extracted with 20 L of EtOH-water (1:1 v/v) by Ultra-Turrax® UTC115KT (Ika® Works, Wilmington, NC) for  $3 \times 5$  min at 40 °C. The resulting extract was filtered (Mesh 0.130), concentrated under reduced pressure and lyophilized to yield 226 g (11.3%, related to the starting material) of the crude extract, named in the following as CE CE (3x50g) were partitioned ten times between ethyl acetate (EtOAc):water (1:1 v/v; 3x1 L). After separation of the two phases the respective solvents were removed under reduced pressure and the extracts were lyophilized to yield the EtOAc-fraction (EAF, 23.70 g) and H<sub>2</sub>O-fraction (WF, 120.60 g). 10 g of EAF were dissolved in ethanol 50% (v/v) and fractionated on Sephadex® LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden, 650 × 50 mm) using a step gradient of 1500 mL ethanol 50% (FA, 2.95 g), 2200 mL ethanol 100% (FB, 1.04 g), and FC (5.43 g) was obtained by adding: 2000 mL methanol 50% (0.3 g), 2000 mL methanol 100% (0.5 g), and 3000 mL acetone 70% (4.63 g). 200 mg of fraction FC were fractionated on MCI-Gel® CHP-20P stationary phase (Mitsubishi Kasei Corporation, Tokyo, Japan, 75 - 150 µm, 450 Å, 500 × 25 mm) by using a linear gradient of methanol and water as mobile phase (20% MeOH  $\Rightarrow$  100% over 120 min at a flow rate of 5 mL/min) with a Waters 510 HPLC pump. This chromatographic separation yielded 4 subfractions FC1 (225 mL, 90.12 mg), FC2 (30 mL, 42.33 mg), FC3 (55 mL, 28.50 mg), and FC4 (215 mL, 21.71 mg).

All subfractions were monitored by analytical TLC on silica gel 60 F<sub>254</sub> aluminium sheets (10 × 20 cm) using ethylacetate:water:formic acid (90:5:5; v/v/v) as mobile phase; detection was performed at daylight,  $\lambda$  366 and 254 nm, and after spraying with FeCl<sub>3</sub> (2% in ethanol). The subfractions were combined based on the composition and pattern on the TLC. The respective solvents were removed under reduced pressure and the fractions were lyophilized. The total polyphenol (TP) and total tannin (TT) contents were determined using a modified Folin-Ciocalteu method [25,26].

**Figure 1.** Bioassay-guided fractionation of EtOH-water extract from *Poincianella pluviosa*.

### 2.3 Solid-state $^{13}\text{C}$ NMR and ESI-MS/MS

NMR spectra were obtained on a NMR Varian Mercury Plus 300BB spectrometer (Varian, USA) probe CPMAS 7 mm, a frequency of 75.45 MHz for  $^{13}\text{C}$ , using FC1 in solid state. Each proton preparation pulse was 50  $\mu\text{s}$  at  $90^\circ$ , with spun 100 Hz and followed by 1000  $\mu\text{s}$  of data acquisition and 1 s of recovery delay. Transients sequence was 7168. The spectra of the compounds were analyzed and compared to literature data.

Micromass Quattro *micro*<sup>TM</sup> API benchtop triple quadrupole mass spectrometer equipped with a Z-spray electrospray ionisation (ESI) source (Waters, Milford, MA, USA) operating in negative mode was used. MassLynx<sup>TM</sup> software (version 4.0, Waters, Milford, MA, USA) was used for data acquisition and processing. Sample containing 500 ng/mL of FC1 was direct injected into MS source. Capillary voltage was set to 3.0 kV, cone to 35 V, and extraction cone to 2 V. Source temperature was 100  $^\circ\text{C}$ , desolvation temperature 250  $^\circ\text{C}$ , cone gas flow was 50 L/h, and desolvation gas flow was 500 L/h. Scan time was 0.3 s with an interscan time of 0.02 s. Argon was used as collision gas (collision energy from 15-30 eV). Preliminary analysis of MS was carried out using full scan, and the compounds were identified by MS/MS fragments.

### 2.4 HaCaT keratinocytes and fibroblasts *in vitro* cell culture

Ethical Committee of University of Münster, Germany (acceptance #2006-117-f-S) approved the studies. Primary natural dermal fibroblasts (pNHDF) were obtained from surgical resectates of Caucasian subjects by University Hospital of Münster (Department of Dermatology and Paediatrics, Münster, Germany). The isolation and propagation of dermal fibroblasts from the dermis was performed according [9]. HaCaT keratinocytes were provided by Prof. Dr. Norbert E. Fusenig (DKFZ, Heidelberg, Germany) and cultivated in DMEM high glucose medium, supplemented with FCS (10%), penicillin/streptomycin solution (1%), glutamine (1%) and non-essential amino acids (1%) (PAA, Pasching, Austria). pNHDF and HaCaT keratinocytes were cultivated at 37  $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  and 37  $^\circ\text{C}$ , 8%  $\text{CO}_2$ , respectively.

Functional testing was performed with cells in FCS-free medium (HaCaT keratinocytes: MCDB 153 complete, Biochrom, Berlin, Germany; pNHDF: MEM high glucose, SerEx® (10%) and L-glutamine (1%), PAA Pasching, Austria). *In vitro* tests were performed concerning mitochondrial activity by MTT test [27], mitogenic cell proliferation rate by BrdU incorporation assay [28], and release of lactate dehydrogenase (LDH) [8] against untreated control and 5% FCS treated cells as positive control [29].

## 2.5 Statistical analysis

Software Statistica® 8.0 (StatSoft Copyright, Inc. 1984-2007) was used for statistical analysis. Significant differences were determined by analysis of variance unilateral (one-way ANOVA-Tukey) test for multiple comparisons, and considered  $p < 0.05$  (\*) as significant.

## 3. Results and Discussion

For *in vitro* investigation of a potential activity of *P. pluviosa* bark extract on human skin cells HaCaT keratinocytes and primary natural human dermal fibroblasts (pNHDF) were used to investigate the influence of an EtOH-water extract (1:1) (CE) on cell physiology. While cellular viability was evaluated by MTT assay [27], cellular proliferation was quantified by BrdU incorporation ELISA [28]. CE stimulated cell viability and mitochondrial activity of keratinocytes as well as of pNHDF in the concentration range of 10 to 50  $\mu\text{g/mL}$  (Table 1).

**Table 1.** Influence of CE and subfractions FA, FB and FC on cellular dehydrogenase activity (MTT assay) and mitogenic cell proliferation (BrdU assay) of HaCaT keratinocyte cell line and primary dermal fibroblasts (pNHDF) at 1, 10, 25, 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$ . The results are expressed as mean  $\pm$  SD. Values are mean of 3 independent experiments with  $n = 8$  replicates. NC: untreated negative control; PC: positive control (5% FCS); n.p.: not performed; \*  $p < 0.05$  compared to NC.

| Cell viability (MTT assay)      |           |              |               |                  |               |               |               |               |
|---------------------------------|-----------|--------------|---------------|------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Fraction                        | Cell Type | NC           | PC            | 1                | 10            | 25            | 50            | 100           |
|                                 |           |              |               | $\mu\text{g/mL}$ |               |               |               |               |
| CE                              | HaCaT     | 100 $\pm$ 15 | 125 $\pm$ 05* | 98 $\pm$ 12      | 110 $\pm$ 5*  | 138 $\pm$ 11* | 124 $\pm$ 10* | 105 $\pm$ 11  |
|                                 | pNHDF     | 100 $\pm$ 19 | 133 $\pm$ 10* | 94 $\pm$ 10      | 110 $\pm$ 9*  | 134 $\pm$ 9*  | 120 $\pm$ 9*  | 97 $\pm$ 9    |
| FA                              | HaCaT     | 100 $\pm$ 17 | 206 $\pm$ 14* | 76 $\pm$ 6*      | 89 $\pm$ 12*  | 67 $\pm$ 6*   | n.p.          | n.p.          |
|                                 | pNHDF     | 100 $\pm$ 13 | 135 $\pm$ 16* | n.p.             | 71 $\pm$ 11*  | 86 $\pm$ 16*  | 89 $\pm$ 18*  | 75 $\pm$ 20*  |
| FB                              | HaCaT     | 100 $\pm$ 08 | 206 $\pm$ 14* | 100 $\pm$ 10     | 103 $\pm$ 08  | 74 $\pm$ 10   | n.p.          | n.p.          |
|                                 | pNHDF     | 100 $\pm$ 09 | 163 $\pm$ 6*  | n.p.             | 89 $\pm$ 8*   | 83 $\pm$ 9*   | 80 $\pm$ 10*  | 77 $\pm$ 04*  |
| FC                              | HaCaT     | 100 $\pm$ 12 | 189 $\pm$ 16* | 61 $\pm$ 13*     | 95 $\pm$ 10   | 120 $\pm$ 13* | 158 $\pm$ 09* | 189 $\pm$ 10* |
|                                 | pNHDF     | 100 $\pm$ 16 | 163 $\pm$ 6*  | n.p.             | 118 $\pm$ 05* | 162 $\pm$ 6*  | 158 $\pm$ 8*  | 139 $\pm$ 9*  |
| Cell proliferation (BrdU assay) |           |              |               |                  |               |               |               |               |
| Fraction                        | Cell Type | NC           | PC            | 1                | 10            | 25            | 50            | 100           |
|                                 |           |              |               | $\mu\text{g/mL}$ |               |               |               |               |
| CE                              | HaCaT     | 100 $\pm$ 10 | 110 $\pm$ 3*  | 85 $\pm$ 3*      | 99 $\pm$ 7    | 126 $\pm$ 8*  | 147 $\pm$ 7*  | 119 $\pm$ 10* |
|                                 | pNHDF     | 100 $\pm$ 13 | 259 $\pm$ 9*  | 71 $\pm$ 13*     | 58 $\pm$ 3*   | 19 $\pm$ 13*  | 14 $\pm$ 6*   | 12 $\pm$ 8*   |

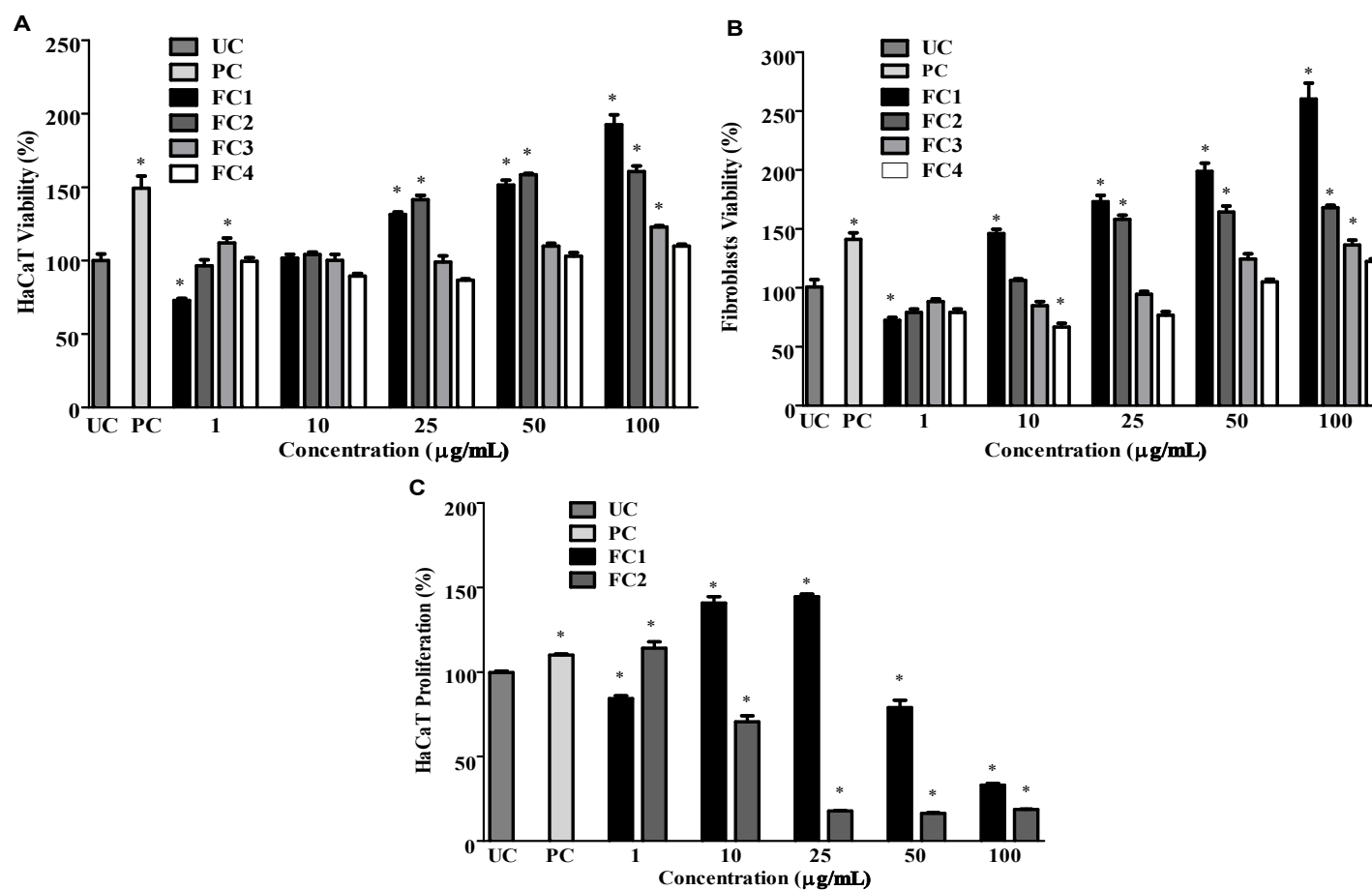
It was interesting that CE also stimulated cellular proliferation of keratinocytes, while in contrast proliferation of dermal fibroblasts was dramatically decreased by CE in a concentration-dependent manner (Table 1). This contradictory result for the two different cell types can only be correlated with a potential triggering effect of CE towards cellular differentiation of dermal fibroblasts, which could explain the stop of proliferation by increased metabolic activity, but decreased mitogenic proliferation. Bioassay-guided fractionation was performed by chromatography of CE on Sephadex LH20, using different mobile phases. Total fractions obtained from the different solvents were named as FA, FB, and FC and investigated concerning their respective activity against the skin cells. While FA and FB were inactive or exerted slightly toxic effects against keratinocytes and dermal fibroblasts within MTT assay, fraction FC showed strong stimulation of viability for both cell types (Table 1).

FC was further fractionated by reversed phase chromatography on MCI gel using a MeOH-water gradient, which resulted in the 4 subfractions FC1 to FC4. *In vitro* cell testing indicated FC1 and FC2 to be strong stimulators of mitochondrial activity of keratinocytes (Figure 2A) and dermal fibroblasts (Figure 2B), while FC3 and FC4 were inactive or even toxic.

Investigation of FC1 and FC2 on the influence on cellular proliferation of HaCaT keratinocytes (Figure 2C) indicated FC1 to induce mitogenic cell proliferation significantly at 10 to 25 µg/mL, while FC2 inhibited cell proliferation. Therefore FC1 is assessed as a strong stimulant of epidermal proliferation, while FC2 seems to trigger cells into cellular differentiation. Quantification of LDH release from keratinocytes by FC1 revealed no significant differences to the respective control groups, indicating the absence of necrotic cell activity in the range from 1 to 100 µg/mL (data not shown). From this bioactivity-guided fractionation it can be concluded that CE, FC, and FC1 are able to influence the cell physiology of skin cells significantly. It seems interesting that proliferation (but not the viability!) of fibroblasts was decreased by the extract CE, while the proliferation of keratinocytes was significantly increased. This phenomenon can be interpreted in a way that the extract stops the mitogenic cell cycle of NHDF but triggers the cells into a stage of higher metabolic activity by induction of cellular differentiation, e.g. for production and secretion of polymers for formation of the extracellular matrix. Several recent publications indicate similar effects of natural products against the two different cell types of the skin [7,11] and showed that keratinocytes and fibroblasts probably due the existence of different cellular targets act completely different on exogenous stimulus.

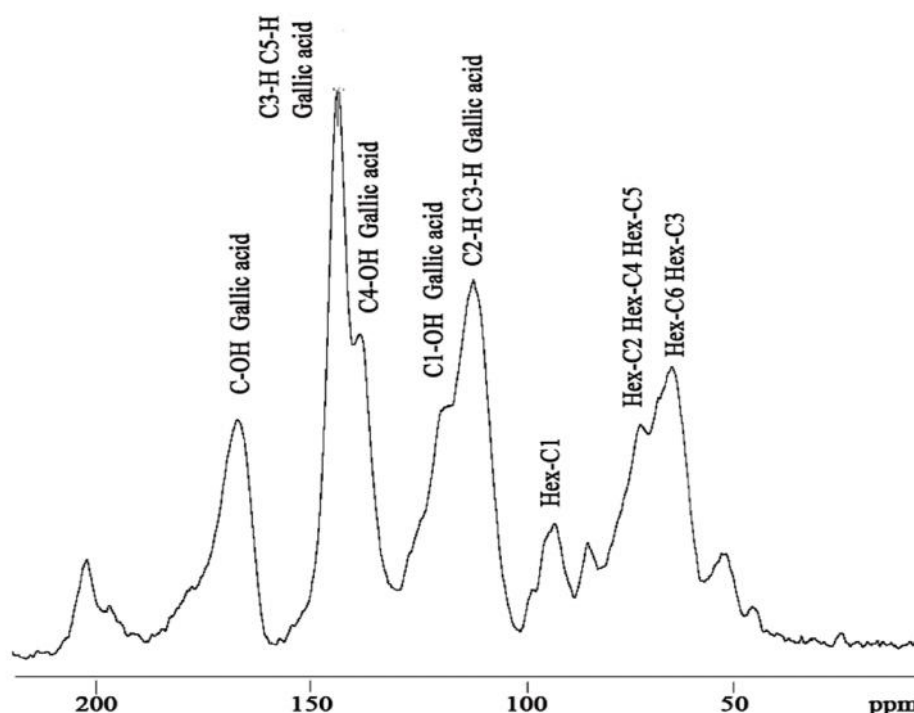
To obtain a deeper insight into the chemical composition of the active fractions analytical studies were performed. The polyphenol content of the EtOH-water extract CE of *P. pluviosa* was determined to be 22.7% (w/w) by UV-spectrometry [26]. FC1 showed 54.12%±1.82 (mean±SD) of TP and 54.09%±1.83 of TT.

**Figure 2.** Influence of FC1, FC2, FC3, and FC4 on cellular dehydrogenase activity (MTT assay) of HaCaT keratinocytes (A) and dermal fibroblasts pNHDF (B). Influence of FC1 and FC2 on mitogenic cell proliferation (BrdU assay) of HaCaT keratinocytes is displayed in (C). The results are expressed as mean  $\pm$  SD. Values are mean of 3 independent experiments,  $n = 8$  replicates. NC: untreated negative control; PC: positive control 5% FCS; \*  $p < 0.05$  compared to NC.



FC1 was investigated by solid-state  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy (Figure 3). The respective signals indicate the presence of aromatic *ortho*-orientated CH carbons at  $\text{C}_2$  and  $\text{C}_3$  at 111 ppm. At 143 ppm hydroxyl groups relative to  $\text{C}_3$  and  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_1$ , and  $\text{C}_4\text{-OH}$  at 121 and 135 ppm, respectively, were found [30]. A carboxyl group found at 168 ppm is characteristic for gallic acid, a precursor for some hydrolysable and condensed tannins. The  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum shows the presence of a monomeric sugar between 50-100 ppm. C-atoms from hexose (Hex) moiety is characterized by signals at 92 ppm and those from the other five carbons in the region between 62 and 73 ppm: 70 ppm (Hex- $\text{C}_2$ ), 62 ppm (Hex- $\text{C}_3$ ), 70 ppm (Hex- $\text{C}_4$ ), 72.9 ppm (Hex- $\text{C}_5$ ) and 64 ppm (Hex- $\text{C}_6$ ) (Figure 2) [31,32]. The active fraction FC1 was further analyzed by ESI-MS/MS and the structural information was obtained through interpretation of the fragmentation spectra recorded by MS and MS/MS experiments. Table 2 displays the various  $m/z$  values obtained in the negative ionisation mode  $[\text{M-H}]^-$  and the proposed compounds based on comparison with MS data bases and related literature. Figure 4 shows the structural features of the tentatively identified compounds. The compounds (1), (2), and (4) at  $m/z$  125, 169 and 301 were characterized as pyrogallol, gallic acid and ellagic acid, respectively [33-35]. Compound (3) was correlated with the structure of gallic acid methyl ester (methyl gallate) with  $m/z$  183 and typical fragments observed for subsequent demethylation ( $m/z$  169) followed by decarboxylation ( $m/z$  125) [33]. Further on MS/MS data indicated the presence of ellagitannins and gallotannins. By using the respective MS fragmentation data and published literature the following compounds might be part of the present in the fraction, whereby the stereochemical aspects can not be shown by the MS experiments, but are deduced from already published compounds.  $\beta$ -1-*O*-galloyl-3,6-(*R*)-hexahydroxydiphenoyl-D-glucose (corilagin) at  $m/z$  633 (5) [36], 1,4,6-tri-*O*-galloyl-glucose at  $m/z$  635 (6) [37], 1,3-digalloyl-4,6-hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (tellimagrandin I) at  $m/z$  785 (7) [38], 1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl-glucose at  $m/z$  787 (8) [37], mallotinic acid at  $m/z$  801 (9) [39], 1,2,3-trigalloyl-4,6-hexahydroxydiphenoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (tellimagrandin II) at  $m/z$  937 (10) [40], 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl-glucose at  $m/z$  939 (11) [37], geraniin at  $m/z$  951 (12) [41], and mallotusinic acid at  $m/z$  1119 (13) [39]. This is the first time that hydrolysable tannins are described for *P. pluviosa*.

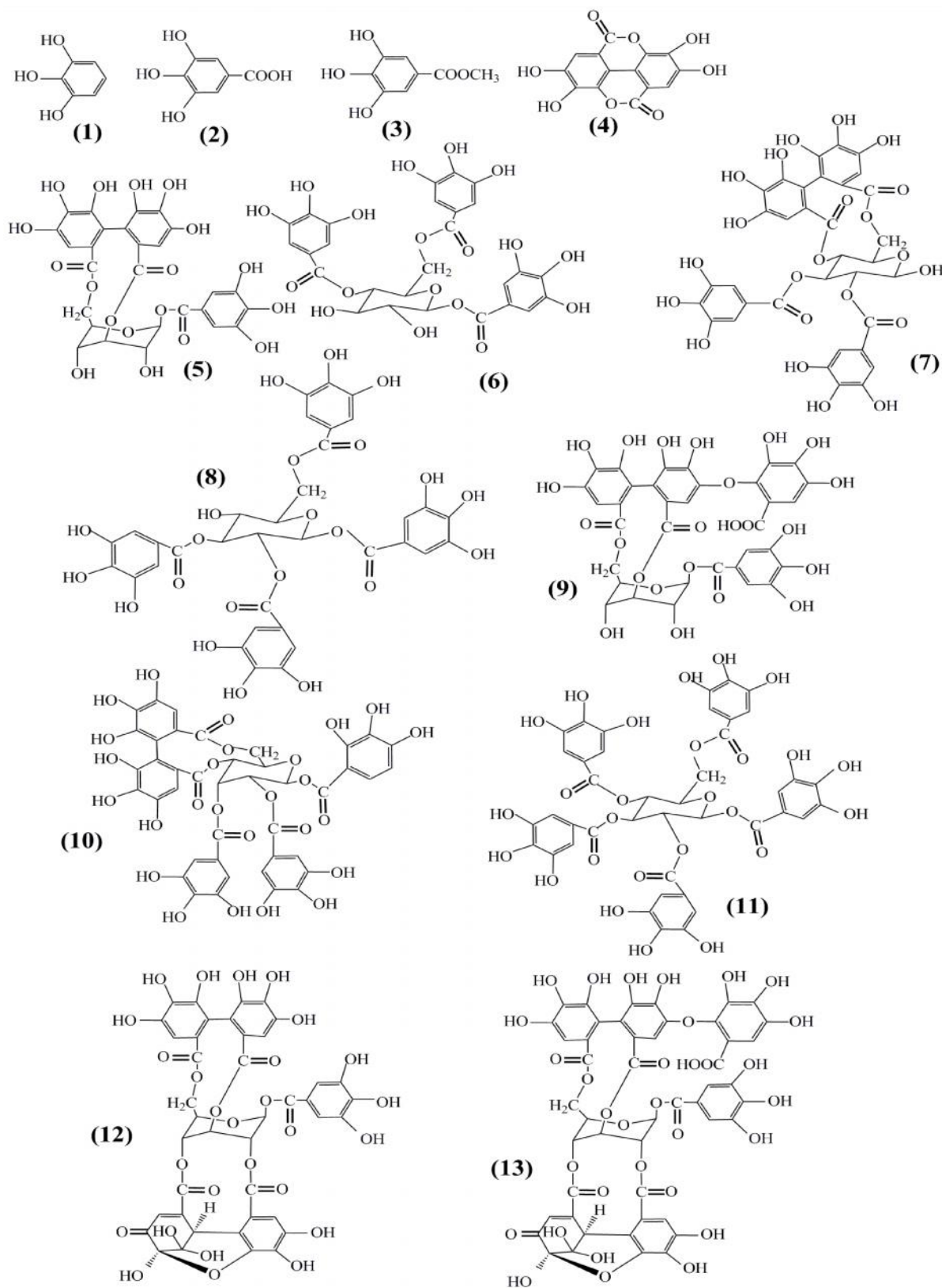
**Figure 3.** Solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of FC1 indicating signals typical for gallic acid and hexose (Hex).



**Table 2:** MS and MS/MS data of compounds detected in subfraction FC1 obtained from the stem bark of *P. pluviosa* and correlation to published data from literature.

| Compound | Compound Name                              | Elemental Composition                     | $[\text{M-H}]^-$ | MS/MS                                             | Literature |
|----------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------|------------|
| 1        | Pyrogallol                                 | $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$          | 124.9            | 53, 81, 97, 107                                   | [35]       |
| 2        | Gallic acid                                | $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$          | 169.0            | 53, 81, 97, 107, 125                              | [34]       |
| 3        | Gallic acid methyl ester                   | $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$          | 183.2            | 78, 95, 124, 168                                  | [33]       |
| 4        | Ellagic acid                               | $\text{C}_{14}\text{H}_6\text{O}_8$       | 301.2            | 185, 229, 257, 284                                | [34]       |
| 5        | Corilagin                                  | $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{O}_{18}$ | 633.0            | 169, 275, 301, 481                                | [36]       |
| 6        | 1,4,6-Tri- <i>O</i> -galloyl-glucose       | $\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_{18}$ | 635.1            | 125, 169, 221, 271, 313, 423, 465, 483            | [37]       |
| 7        | Tellimagrandin I                           | $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{O}_{22}$ | 785.1            | 125, 169, 275, 301, 483, 615, 633                 | [38]       |
| 8        | 1,2,3,6-Tetra- <i>O</i> -galloyl-glucose   | $\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_{22}$ | 786.9            | 125, 169, 295, 403, 421, 447, 465, 617, 635       | [37]       |
| 9        | Mallotinic acid                            | $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{O}_{23}$ | 801.1            | 301, 463, 633, 757                                | [39]       |
| 10       | Tellimagrandin II                          | $\text{C}_{41}\text{H}_{30}\text{O}_{26}$ | 936.8            | 125, 169, 275, 301, 483, 633, 785, 919            | [40]       |
| 11       | 1,2,3,4,6-Penta- <i>O</i> -galloyl-glucose | $\text{C}_{41}\text{H}_{32}\text{O}_{26}$ | 938.9            | 125, 169, 329, 447, 601, 617, 769, 787            | [37]       |
| 12       | Geraniin                                   | $\text{C}_{41}\text{H}_{28}\text{O}_{27}$ | 951.2            | 169, 301, 445, 481, 633, 757, 783, 933            | [41]       |
| 13       | Mallotusinic acid                          | $\text{C}_{48}\text{H}_{32}\text{O}_{32}$ | 1119.3           | 125, 169, 301, 445, 633, 757, 801, 933, 951, 1074 | [39]       |

**Figure 4.** Structural features of compounds from fraction FC1 from the stem bark of *Poincianella pluviosa*.



From this point of view FC1 can be assessed as the fraction from *P. pluviosa* responsible for the stimulatory activity of keratinocytes and dermal fibroblasts due to the content of hydrolysable tannins. Similar ellagitannins (geraniin (**12**), corilagin (**5**), furosin) with strong wound-healing properties have recently been documented as the active compounds in aqueous extracts from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell [7] with strong stimulating effects against human keratinocytes and dermal fibroblasts. Also for pentagalloylglucose (**11**) reports have been published on potential wound healing properties [4]: this compound was proven to be the main constituent of *Paeonia suffruticosa*, widely used in Traditional Chinese Medicine for its skin activity. Also for trigalloyl-glucose and gallic acid from *Terminalia chebula* *in vitro* bioactivity against skin cells has been shown [42]. From this point of view the phytochemical composition of FC1 from *P. pluviosa* can easily be correlated towards a rationalized activity for wound healing, also by consideration of the positive outcome of several *in vivo* studies in rats using polyphenol-enriched extract preparations [43]. From this point of view the traditional use of extracts from *P. pluviosa* stem bark for wound healing seems to be justified [16, 17].

#### 4. Conclusions

The results in the present study indicate that hydroalcoholic extract or fraction FC1 from the stem bark of *P. pluviosa* act as stimulant of human keratinocytes and dermal fibroblasts *in vitro*. The influence on the cell physiology of skin cells and the pharmacodynamics properties of the extract is due to the high amounts of hydrolyzable tannins. This increase in cellular proliferation of skin cells suggests that epidermal barrier formation can be accelerated by the use of *P. pluviosa* and therefore the extract or the fraction FC1 might be suitable for potential wound healing preparations.

#### Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors thank Dr. med. Dirk Pappai, (UKM, Department of Dermatology, Münster, Germany) for support with the dermal resectates. We are grateful to CNPq for a fellowship awarded to F.G. Bueno (Grant # 202204/2012-0).

## References

- 1 Mahé A, Faye O, N'Diaye HT, Konaré H, Kéita S, Traoré AK, Hay R. Definition of an algorithm for the management of common skin diseases at primary health care level in sub-Saharan Africa. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2005;99: 39-47.
- 2 Harding KG, Morris HL, Patel GK. Science, medicine and the future: healing chronic wounds. *BMJ* 2002; 324:160-163.
- 3 Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. *J Ethnopharmacol* 2007; 114:103-113.
- 4 Wang R, Lechtenberg M, Sendker J, Petereit F, Deters A, et al. (2013) Wound-healing plants from TCM: *in vitro* investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia* 84: 308-317.
- 5 Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE. Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an *in vitro* study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* 2010; 316:1271-1281.
- 6 Deters AM, Lengsfeld C, Hensel A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 2005; 102:391-399.
- 7 Agyare C, Lechtenberg M, Deters A, Petereit F, Hensel A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine* 2011; 18:617-624.
- 8 Deters A, Petereit F, Schmidgall J, Hensel A. N-Acetyl-D-glucosamine oligosaccharides induce mucin secretion from colonic tissue and induce differentiation of human keratinocytes. *J Pharm Pharmacol* 2008; 60:197-204.
- 9 Zippel J, Deters A, Pappai D, Hensel A. A high molecular arabinogalactan from *Ribes nigrum* L.: influence on cell physiology of human skin fibroblasts and keratinocytes and internalization into cells via endosomal transport. *Carbohydr Res* 2009; 344:1001-1008.
- 10 Agyare C, Asase A, Lechtenberg M, Niehues M, Deters A, Hensel A. An ethnopharmacological survey and *in vitro* confirmation of ethnopharmacological use of medicinal plants used for wound healing in Bosomtwi-Atwima-Kwanwoma area, Ghana. *J Ethnopharmacol* 2009; 125:393-403.
- 11 Deters A, Zippel J, Hellenbrand N, Pappai D, Possemeyer C, Hensel A. Aqueous extracts and polysaccharides from Marshmallow roots (*Althaea officinalis* L.): cellular internalisation and stimulation of cell physiology of human epithelial cells *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 2010; 127:62-69.
- 12 Zanin JL, de Carvalho BA, Martineli PS, dos Santos MH, Lago JH, Sartorelli P, Viegas C, Jr., Soares MG. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpiniaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules* 2012; 17:7887-7902.
- 13 Deharo E, Bourdy G, Quenevo C, Munoz V, Ruiz G, Sauvain M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *J Ethnopharmacol* 2001; 77:91-98.
- 14 Bacchi EM, Sertie JA, Villa N, Katz H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and

- Caesalpinia ferrea*. Planta Med 1995; 61:204-207.
- 15 Washiyama M, Sasaki Y, Hosokawa T, Nagumo S. Anti-inflammatory constituents of *Sappan Lignum*. Biol Pharm Bull 2009; 32:941-944.
  - 16 An K, Nayeem N. Formulation and evaluation of the methanolic extract of *Caesalpinia pulcherrima* leaves for its wound healing activity. Asian J Pharmaceut ResHealth Care 2012; 4:90-94.
  - 17 Oliveira AF, Batista JS, Paiva ES, Silva AE, Farias YJMD, Damasceno CAR, Brito PD, Queiroz SAC, Rodrigues CMF, Freitas CIA. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. Rev Bras Pl Med 2010; 12:302-310.
  - 18 Tropicos [Internet] Missouri Botanical Garden. [last acess 2014 Jan 15]. Available from: <http://www.tropicos.org/Name/100383047>.
  - 19 Pontes CA, Corte VB, Borges EEL, Silva AG, Borges CG. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Sibipiruna). Revista Árvore 2006; 30:43-48.
  - 20 Kayano AC, Lopes SC, Bueno FG, Cabral EC, Souza-Neiras WC, Yamauchi LM, Foglio MA, Eberlin MN, Mello JC, Costa FT. *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. Malar J 2011; 10:112-113.
  - 21 Rodrigo GC, Almanza GR, Akesson B, Åkesson B, Duan RD. Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. J Med Plants Res 2010; 4: 2204-2210.
  - 22 De Carvalho BA, Domingos OS, Massoni M, Dos Santos MH, Ionta M, Lago JH, Figueiredo CR, Matsuo AL, Soares MG. Essential oil from *Caesalpinia peltophoroides* flowers - chemical composition and *in vitro* cytotoxic evaluation. Nat Prod Commun 2013; 8:679-682.
  - 23 de Souza DJF, de Carvalho MG, Ferreira DT, Schmitz W, Saridakis HO. Phenolic compounds and hydroxymethylfurfural from the flowers of *Caesalpinia peltophoroides* and their antibacterial activity. Revista Latinoamericana de Quimica 2004; 32:25-29.
  - 24 Flores Y, Almanza GR. Secondary metabolites from *Caesalpinia pluviosa*. Revista Boliviana de Química 2006; 33:1-8.
  - 25 Brasil. Farmacopéia Brasileira. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.
  - 26 Bueno FG, Panizzon, GP, Machareth, MAD, Lopes, GCL, Leite-Mello, EVS, Mello, JCP. Development of a UV/VIS Spectrophotometric Method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. Quim Nova 2012; 35: 822-826.
  - 27 Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65:55-63.
  - 28 Porstmann T, Ternynck T, Avrameas S. Quantitation of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation into DNA: an enzyme immunoassay for the assessment of the lymphoid cell proliferative response. J Immunol Methods 1985; 82:169-179.
  - 29 Hamamra K, Furukawa K, Hayashi T, Hattori T, Nakano J, Nakashima H, Okuda T, Mizutani H, Hattori H, Ueda M, Urano T, Lloyd KO, Furukawa K. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102:11041–11046.

- 30 Wawer I, Zielinska A. <sup>13</sup>C-CP-MAS-NMR studies of flavonoids. I. Solid-state conformation of quercetin, quercetin 5'-sulphonic acid and some simple polyphenols. *Solid State Nucl Magn Reson* 1997; 10:33-38.
- 31 Foo LY, Wong H. Phyllanthusiin-D, an unusual hydrolyzable tannin from *Phyllanthus amarus*. *Phytochem* 1992; 31:711-713.
- 32 Zhang Y, DeWitt DL, Murugesan S, Nair MG. Novel lipid-peroxidation- and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrorhiza kurroa* seeds. *Chem Biodivers* 2004;1:426-441.
- 33 Miketova P, Schram KH, Whitney J, Li M, Huang R, Kerns E, Valcic S, Timmermann BN, Rourick R, Kloor S. Tandem mass spectrometry studies of green tea catechins. Identification of three minor components in the polyphenolic extract of green tea. *J Mass Spectrom* 2000; 35:860-869.
- 34 Lee JH, Johnson JV, Talcott ST. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. *J Agric Food Chem* 2005; 53:6003-6010.
- 35 Chen H, Hayek S, Rivera Guzman J, Gillitt ND, Ibrahim SA, Jobin C, Sang S. The microbiota is essential for the generation of black tea theaflavins-derived metabolites. *PLoS One* 2012; 7:e51001.
- 36 Dincheva I, Badjakov I, Kondakova V, Dobson P, McDougall G, Stewart D. Identification of the phenolic components in Bulgarian raspberry cultivars by LC-ESI-MS. *Int J Agricul* 2013; 3:127-138.
- 37 Tan HP, Ling SK, Chuah CH. Characterisation of galloylated cyanogenic glucosides and hydrolysable tannins from leaves of *Phyllagathis rotundifolia* by LC-ESI-MS/MS. *Phytochem Analysis* 2011;22:516-525.
- 38 Regueiro J, Sanchez-Gonzalez C, Vallverdu-Queralt A, Simal-Gandara J, Lamuela-Raventos R, Izquierdo-Pulido M. Comprehensive identification of walnut polyphenols by liquid chromatography coupled to linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Food Chem* 2014; 152:340-348.
- 39 Tabata H, Katsube T, Tsuma T, Ohta Y, Imawaka N, Utsumi T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. *Food Chem* 2008; 109:64-71.
- 40 Feldman KS, Ensel SM, Minard RD. Ellagitannin chemistry - the first total chemical synthesis of an ellagitannin natural product, tellimagrandin I. *J Am Chem Soc* 1994; 116:1742-1745.
- 41 Ito H. Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. *Planta Med* 2011; 77:1110-1115.
- 42 Singh D, Choi SM, Zo SM, Painuli RM, Kwon SW, Han SS. Effect of extracts of *Terminalia chebula* on proliferation of keratinocytes and fibroblasts cells: an alternative approach for wound healing. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; 2014:ID701656.
- 43 Murthy KN, Reddy VK, Veigas JM, Murthy UD. Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *J Med Food* 2004; 7:256-259.

## ***CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO IN VIVO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE EM RATOS NORMOGLICÊMICOS***

---

---

Este capítulo consiste no artigo submetido para publicação na revista *PloSOne* sobre a avaliação da atividade cicatrizante *in vivo* de *Poincianella pluviosa* em ratos normoglicêmicos.

**Enhanced cutaneous wound healing *in vivo* by *Poincianella pluviosa* standardized crude extract**

Fernanda Giacomini Bueno<sup>1</sup>, Eduarda Antunes Moreira<sup>1</sup>, Andreas Hensel<sup>2</sup>, Gutierrez Rodrigues de Moraes<sup>3</sup>, Mauro Luciano Baesso<sup>3</sup>, Eleri Vieira Souza de Leite-Mello<sup>4</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>2</sup> Institute of Pharmaceutical Biology and Phytochemistry, University of Münster, Corrensstr. 48, D-48149, Münster, Germany.

<sup>3</sup> Departamento de Física, Grupo de Fenômenos Fototérmicos, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

\*Author for Correspondence: J.C.P. de Mello, [mello@uem.br](mailto:mello@uem.br), Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, Brazil, BR-87020-900, Phone: +55 44 3011 4816, Fax: +55 44 3011 5050

**Abstract**

Wound healing is a complex process that involves several biological events, and a delay in this process may cause economic and social problems for the patient. This study evaluated the activity of a crude extract (CE) from *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz in the wound-healing process in Wistar rats. Standardized CE was incorporated into a gel formulation and applied on cutaneous wounds (CE treatment) and compared with the gel without CE (Control) for 4, 7, 10, and 14 days of treatment. The effects of the CE on wound re-epithelialization, cell proliferation, permeation using photoacoustic spectroscopy (PAS), and proteins including the vascular endothelial growth factor (VEGF), superoxide dismutase 2 (SOD-2) and cyclooxygenase 2 (COX-2) were evaluated. The CE treatment stimulated the migration of keratinocytes at day 4 and proliferation on the following days, with a high concentration of cells in metaphase at 7 days. Type I collagen formed more rapidly in the CE treatment. PAS showed that the CE had permeated through the skin. CE treatment stimulated VEGF at day 4 and SOD-2 and COX-2 at day 7. The results suggest that the CE promoted the regulation of proteins and helped to accelerate the processes involved in healing promoting early angiogenesis. This led to an increase in the re-epithelialized surface, with significant mitotic activity. Maturation of collagen fibers was also enhanced, which could influence the resistance of the extracellular matrix. The CE from *P. pluviosa* may become a promising herbal medicine with a healing function.

Key-Words: Wound healing, proteins, *Poincianella pluviosa*.

## 1 Introduction

The skin forms a barrier that protects the body against intentional or accidental damage such as burns, cuts, abrasions or cutaneous ulcers, which can compromise its function [1,2]. These types of damages can be repaired by the wound-healing process, which is very complex and involves several biological events, including vascular and cellular changes, epithelial proliferation, collagen synthesis and deposition, fibroblast proliferation, and wound contraction. However, the time required to complete these stages can change when wound healing is impaired or fails. Moreover, worldwide nearly 6 million people are estimated to suffer from unhealed wounds [3].

The cells produce pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS) such as the superoxide anion and hydrogen peroxide [4,5]. ROS are essential to protect the tissue against microorganisms [4] and stimulates immune cells to release high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) [6]. VEGF induces migration and proliferation of endothelial cells [7]. Nevertheless, a “respiratory burst” is caused by an excessive increase in ROS release [8]. Extensive tissue damage including inhibition of cell migration and proliferation can occur if there is no detoxification of ROS [9]. Superoxide dismutase (SOD), catalase, and some peroxidases are scavengers of these reactive species. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) can be produced by the action of SOD on the superoxide anion. In the endothelial cells,  $H_2O_2$  can stimulate the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2) and metalloproteinases [10].

A delay in wound repair causes economic and social problems for the patient, raising concern regarding the reduction in quality of life, mental and physical health, and complications that can cause morbidity and mortality [11]. Due to the high cost of treatment associated with poor wound healing, the search for new drugs to accelerate the healing process has become a priority. For this process to be effective, the wound must close rapidly. A normal healing process should produce a resistant and esthetically satisfying scar [1]. In modern medicine, herbal compounds are assuming an important role in tissue repair. Some published reports have described the effects of herbal drugs on wound healing [12,13]. In Brazil, several traditional medicinal plants have been used and studied for their acceleration of wound healing [14,15]. However, many plant species still remain to be evaluated.

*Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz is popularly known as “sibipiruna” or “false Brazil wood”, and is also reported under its synonyms *Caesalpinia peltophoroides* (Benth.), *Caesalpinia pluviosa* DC., and *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) G.P. Lewis [16]. The bark has been investigated as an antimalarial [17] and for its healing activity. Bueno et al. [18] showed that a crude extract of *P. pluviosa* increased the *in vitro* cell viability of keratinocytes (HaCaT) and fibroblasts (pNHDF) and stimulated the proliferation in keratinocytes. Nevertheless they found a fraction with activity and showed the presence of hydrolysable tannins in this fraction. So, the aim of

this study was evaluated the *in vivo* healing effect of a crude extract from the bark of *P. pluviosa* on the process of wound re-epithelialization, antioxidants effects, angiogenesis, cell proliferation, and permeation .

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Plant material and crude extract (CE) preparation

Bark of *P. pluviosa* was collected on the campus of the Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil (23°24'10"S; 51°56'28"W, 564 m a.s.l.). A voucher specimen was deposited in the UEM Herbarium under number HUEM-12492. The bark samples were dried under forced-air circulation (40 °C) and then milled in a Tigre ASN-5 stainless-steel hammer mill. Milled bark of *P. pluviosa* (10% w/v) was extracted using 50% ethanol (v/v) by turbo-extraction (Ultra-Turrax® UTC 115KT, USA; 15 min; t <40 °C). The crude extract (CE) was concentrated in a rotary evaporator under reduced pressure and then lyophilized.

### 2.2 Antioxidant capacity and total polyphenol content

Antioxidant capacity was estimated based on the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical-scavenging activity according to the method described by Amarowicz et al. [19], and the results are presented as IC<sub>50</sub> (µg/mL). Vitamin C was used as a reference. The total polyphenol content (TP) was determined using a modified Folin-Ciocalteu method [20].

### 2.3 Gel formulation

Two carbopol gel formulations, a base gel without CE and a CE gel containing 1% CE were prepared and stored at 4-8 °C. The formulation had hydrophilic characteristics and was prepared as described by Silva-Corazza et al. [21]. These formulations were prepared before the beginning of the experiments, and were used during the entire treatment period.

### 2.4 Ethics Statement and Experimental animals

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade Estadual de Maringá (acceptance no. 141/2010). Male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 220 to 240 g were kept in individual cages, on a 12-h light/dark cycle, temperature 22 °C, with water and chow (Nuvital®) *ad libitum*. The animals (n=34) were divided into four groups, corresponding to 4, 7, 10, and 14 days of treatment. Each group was evaluated in histological tests (n=5), photoacoustic spectroscopy measurements (n=2), and the Western Blot test (n=2; except at day 14).

The animals were anesthetized with Rompum® (Bayer, São Paulo, Brazil)/Ketamine (1:1 0.1 mL/100 g), positioned for a cervical epilation, and two wounds (1 cm<sup>2</sup> each) were made side by side, by removing the epidermis and dermis. On the next day, each cutaneous wound was treated daily with

base gel on the right side (Control) and CE gel on the left side (CE treatment). After 4, 7, 10 and 14 days of treatment, the animals were killed with an overdose of anesthetic (120 mg/kg Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brazil). The cutaneous wounds were examined visually, and then skin samples were removed. In the histological test, two hours before the animals were killed, vincristine sulfate (0.5 mg/kg; 1 mg/mL Tecnocris® 1 mg/mL, Zodiac, São Paulo, Brazil) was administered to block the epithelial cells in mitose.

## 2.5 Histological study

The skin samples at day 4 and 7 were cut in half. All samples were Bouin-fixed, paraffin-embedded, and semi-serialised 6 µm-thick sections were obtained. The slides were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red [22]. The re-epithelialization (length and thickness) and number of metaphases were evaluated under an Olympus BX41 light microscope with a 3.2 Megapixel Olympus Q-Color-3 Imaging System coupled to an image capture system (Q-Capture Pro). Collagen fibers types I and III were quantified by the Picro-Sirius technique under an optical microscope coupled to a polarizer (Attachment Nszh-KPO). All slides were analyzed using Image Pro-Plus® (v. 4.5).

### 2.5.1 Analyses of re-epithelialization

At days 4 and 7, the upper re-epithelialized surface was measured on either side of the wound. The thickness was evaluated at days 10 and 14, by measuring the re-epithelialized surface at three different points, starting from the center of the wound. Three sections of each slide were analyzed, using a 10X objective. The number of cells in mitose was determined above the basal and supra-basal layers surface. Five sections of each slide, with a total length of 10,000 µm, were analyzed under a 40X objective. The results were expressed in number of cells in metaphase/ mm [23].

### 2.5.2 Collagen fibers

The natural birefringence of collagen, revealed with Picro-Sirius staining and polarized light, allow the types of collagen to be differentiated by their density [22]. The collagen-stained area was calculated by the density of the fibers. Green-stained fibers represent collagen type III, and red-, orange- or yellow-stained fibers as type I. Three fields were analysed each slide, observed using a 20X objective. The results were expressed as percentage of fibers.

## 2.6 Analysis of protein by Western Blot

At days 4, 7, and 10, the wounds were removed, fragmented, and homogenized with Tris buffer (50 mmol/L, pH 6.8) containing the protease inhibitors PMSF (10 mg/mL) and aprotinin (2 mg/mL) [24]. The samples were placed in an ultrasonic bath (3 x 15 s) and centrifuged at 4 °C. Total protein

( $\mu\text{g/mL}$ ) present in the supernatant of each sample was measured by the Bradford method [18], and then diluted in a solution containing 1% SDS, 2% 2-mercaptanol, and 10% glycerol, and placed in boiling water for 5 min. Separation and packaging gel, containing 10% and 4% polyacrylamide, respectively, and molecular weight standards from 6.9 to 200 kDa (Mark12™ Unstained Standard) were used. GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) is a constitutive protein and was used as a loading control. After separation by electrophoresis in SDS-PAGE, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and blocked with Tris buffer solution containing 0.2% Tween-20 (TBST, pH 7.5), and 10% milk protein for 1 h. The membrane was incubated overnight with rabbit monoclonal VEGF, COX-2, SOD-2, and GAPDH (1:250) antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and washed with TBST. The membrane was revealed using a secondary antibody F(ab')<sub>2</sub> fragment of goat anti-mouse IgG (Santa Cruz Biotechnology) conjugated to peroxidase (1:1000) for 1 h. The blot was incubated in a chemiluminescence solution (Novex® Chemiluminescent Substrates, Invitrogen™) at room temperature, and was autoradiographed with a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Proteins levels were analyzed by densitometry (ImajeJ 1.47) and normalized against GAPDH response (100%).

### 2.7 Photoacoustic spectroscopy (PAS) measurements

PAS measurements were carried out according to Rocha et al. [25]. The photoacoustic spectra were modified using a modulation frequency of 22 Hz and scanned between 200 and 800 nm. The gel was applied 30 min before the samples were collected and analyzed on the epidermal and dermal surfaces, and the optical absorption was measured as a function of the radiation wavelength. The absorptions of the crude extract, base gel, and CE gel were measured. Spectra values obtained on the dermal and epidermal surfaces were subtracted to better assess the skin permeation.

### 2.8 Statistical analysis

The software Statistica® 8.0 (StatSoft©, Inc. 1984-2007) was used for the statistical analyses. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) using Mann-Whitney test, a nonparametric analysis for Western Blot and Tukey test, a unilateral analysis of variance (one-way ANOVA) for multiple comparisons. Significant differences were determined using  $p < 0.05$  as the significance criterion.

## 3 Results

Antioxidant activity estimated by the DPPH method showed that the inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) was  $7.40 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$  for the CE and  $4.36 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$  for vitamin C. The total polyphenol content of the CE was 22.7%. The gel formulation was therefore standardized to 22.7 mg% of total polyphenols. CE amount in the carbopol gel was optimized from previous studies with

*Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) [15]. Visual observation of CE treatment showed no exudate, inflammation or bleeding on all days of treatment. However, on the second day a rapid browning (darker cherry-red color) and drying crust were observed in the CE treatment. In the Control, the crust was less consistent and had a bright red color (Figure 1A). These different colors were observed until day 5.

### 3.1 Histological study

Figure 1B shows the re-epithelialized surface on the days of treatment. Figure 2A and 2B shows the length (at days 4 and 7) and thickness (at days 10 and 14) of the re-epithelialization surface, respectively. At day 4, the length of the re-epithelialized surface at the wound center was greater in the CE treatment. At day 10 and 14, the epidermal layer was thicker than that of the Control. At day 7 the re-epithelialized surface peaked in the Control. Statistical analysis showed significant differences ( $p<0.05$ ) on all days in both treatments. In the evaluation of mitotic activity (Figure 2C), at day 4 the CE treatment and Control showed numbers of cells in metaphase/mm of  $25.0\pm0.46$  and  $12.0\pm0.22$ , respectively. At day 7 this number doubled for the treatments, resulting in 45% more cells in metaphase in the CE treatment. At day 10, more cells in metaphase were present in the Control, and at day 14 in the CE treatment. The results of the treatments were statistically different ( $p<0.05$ ).

Figure 1. (A) Photography of excisional wounds in second day of treatment: CE treatment and Control; (B) Photomicrography of histological sections stained in hematoxylin-eosin: skin at days 4, 7, 10 and 14 of CE treatment and Control. The original magnification was 2x. (●) Representative re-epithelialized surface. (—) 500  $\mu$ m. CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.

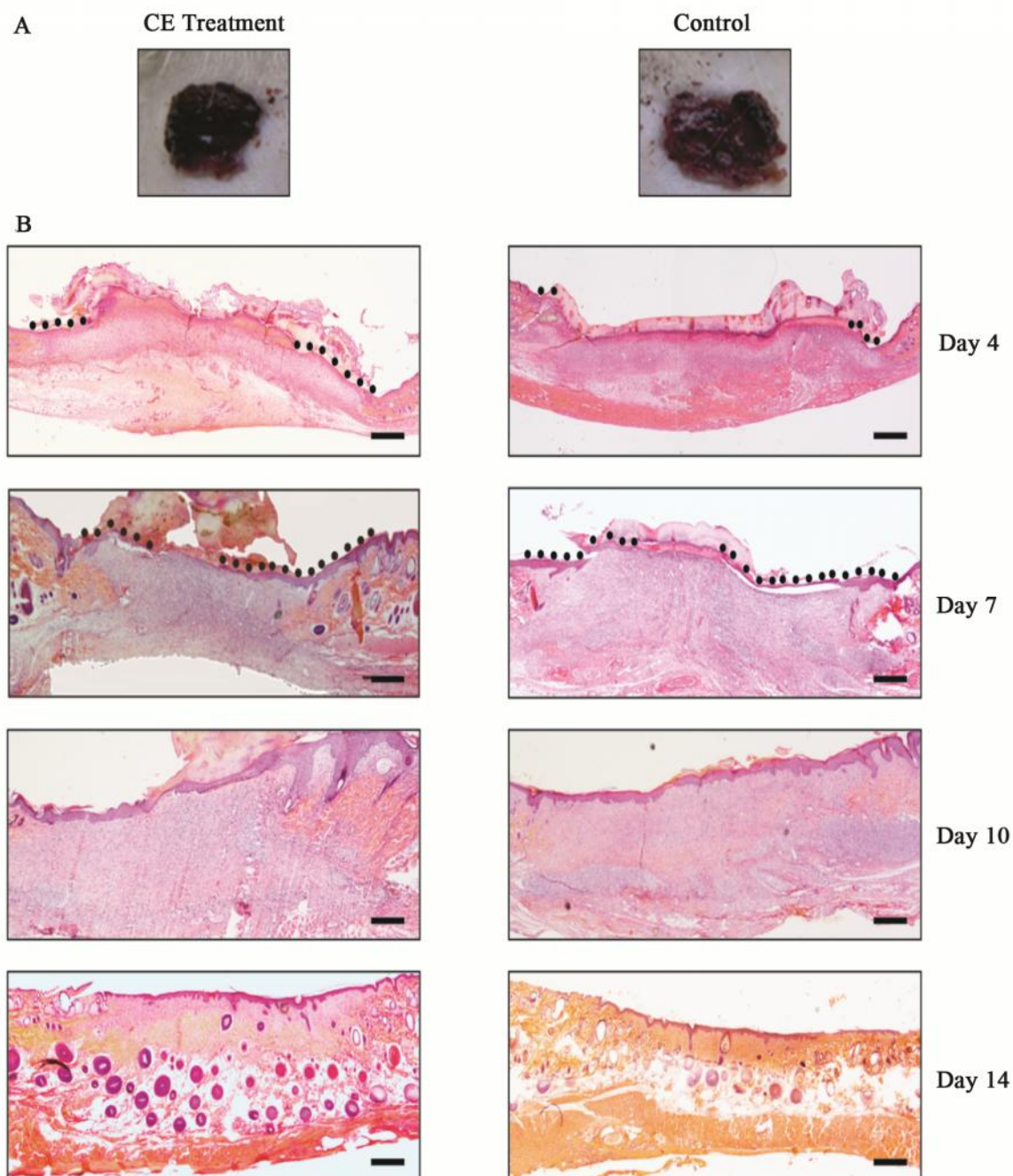
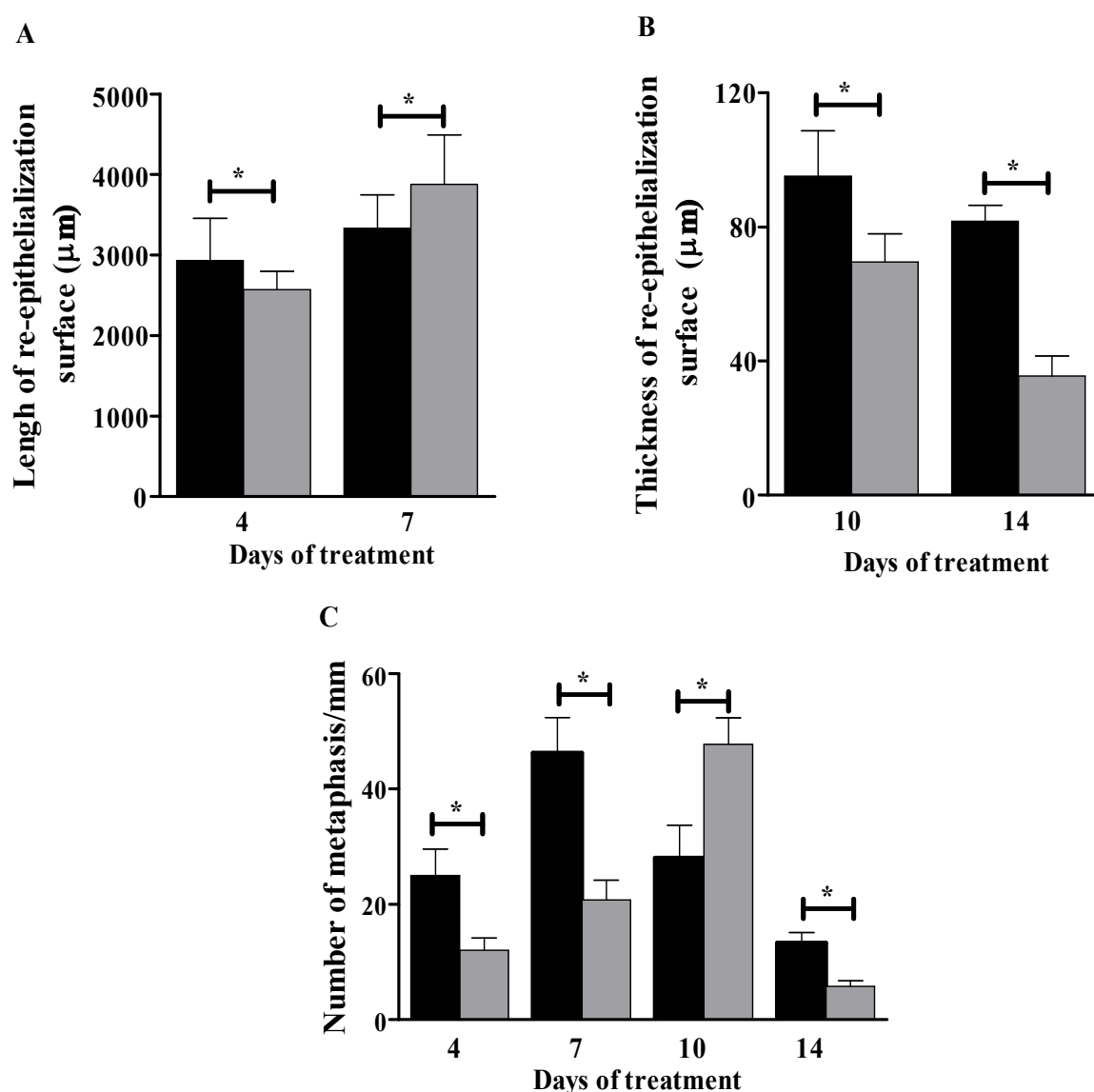


Figure 2. (A) Length at days 4 and 7 and (B) thickness at days 10 and 14 of the re-epithelialization surface. (C) Number of cells in metaphasis/mm in basal and supra-basal re-epithelialized surface at days 4, 7, 10 and 14. (■) CE treatment and (▒) Control. The results are expressed as mean±standard desviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (\*  $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.



The percentage of type III (imature) collagen was higher at days 4 and 7 for the Control ( $50.02\pm1.99$  and  $56.32\pm5.61$ , respectively) as well as for the CE treatment ( $53.14\pm9.56$  and  $52.23\pm3.69$ , respectively). The value decreased on the succeeding days, due to replacement by type I collagen (mature). However, at day 10 there was a significant difference ( $p<0.05$ ) between treatments,

with 67% more type I collagen in the CE treatment. At day 14 there was reestablishment in the type I collagen in the Control. Figure 3A and 3B shows the collagen on all days of treatment. At days 4, 7, and 10, type I collagen fibers were present in higher percentages ( $p<0.05$ ) in the CE treatment compared to the Control (Figure Supplementary Information 1).

Figure SI 1. (A) Photomicrography of histological sections stained in Sirius Red: type I collagen (yellow/orange/red) and collagen type III (green) at days 10 and 14, for the CE treatment and Control. The original magnification was 2x. (—) 500  $\mu\text{m}$ . CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.

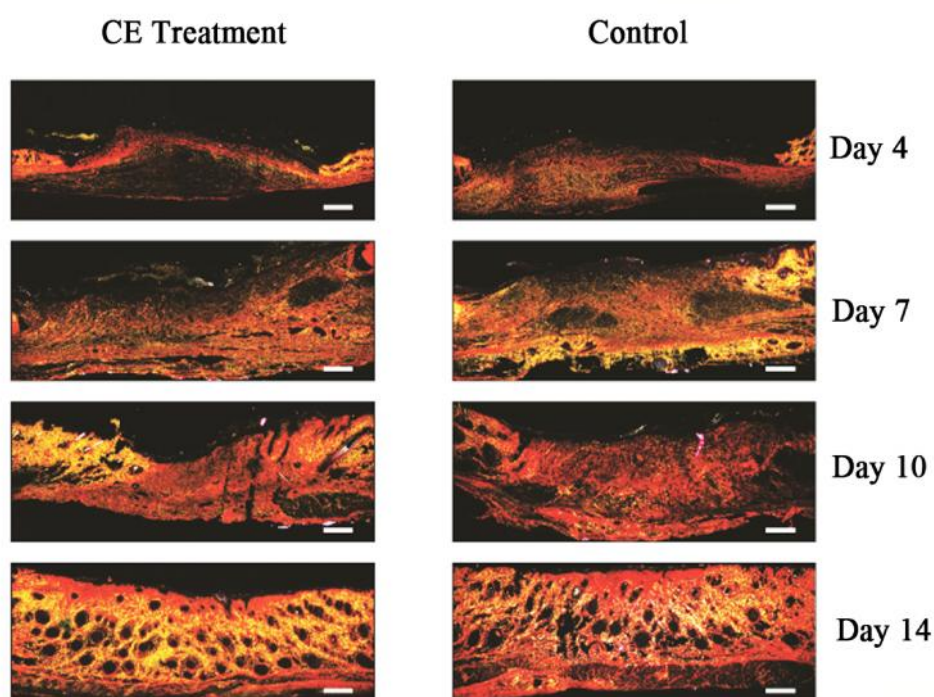
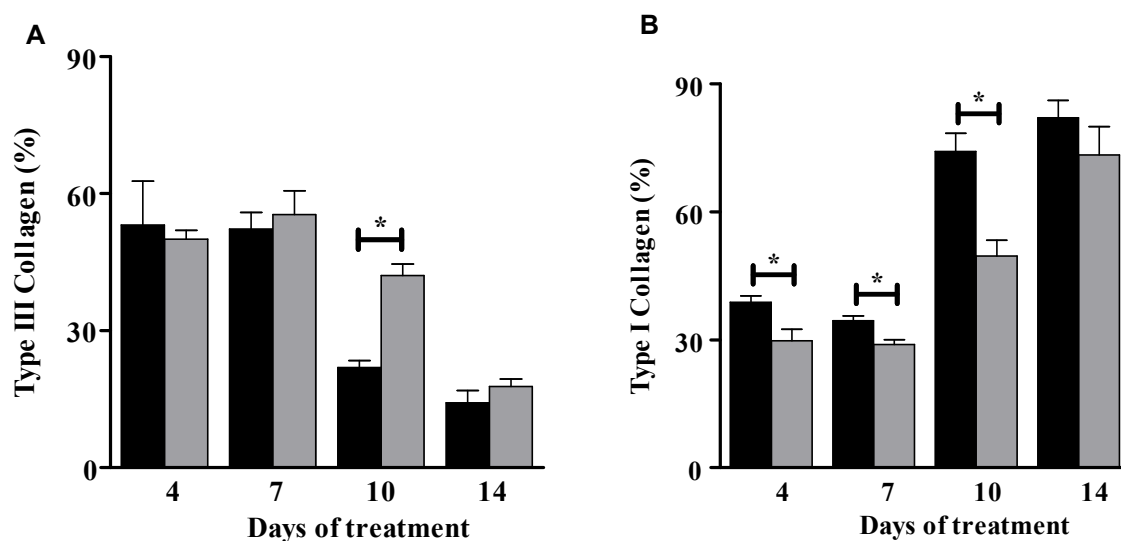


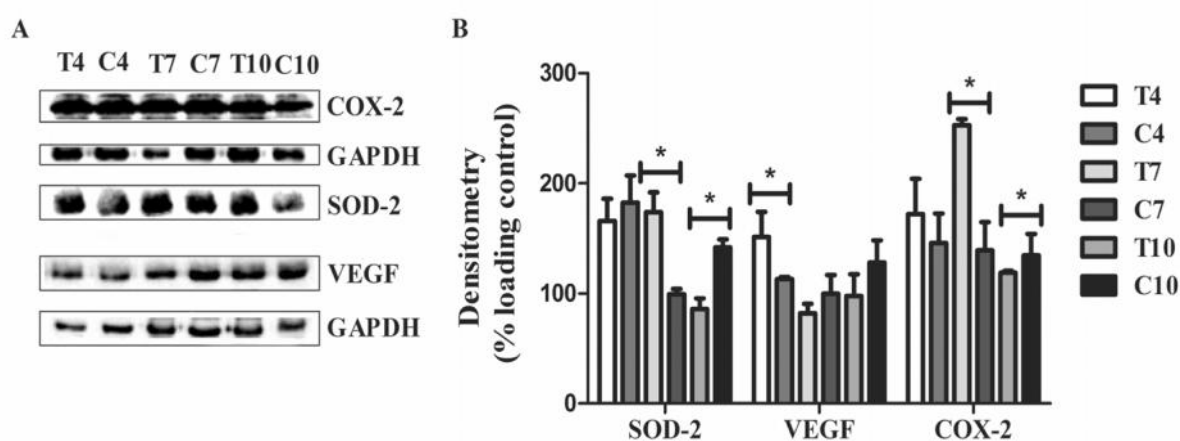
Figure 3. Percentages of (A) collagen type III (imature) and (B) type I (mature) collagen at days 4, 7, 10, and 14. (■) CE treatment and (▒) Control. The results are expressed as mean±standard deviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (\*  $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.



### 3.2 Analysis of protein by Western blot

The levels of SOD-2, VEGF, and COX-2 protein was detected at 24, 45 and 70 kDa (Figure 4A), respectively. At day 4, no change in the protein levels of SOD-2 and COX-2 were observed. In CE treatment, VEGF showed a significant ( $p<0.05$ ) increased at 4 day and SOD-2 and COX-2 significant ( $p<0.05$ ) up-regulation at day 7. The proteins were returned to basal levels after the maximum peak (Figure 4B).

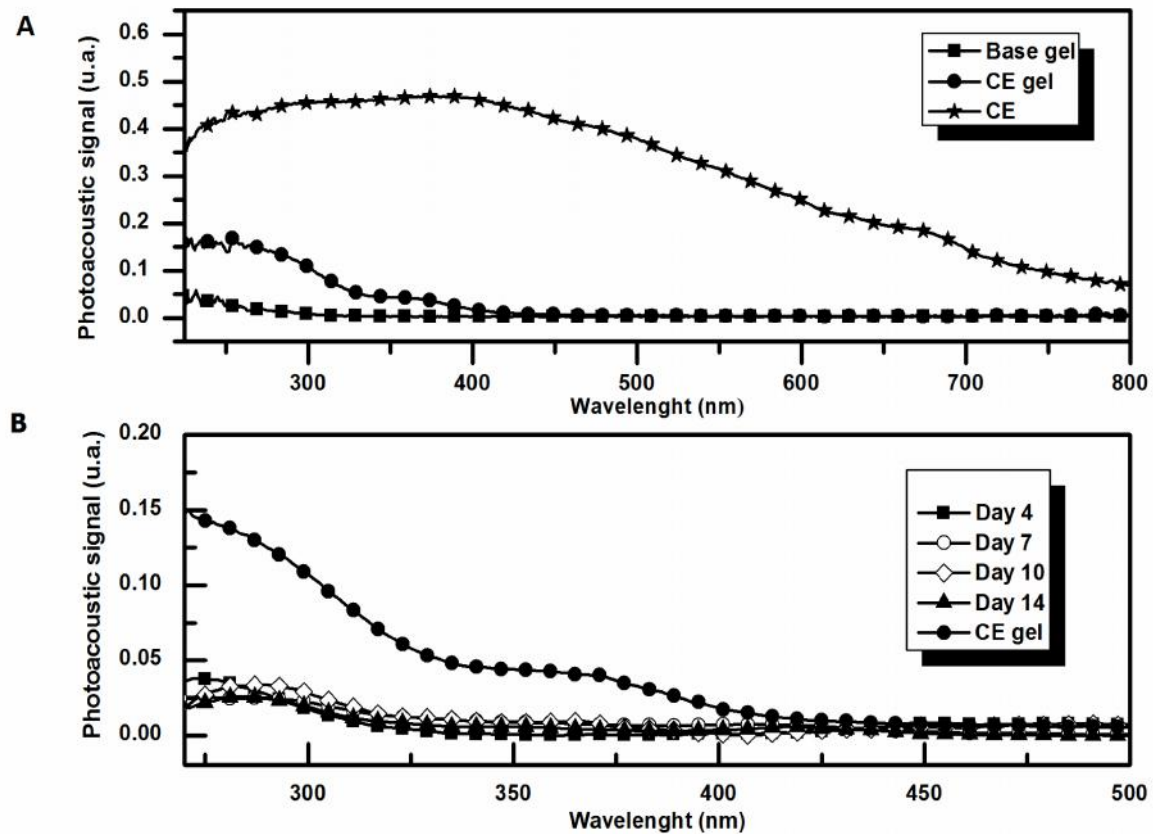
Figure 4. (A) Western blot analyses of COX-2, SOD-2, VEGF and GAPDH protein at days 4, 7, and 10 of CE treatment (T) and Control (C). (B) Measurement obtained from the ratio between optical densities of proteins bands from treatments and loading control (GAPDH). GAPDH have been set to 100%. The results are expressed as mean±standard deviation. Values are mean of 3 independent experiments. Statistical data was used to compared the days of treatment between CE treatment and Control (\*  $p<0.05$ ). CE treatment: wound treated with gel containing 1% crude extract; Control: wound treated with base gel.



### 3.3 Photoacoustic spectroscopy (PAS) measurements

The absorption profiles by PAS of the CE, CE gel, and base gel were different. The base gel showed practically no absorption, and the CE showed a broad band over wavelengths from 200 to 800 nm. However, adding the gel to the CE led to a change in the spectrum, and the absorption bands were then at about 280 and 370 nm (Figure 5A). The photoacoustic spectra from CE treatment and Control were subtracted resulting in a single spectrum which is the permeation CE (Figure 5B). PAS showed absorption of CE on all days of treatment, which was not observed in the Control.

Figure 5. (A) Scan spectrum of the crude extract of CE, CE gel, and base gel, and subtraction the inner side of the CE treatment and Control wound (B) in photoacoustic spectroscopy. CE: crude extract.



#### 4 Discussion

Seconds after an injury, hemostasis is triggered with hemorrhage into the wound. Instantly, a blood clot is formed, serving as an important physical barrier and producing chemotactic signals [11,26]. The fibrin clot acts as a temporary matrix for cell migration in the next wound-repair stages [1,11]. In our experiment, during the first five days of CE treatment, the clot was darker and more consistent than in the Control. This feature can be explained by the presence of polyphenol compounds (22.7%) in CE. Tannins, belonging to the polyphenol group, are able to precipitate with proteins and form a dark crust that covers the wound [27]. They have astringent, antioxidant, and antimicrobial properties [28].

The proliferative phase begins with re-epithelialization involving the extracellular matrix (ECM) and collagen production [26]. Re-epithelialization closes the wound, reorganizing the cytoskeleton through the migration and proliferation of keratinocytes from the wound edges [29]. Epidermal re-epithelialization can be determined as wound closure progresses by the thickness (days 10 and 14) and length of the re-epithelialization layer (days 4 and 7). At day 4, the CE treatment showed intense migration and proliferation of keratinocytes, and at days 7 the migration was inhibited and proliferation was stimulated. At day 10, and 14 the keratinocyte proliferation and differentiation

was present. Cellular proliferation is essential to form a dense hyperproliferative epithelium and restore skin integrity [29]. In the Control, the keratinocyte migration was observed at days 4 and 7, and keratinocyte proliferation at days 10 and 14. Mitosis interruption at metaphase by the administration of vincristine sulfate, which binds to tubulin, preventing microtubule formation [30], can demonstrate the cell proliferation in the CE treatment. Mitosis in the CE treatment remained high up to day 7, while in the Control, mitosis peaked after day 10, about 3 days later. The results showed that CE treatment accelerated re-epithelialization compared to the Control. Values in the re-epithelialization area (after 4 days) and for the epidermal thickness (days 10 and 14) were always higher in the CE treatment.

While re-epithelialization is proceeding, the ECM is being laid down. Granulation tissue is the new stroma and consists of fibroblasts, collagen fibers and new vessels. Fibroblasts are responsible for producing collagen in the temporary extracellular matrix, which is beginning to be replaced by a resistant elastic tissue [31]. At this stage of healing (days 4 and 7), larger amounts of type III (young) collagen were quickly replaced by type I (mature) collagen fibers in the CE treatment, with subsequent formation of a stronger and less vascularized tissue [32]. The fibroblast response is related to the increased proliferation of this cell type in this stage of healing [33]. The dermis at days 10 and 14 showed mature fibers (collagen type I) with better organization than in the Control. During the fibroblast attachment and maturing, the process of wound contraction reaches its maximum efficiency and the tensile strength may be increased. The ratio of the re-epithelialized area, number of metaphases, and accelerated progression to mature collagen fibers indicate a higher proliferative potential and resistance in wounds treated with the gel containing the CE of *P. pluviosa*.

Each phase of wound healing can be regulated by many bioactive compounds including growth factors, cytokines, and eicosanoids. Prostaglandins (PGs), which are inflammatory mediators, belong to the eicosanoid class. Arachidonic acid is converted by cyclooxygenase 1 and 2 (COX) into PGs [34]. The major PGs is PGE<sub>2</sub>, which is formed by COX-2, involved in keratinocyte proliferation [35], angiogenesis [36] as well as a mediator of inflammatory response. Futagami et al. [37] observed the strong presence of COX-2 in the basal layer of wound epidermis and also expressed in inflammatory cells. In this study, COX-2 was stimulated ( $p < 0.05$ ) by CE treatment showing a possible effect on inflammatory cells and keratinocyte proliferation. However, VEGF was stimulated by CE treatment at day 4 and returned to basal levels, indicating that *P. pluviosa* promoted angiogenesis. VEGF is the most important proangiogenic factor that increases with initial hypoxia [38,39]. Catechin epicatechin gallate, a phenolic compound, stimulated COX-2 and VEGF [40] improving the wound healing in rat model.

Another process that influences wound healing is the presence of large amounts of reactive oxygen species (ROS), which are formed from oxide-reduction reactions during the processes of energy production, phagocytosis, regulation of cell growth, synthesis of substances, and intercellular signaling [41,42]. Free radicals produce numerous disorders, but can be eliminated by antioxidants

that are present in the crude extract, which facilitates the healing process [43]. The CE IC<sub>50</sub> was similar to that of vitamin C; this activity is probably due to phenolic compounds. Another possibility is the production of SOD-2 (day 7), the most common scavenger of ROS found in the mitochondrial matrix [44].

The gel formulation for topical application was also evaluated for permeation of the CE of *P. pluviosa* from the dermis to the bloodstream [45]. The PAS spectra obtained were used to determine the penetration profile of the substances through the skin. The resulting bands were evaluated by Gaussian analysis on each day of treatment. The permeation profile was obtained by subtracting the absorption spectrum obtained for the control dermis from the spectrum obtained for the treated dermis, giving the absorption profile for the CE only (Figure 4B). As with sunscreens, the gel used to treat skin wounds should have a minimum permeation to the bloodstream, performing its effects in the skin layers [46]. The PAS technique allowed us to determine that the crude extract was absorbed in the wound, showing that the formulation was appropriate to evaluate the wound-healing treatment.

## 5 Conclusions

Use of the formulation containing the crude extract of *P. pluviosa* stimulated the formation of collagen fibers and re-epithelialization, indicating that it allows the formation of a more-organized tissue and accelerates wound healing. The up-regulation of proteins by the cells helped to accelerate the processes involved in healing. Phenolic compounds with antioxidant activity present in the CE had a positive effect, providing greater protection for the injured tissue by inhibiting the oxidant agents produced in excess. Thus, the CE of *P. pluviosa* as a topical application proved to be a potent promoter of wound repair.

## Acknowledgments

We are very grateful to M.E.C. Cancino, A. Arantes, and C.R. Novello for technical assistance. Thanks are due to Dr. Janet W. Reid, JWR Associates, Trumansburg, New York, for English revision.

## References

1. Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341: 738-746.
2. Walter MN, Wright KT, Fuller HR, MacNeil S, Johnson WE (2010) Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: an in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. *Exp Cell Res* 316: 1271-1281.
3. Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P (2007) Ethnopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *J Ethnopharmacol* 114: 103-113.
4. Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83: 835-870.

5. Schäfer M, Werner S (2008) Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological research* 58: 165-171.
6. Cho M, Hunt TK, Hussain MZ (2001) Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2357-2363.
7. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, et al. (2009) The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res* 153: 347-358.
8. Keller U, Kümmin A, Braun S, Werner S (2006) Reactive oxygen species and their detoxification in healing skin wounds. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 11: 106-111.
9. Kanta J (2011) The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 54: 97-101.
10. Schremi S, Landthaler M, Schäferling M, Babilas P (2010) A new star on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> horizon of wound healing? *Experimental Dermatology* 20: 229-231.
11. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V (2009) The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res* 37: 1528-1542.
12. Tam JC, Lau KM, Liu CL, To MH, Kwok HF, et al. (2011) The *in vivo* and *in vitro* diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action. *J Ethnopharmacol* 134: 831-838.
13. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A (2009) Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. *Evid Based Complement Alternat Med* 6: 351-356.
14. Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, et al. (2009) Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol* 122: 523-532.
15. Hernandez L, Pereira LMS, Palazzo F, Mello JCP (2010) Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46: 431-436.
16. Kumar MS, Kirubanandan S, Sripriya R, Sehgal PK (2008) *Triphala* promotes healing of infected full-thickness dermal wound. *J Surg Res* 144: 94-101.
17. Kayano AC, Lopes SC, Bueno FG, Cabral EC, Souza-Neiras WC, et al. (2011) *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. *Malar J* 10: 112.
18. Mello JCP, Bueno FG, Lechtenberg M, Petereit F, Hensel A (2013) Evaluation of *Caesalpinia peltophoroides* in skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Planta Medica* 79: 1155-1155.
19. Amarowicz R, Pegg RB, Rahimi-Moghaddam P, Barl B, Weil JA (2004) Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chemistry* 84: 551-562.
20. Bueno FG (2012) Development of a UV/Vis spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. *Química Nova* 35: 822-826.

21. Silva-Corazza PER, Lopes GC, Diciaula MC, Lima MMS, Mello JCP (2010) Pharmaceutical topical gel: development and validation of a UV spectrophotometric method for determination of polyphenols. *Latin American Journal of Pharmacy* 29: 830-834.
22. Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M (1989) Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry* 93: 27-29.
23. Sehn E, Hernandez L, Franco SL, Goncalves CC, Baesso ML (2009) Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Anal Chim Acta* 635: 115-120.
24. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney RC, Kumar R (2008) A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen* 16: 784-790.
25. Rocha JC, Pedrochi F, Hernandez L, de Mello JC, Baesso ML (2007) *Ex vivo* evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Anal Chim Acta* 587: 132-136.
26. Gantwerker EA, Hom DB (2011) Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am* 19: 441-453.
27. Lopes GC, Sanches AC, Nakamura CV, Dias Filho BP, Hernandez L, et al. (2005) Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J Ethnopharmacol* 99: 265-272.
28. Agyare C, Bempah SB, Boakye YD, Ayande PG, Adarkwa-Yiadom M, et al. (2013) Evaluation of antimicrobial and wound healing potential of *Justicia flava* and *Lannea welwitschii*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
29. Santoro MM, Gaudino G (2005) Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 304: 274-286.
30. Mujagic H, Chen SS, Geist R, Occhipinti SJ, Conger BM, et al. (1983) Effects of vincristine on cell survival, cell cycle progression, and mitotic accumulation in asynchronously growing Sarcoma 180 cells. *Cancer Res* 43: 3591-3597.
31. Gentleman E, Lay AN, Dickerson DA, Nauman EA, Livesay GA, et al. (2003) Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 24: 3805-3813.
32. Goncalves RV, Mezencio JM, Benevides GP, Matta SL, Neves CA, et al. (2010) Effect of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 43: 350-355.
33. Smith AN, Willis E, Chan VT, Muffley LA, Isik FF, et al. (2010) Mesenchymal stem cells induce dermal fibroblast responses to injury. *Exp Cell Res* 316: 48-54.
34. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, et al. (2007) Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem* 282: 22254-22266.
35. Pentland AP, Needleman P (1986) Modulation of keratinocyte proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. *J Clin Invest* 77: 246-251.

36. Form DM, Auerbach R (1983) PGE2 and angiogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 172: 214-218.
37. Futagami A, Ishizaki M, Fukuda Y, Kawana S, Yamanaka N (2002) Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin. *Lab Invest* 82: 1503-1513.
38. Sano H, Ichioka S, Sekiya N (2012) Influence of oxygen on wound healing dynamics: assessment in a novel wound mouse model under a variable oxygen environment. *PLoS One* 7: e50212.
39. Tandara AA, Mustoe TA (2004) Oxygen in wound healing-more than a nutrient. *World J Surg* 28: 294-300.
40. Kapoor M, Howard R, Hall I, Appleton I (2004) Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. *Am J Pathol* 165: 299-307.
41. Ratman D, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahara DK, Kumar MNV (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113: 189-207.
42. Gülçin I, Huyut Z, Elmastas M, Aboul-Enein HY (2010) Radical scavenging and antioxidant activity of acid. *Journal of Chemistry* 3: 43-53.
43. Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elmat T (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry* 104: 1372-1378.
44. Abe M, Saitoh H, Sato Y, Hamaguchi K, Kiuchi M (2001) Immunohistochemical study of the kidneys after severe muscular injury. *Int J Legal Med* 114: 232-236.
45. Barry BW (2001) Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 14: 101-114.
46. Gupta VK, Zatz JL, Rerek M (1999) Percutaneous absorption of sunscreens through micro-yucatan pig skin in vitro. *Pharm Res* 16: 1602-1607.

### ***CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE IN VIVO EM RATOS DIABÉTICOS***

---

---

Este capítulo contém os resultados parciais da avaliação da atividade cicatrizante *in vivo* do extrato hidroetanólico de *Poincianella pluviosa* em ratos diabéticos.

### Efeito do gel de *Poincianella pluviosa* na cicatrização de feridas em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina.

Fernanda Giacomini Bueno<sup>1</sup>, Gutierrez Rodrigues de Moraes<sup>2</sup>, Mauro Luciano Baesso<sup>2</sup>, Gean Pier Panizzon<sup>1</sup>, Eleri Vieira Souza de Leite-Mello<sup>3</sup>, João Carlos Palazzo de Mello<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>2</sup> Departamento de Física, Grupo de Fenômenos Fototérmicos, Universidade Estadual de Maringá.

<sup>3</sup> Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá.

\*Author for Correspondence: J.C.P. de Mello, [mello@uem.br](mailto:mello@uem.br), Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, Maringá, Brazil, BR-87020-900, Phone: +55 44 3011 4816, Fax: +55 44 3011 5050

#### Resumo

A cicatrização é um processo complexo que atua no reparo tecidual através de sinais químicos, organização das células e da matriz celular. Com este processo diversas proteínas têm seu nível aumentado para reparar a injúria. Em portadores de diabetes *mellitus* o processo cicatricial sofre um retardo, levando a uma dificuldade de cicatrização. Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar ação de *Poincianella pluviosa* em feridas cutâneas de ratos diabéticos. Os ratos foram diabetizados com estreptozotocina (35 mg/kg) e após dois meses foram realizadas duas feridas no dorso e as mesmas foram tratadas com gel contendo 1% de extrato bruto (EB) de *P.pluviosa* e com gel base (controle), separadamente, por 4, 7, 10, 14 e 21 dias. O tamanho e a espessura da superfície de re-epitelização e a expressão das proteínas COX-2, VEGF, SOD-1 e SOD-2 através da técnica de western blot foram avaliadas. Aos 7 dias. O EB estimulou a migração celular entre o quarto e sétimo dia de tratamento dos animais. Aos 4 dias a ferida tratada apresentou maior quantidade de COX-2 do que a controle. SOD-1 e SOD-2 apresentaram o mesmo perfil. Aos 7 dias a ferida tratada apresentou menor quantidade de VEGF, favorecendo, assim, uma modulação da cicatrização em ratos diabéticos.

Palavras-chave: *Poincianella pluviosa*, Atividade cicatrizante, Diabetes.

#### 1 Introdução

A diabetes *mellitus* é considerada uma doença crônica que aparece em grande parte dos países. É uma doença em crescimento devido principalmente as características da qualidade de vida da

população, como o sedentarismo e a obesidade (SHAW, SICREE, ZIMMET, 2010). A prevalência de diabéticos em 2030 será de 50% a mais do número de diabéticos existentes em 2011 (WHITING et al., 2011), acarretando um grande impacto à saúde. Trata-se de uma doença multifatorial caracterizada por complicações que envolvem o metabolismo e o alto risco de infecções (KOMESU et al., 2004). Dentre as complicações causadas pela hiperglicemia está a cicatrização de feridas prejudicada e retardada. Pacientes com diabetes desenvolvem úlceras em membros inferiores devido a condições secundárias como neuropatias, isquemia, problemas vasculares e úlceras de pressão (STEED et al., 2007; GUO; DIPIETRO, 2010). Uma falha no processo de cicatrização é capaz de afetar a integridade anatômica e funcional do tecido por meses e até anos, podendo levar a hospitalização do paciente ou até mesmo a amputação do membro afetado (STEED et al., 2007). Em 2010, às feridas não cicatrizadas foram reconhecidas como um grave problema de saúde pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (SERENA, 2014), devido principalmente aos seus altos custos com a terapia auxiliar destas feridas (GAUTAM et al., 2014).

O tratamento de feridas cutâneas visa promover a cicatrização em um tempo reduzido, para reduzir a dor e o desconforto para o paciente. Assim, a busca de novas estratégias para acelerar a cicatrização de feridas vem sendo pesquisadas (LOPES et al., 2005). Desde a antiguidade se utilizam partes de plantas como meio para auxiliar no processo de reparação tecidual. Um grande número de plantas medicinais é utilizado popularmente em diversos países. Os constituintes dessa droga vegetal são capazes de induzir a cura e regeneração do tecido perdido através de diversos mecanismos envolvidos no processo (TRAKUR et al., 2011), como ação anti-inflamatória, antibacteriana, estimulação da proliferação e diferenciação celular, antioxidativo e outros (HOUGHTON et al., 2005; AGYARE et al., 2011).

Recentes estudos realizados em nosso laboratório envolvendo as cascas de *Poincianella pluviosa*, conhecida popularmente como sibipiruna, tem mostrado sua ação sobre células presentes na pele. Bueno et al. (2014) mostraram que extratos e frações semipurificas de *P. pluviosa* estimularam a viabilidade celular de HaCaT queratinócitos e fibroblastos *in vitro*, além de promover a proliferação dos queratinócitos. Dentre os compostos com atividade presentes na fração foram encontrados em grande quantidade os taninos hidrolizáveis. Mais tarde, nosso grupo de pesquisa encontrou ação do extrato bruto de *P. pluviosa* em feridas de ratos normoglicêmicos com migração e proliferação de queratinócitos *in vivo*. Devido à ação prévia confirmada da *P. pluviosa* no processo de reparação de feridas *in vitro* e *in vivo* e o atraso no reparo tecidual de pacientes diabéticos, este trabalho visou avaliar a ação cicatrizante da *P. pluviosa* frente a ratos diabéticos para verificar a re-epitelização, comportamento de algumas proteínas envolvidas no processo de cicatrização, além da permeação através da pele injuriada.

## 2 Materiais e Métodos

A coleta, preparação do extrato bruto (EB) e da formulação gel foram realizadas de acordo com o Capítulo 1 e 2. O Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá aprovou o estudo (Parecer nº 141/2010).

### 2.1 Indução da diabetes e das feridas cutâneas

Ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*) pesando 180 a 200 g (55 dias) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Ciências Morfológicas em gaiolas individuais, em ciclo de 12 h claro/escuro, temperatura 22 °C, com água e ração (Nuvital®) *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum prévio de 14 h antes da indução do diabetes. Solução de estreptozotocina (Sigma®) 35 mg/kg (em tampão citrato de sódio pH 4.5) foi administrada nos animais via peniana. Após a indução os animais permaneceram por duas horas em jejum. Após 4 dias da indução do diabetes, a glicemia dos animais em jejum foi dosada sendo considerado diabético o rato com glicemia >250 dL/mL. No entanto, as feridas foram realizadas 60 dias após a indução do diabetes para que a mesma se tornasse crônica, e a glicemia foi verificada novamente. Os animais foram anestesiados (Rompum®/Quetamina 1:1 0,1 mL/100 g de peso corporal), e foi realizada a epilação do dorso do animal. Duas feridas (1 cm<sup>2</sup> cada) foram confeccionadas lado a lado. Uma ferida foi tratada diariamente com a base gel (Controle) e a outra com gel contendo 1% de *P. pluviosa* (Tratado com EB). Após, 4, 7, 10, 14 e 21 dias de tratamento os animais foram mortos com dose letal de tiopental (120 mg/kg). As feridas cutâneas foram examinadas macroscopicamente e as amostras de pele foram removidos. Os animais (n=52) foram divididos em 5 grupos, correspondentes aos 4, 7, 10, 14 e 21 dias de tratamento. Cada grupo foi avaliado em testes histológicos (n=5), permeação cutânea (n=3), e análise de Western Blot (n=3; exceto aos 21 dias).

### 2.2 Análise histológica e de proteína por Western blot

As análises histológicas foram realizadas de acordo com o Capítulo 2, assim como as análises referentes à superfície de re-epitelização e quantificação das proteínas ciclooxygenase-2 (COX-2), superóxido dismutase-2 (SOD-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pela técnica de western blot.

A superfície de re-epitelização foi avaliada aos 4 e 7 dias, através da medida do comprimento das línguas de re-epitelização em ambos os lados da ferida. Aos 10, 14 e 21 dias, foi determinada a espessura da epiderme através da medida em três pontos diferentes, a partir do centro da ferida.

Na técnica de Western blot, as proteínas foram analisadas por ImageJ 1,47 e normalizadas contra o GAPDH (100%).

## 2.4 Análise estatística

O software Statistica® 8.0 (StatSoft ©, Inc. 1984-2007) foi utilizado para as análises estatísticas. Os dados foram expressos como média±desvio padrão (DP), utilizando análise não paramétrica pelo teste de Mann-Whitney para Western blot e análise unilateral de variância (one-way ANOVA) pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Diferenças significativas foram determinadas utilizando-se  $p < 0,05$  (\*) como o critério de significância.

## 3 Resultados

### 3.1 Análise histológica

As medidas do comprimento das superfícies re-epitelizadas (Figuras 1A) aos 4 dias de tratamento não apresentaram diferença estatística. No entanto, aos 7 dias foi observado que o comprimento desta área no Tratado com EB, apresentaram-se 60% maior em comprimento do que o Controle ( $p < 0,05$ ) (Figura 2).

Aos 10 e 21 dias, a superfície re-epitelizada Controle foi de 66% e 28% mais espessa que no Tratado com EB, respectivamente (Figura 1B). Aos 14 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Figura 1. Representação da média±desvio padrão da (A) medida do comprimento ( $\mu\text{m}$ ) da superfície de reepitelização, aos 4 e 7 dias e (B) da espessura ( $\mu\text{m}$ ), aos 10 e 14 dias de tratamento ( $n=5$ ). Análise estatística realizada em ANOVA com  $*(p < 0,05)$  comparado com o gel base. (■) Tratado com EB e (▒) Controle. Tratado com EB: ferida tratada com gel contendo 1% de extrato bruto; Controle: ferida tratada com gel base.

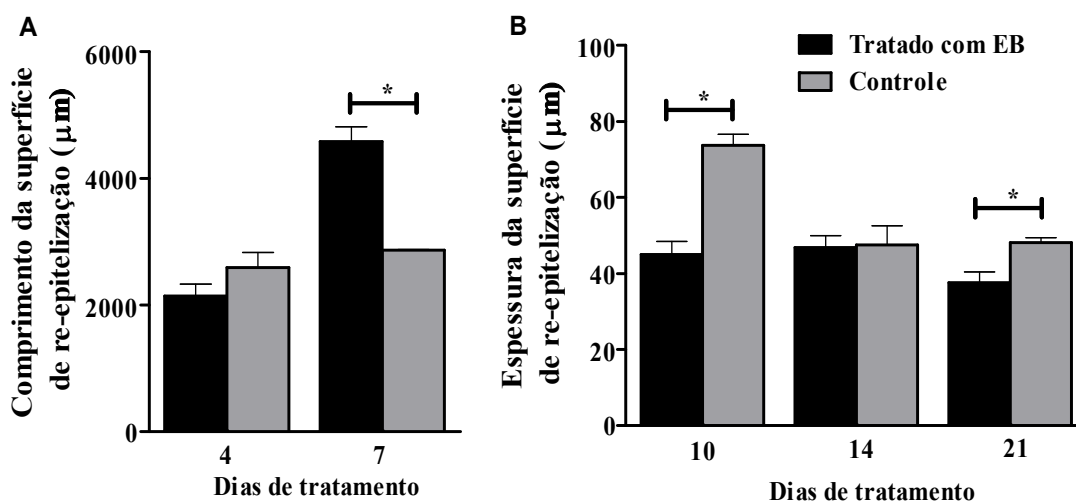
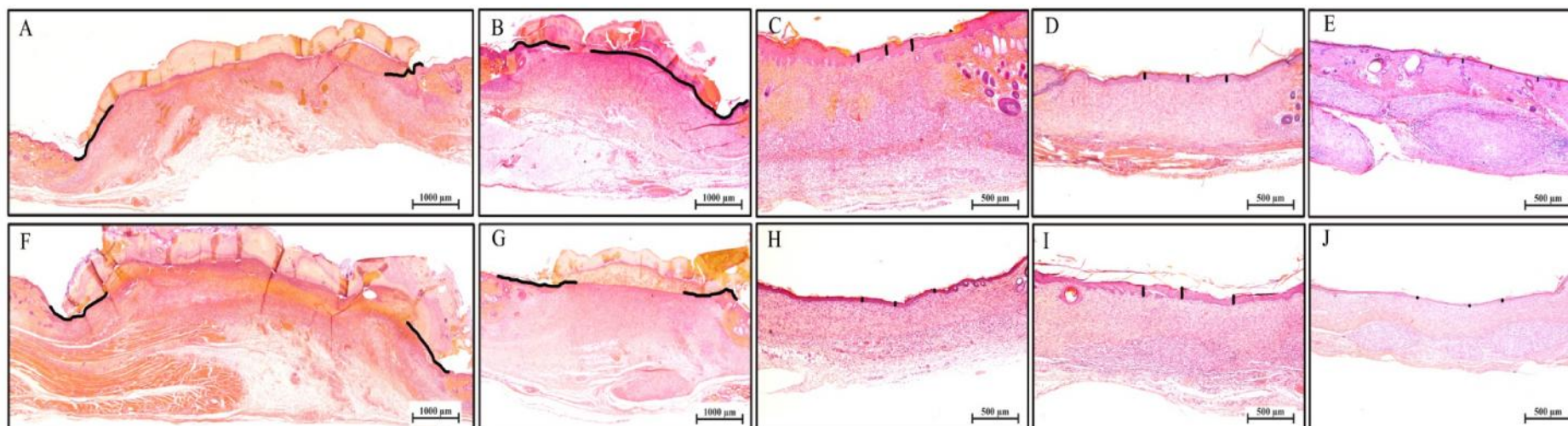


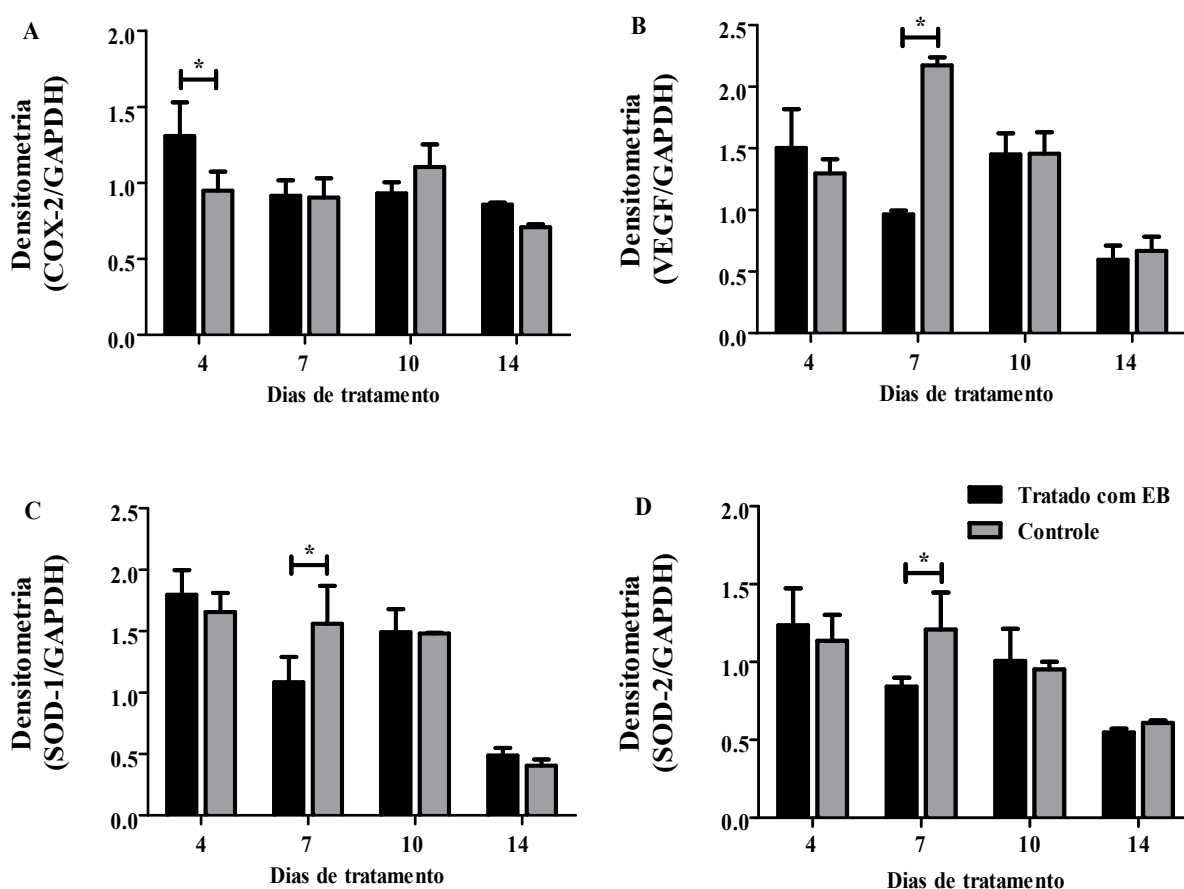
Figura 2. Cortes histológicos de feridas cutâneas de ratos diabéticos coradas em HE aos (A,F) 4, (B,G) 7, (C,H) 10, (D,I) 14 e (E,J) 21 dias de tratamento com EB e gel base, respectivamente. (—) comprimento da superfície de re-epitelização; (■) espessura da superfície de re-epitelização. HE: hematoxilina-eosina.



### 3.2 Análise de proteínas por western blot

Aos 4 dias o Tratado com EB apresentou uma maior quantidade de COX-2 em relação ao Controle ( $p<0,05$ ) (Figure 3A). Não houve diferença estatística entre os tratamentos em 7, 10 e 14 dias. O nível de VEGF foi significativamente menor ( $p<0,05$ ) no Tratado com EB quando comparado ao Controle aos 7 dias de tratamento (Figura 3B). Por outro lado, aos 4, 10 e 14 dias não houve diferença estatística entre os tratamentos. Ao analisar SOD-1 (Figure 3C) e SOD-2 (Figura 3D) aos 7 dias o Tratado com EB apresentou uma menor quantidade dessas proteínas do que o Controle ( $p<0,05$ ). Ainda observa-se que não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos em 4, 10 e 14 dias. Tratado com EB: ferida tratada com gel contendo 1% de extrato bruto; Controle: ferida tratada com gel base.

Figura 3. Densitometria das proteínas (A) COX-2, (B) VEGF, (C) SOD-1 e (D) SOD-2 do (■) Tratado com EB e (▒) Controle. O GAPDH foi definido como 100%. Os resultados foram expressos como média±desvio padrão. Os valores são a média de três testes independentes. Os dados estatísticos foram usados para comparação entre os dias de tratamento (\* $p<0,05$ ).



#### 4 Discussão

Feridas com problemas na reparação tecidual são comuns em pacientes diabéticos. O tratamento para uma cicatrização completa muitas vezes requer anos e cuidados especiais dos pacientes. Com isso a busca de novos agentes que apresentem atividade que favoreça e/ou acelere o processo cicatricial vem aumentando cada vez mais. Estudos recentes (Bueno et al., 2014) mostraram que a *P. pluviosa* é capaz de estimular a viabilidade e proliferação celular de queratinócitos presentes na epiderme. O Capítulo 2 mostrou a ação da *P. pluviosa* na migração desses queratinócitos para o centro da ferida aos 4 dias e proliferação e diferenciação aos 10 e 14 dias de tratamento de ratos normoglicêmicos. Nesse estudo, o uso do EB em ratos diabéticos mostrou que houve uma maior estimulação da migração celular entre o quarto e sétimo dia de tratamento dos animais, com presença também de proliferação celular na margem da ferida. No entanto, a migração celular foi estimulada intensamente sendo a que a epiderme recobriu parcialmente ou totalmente o tecido de granulação. Aos 10, 14 e 21 de tratamento as margens da ferida se encontraram e a re-epitelização começou atuar na espessura, e não mais no comprimento da epiderme, sendo a lesão totalmente recoberta por células epidermais.

A expressão da proteína COX-2 é induzida em resposta a uma injúria, processo inflamatório ou em ativação celular (HARDLY et al., 2002). O processo inflamatório nos ratos diabéticos foi muito mais intenso nos primeiros dias de tratamento do que foi observado por Bueno et al. (2015) em ratos normoglicêmicos. A COX-2 catalisa a produção da prostaglandina ( $E_2$ ), produzida na pele a partir do ácido araquidônico, além de atuar na estimulação proliferação da epiderme *in vivo*, e supõe-se que ela seja produzida a partir de queratinócitos na epiderme (PENTLAND & NEEDLEMAN, 1986). Os queratinócitos além de migrarem em grande intensidade a partir dos 4 dias de tratamento, também sofrem estímulo de COX-2 quanto à proliferação celular, sendo mais evidenciada a diferenciação dos queratinócitos a partir dos 10 dias. Sabe-se que a vascularização exerce papel importante no tecido de reparação envolvendo diversos fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão. O VEGF faz parte da família mais importante deste processo 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 angiogênese ocorre em resposta a um estresse (processo cicatricial) e em situações patológicas (OZAWA et al., 2001). Durante o processo cicatricial ocorre a indução de citocinas angiogênicas que podem ocorrer devido à hipóxia do tecido (HARRON et al., 2000). Aos 7 dias de tratamento a concentração de VEGF decresce no Tratado com EB devido a presença de uma região já vascularizada ou uma região onde está ocorrendo a permeação do oxigênio para a pele, não necessitando de produção de VEGF neste período. Sano et al. (2012) também encontraram uma baixa concentração de VEGF no tratamento de feridas com uma membrana permeável ao oxigênio. Assim, sem a hipóxia estabelecida no tecido, o processo de neovascularização é diminuído. A presença do oxigênio permite a re-epitelização e formação do tecido de granulação.

Durante a cicatrização da pele, células do sistema imunológico são ativadas e, com isso, há produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ROS são importantes na primeira fase da cura de feridas para remover as bactérias e mediar a inflamação (ILANGO & CHITRA, 2010). No entanto, na segunda fase de cicatrização da ferida, a migração e a proliferação celular podem ser inibidas pelo estresse oxidativo causado pelos níveis excessivos de ROS. A SOD é uma proteína antioxidante com um papel crucial como eliminadora de ROS, ao converter o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (KANTA et al., 2011).

Sabe-se que os níveis de enzimas antioxidantes são reduzidos na pele em caso de lesão (SHUKLA; RASIK; PATNAIK, 1997), sendo esta redução um dos principais fatores que leva ao retardo no processo cicatricial em animais portadores de diabetes (RASIK & SHUKLA, 2000). Além disso, foi observado em estudos prévios que, em animais normoglicêmicos, o tratamento com o gel contendo EB de sibipiruna aumentou os níveis de SOD nas feridas se comparados aos animais tratados com gel base.

Os possíveis mecanismos de ação do extrato bruto de sibipiruna juntamente com os demais resultados são importantes para a geração de uma futura formulação que possa acelerar e melhorar o processo cicatricial, tornando-o mais eficiente em menor tempo de tratamento.

## Referências

- AGYARE, C.; LECHTENBERG, M.; DETERS, A.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine*, v.18, p.617-624, 2011.
- BUENO, F.G.; PANIZZON, G.P. MELLO, E.V.S.L.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; MELLO, J.C.P.; HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on *in vitro* cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia*, v.99, p.252-260, 2014.
- GAUTAM, M.K.; PUROHIT, V.; AGARWAL, M.; SINGH, A.; GOEL, R.K. *In vivo* healing potential of *Aegle marmelos* in excision, incision, and dead space wound models. *The Scientific World Journal*, v.2014, p.1-9, 2014.
- HARDLY et al. 2002 Selective cyclooxygenase-2 inhibition does not alter keratinocyte wound responses in the mouse epidermis after abrasion. *J. Pharm. Exp. Ther.* 304(3): (959-967).
- HARRON, Z.A.; RALEIGH, J.A.; Greenberg CS; Dewhirst MW 2000 Early Wound Healing Exhibits Cytokine Surge Without Evidence of Hypoxia. *Ann Surg.* 231(1): 137.
- HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; MENSAH, A.Y. HENSEL, A.; DETERS, A.M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.100-107, 2005.
- ILANGO, K.; CHITRA, V. 2010 Wound healing and anti-oxidant activities of the fruit pulp of *Limonia acidissima* Linn (Rutaceae) in rats. *Trop. J. Pharm. Res.* 9: (223-230).

- KANTA, J. 2011 The role of hydrogen peroxide and other reactive oxygen species in wound healing. *Acta Med.* 54(3): (97-101).
- 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.
- OZAWA K et al. 2001 Expression of the oxygen-regulated protein ORP150 accelerates wound healing by modulating intracellular VEGF transport. *J. Clin. Invest.* 108: (41-50).
- PENTLAND AP; NEEDLEMAN P 1986 Modulation of keratinocyte proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. *J. Clin. Invest.* 77: (246-251).
- RASIK AM; SHUKLA A 2000 Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int. J. Exp. Pathol.* 81(4): (257-263).
- SANO H, ICHIOKA S, SEKIYA N (2012) Influence of oxygen on wound healing dynamics: assessment in a novel wound mouse model under a variable oxygen environment. *PLoS One* 7: e50212.
- SERENA, T.E. A global perspective on wound care. *Advance in wound care*, v.3, p.548-552, 2014.
- SHAW, J.E.; SICREE, R.A.; ZIMMET, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.87, p.4-14, 2010.
- SHUKLA A; RASIK AM; PATNAIK GK Depletion of Reduced Glutathione, Ascorbic Acid, Vitamin E and Antioxidant Defence Enzymes in a Healing Cutaneous Wound. *Informa Healthcare*, v.16p.93-101, 1997.
- STEED, D.L.; ATTINGER, C.; COLAIZZI, T.; CROSSLAND, M.; FRANZ, M.; HARKLESS, L.; JOHNSON, A.; MOOSA, H.; ROBSON, M.; SERENA, T.; SHEEHAN, P.; VEVES, A.; WIERSMA-BRYANT, L. Guidelines for the treatment of diabetic ulcers. *Wound Repair and Regeneration*, v.14, p.680-692, 2007.
- TRAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S.S. Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2011, p.1-17, 2011.
- WHITING, D.R.; GUARIGUATA, L.; WEIL, C.; SHAW, J. IDF Diabetes atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.94, p.311-321, 2011.



O extrato bruto (EB) das cascas de *P. pluviosa* estimulou a viabilidade e a proliferação celular de queratinócitos. Além disso, atuou estimulando a viabilidade celular de fibroblastos *in vitro*, mostrando que possivelmente houve diferenciação celular dos fibroblastos da derme.

A partir do estudo bioguiado *in vitro*, a subfração FC1 apresentou a melhor atividade frente à viabilidade e proliferação celular de queratinócitos e a viabilidade celular de fibroblastos. A FC1 não apresentou toxicidade em contato com as células.

Da FC1 foram identificadas por meio de estudos de MS/MS as substâncias: pirogalol, ácido gálico, galato de metila, ácido elágico, corilagina, geranina, 1, 4,6-tri-*O*-galoil-glucose, 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil-glucose, 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil-glucose, tellimagrandina I, tellimagrandina II, ácido malotínico e ácido malotusínico. A quantidade de taninos hidrolisáveis existentes na FC1 podem estar influenciando a atividade sobre as linhagens celulares avaliadas.

O extrato hidroalcoólico de *P. pluviosa* foi avaliado quanto à ação cicatrizante em ratos normoglicêmicos. O estudo histológico mostrou que o EB estimulou o processo de re-epitelização sendo que o tratamento com EB permitiu a aceleração da migração e proliferação dos queratinócitos. O EB estimulou o amadurecimento das fibras colágenas tipo III em Tipo I aos 4, 7 e 10 dias de tratamento, permitindo a formação de um tecido epitelial com um aspecto organizado.

A espectroscopia fotoacústica demonstrou a permeação do EB através da pele injuriada.

As proteínas analisadas durante os dias de tratamento foram reguladas de forma que aos 4 dias de tratamento houve aumento significativo de VEGF e aos 7 dias de COX-2 e SOD-2. Essa regulação na produção de proteínas permitiu que houvesse um diferencial no processo cicatricial após 7 dias de tratamento com EB.

O tratamento com EB em ratos diabéticos demonstrou a estimulação da migração celular entre o quarto e sétimo dia de tratamento dos animais, com presença também de proliferação celular na margem da ferida. Aos 10, 14 e 21 de tratamento as margens da ferida se encontraram e a re-epitelização começou atuar na espessura, e não mais no comprimento da epiderme, sendo a lesão totalmente recoberta por células epidermais. Aos 10 dias, o Tratado com o EB apresentou uma remodelação da matriz celular antecipada, já que o mesmo resultado foi encontrado no Controle apenas 4 dias após.

As proteínas analisadas durante os dias de tratamento foram reguladas de forma que aos 4 dias o Tratado com EB estimulou COX-2 e diminui o nível de VEGF, SOD-1 e SOD-2 aos 7 dias com o Tratado com EB.



Cada vez mais tem-se visto pacientes com processo de cicatrização de ferida retardado, normalmente pacientes com diabetes *mellitus*. Estes pacientes sofrem pela dor constante e principalmente pela perda de função de membros devido ao aumento da ferida que não cicatriza pelos métodos convencionais, como com o uso da limpeza e antibióticos locais. Em alguns casos é possível se deparar com a amputação de membros, o que diminui ainda mais a qualidade de vida desse paciente. O uso de qualquer agente farmacológico que permita a reparação tecidual local, seja pela ação antibiótica, anti-inflamatória, antioxidante ou mesmo estimulando fatores de crescimento, é de grande auxílio para a melhoria da qualidade de vida.

Assim, a comprovação da atividade farmacológica do extrato bruto de *P. pluviosa* *in vitro* e *in vivo* na cicatrização de feridas, principalmente em feridas de ratos diabéticos, é importante para se avaliar o uso desse extrato/fração ou da formulação. No entanto, para que a formulação seja utilizada pela população é necessário garantir além da eficácia, a segurança, por meio de estudos não clínicos e clínicos. Os estudos não clínicos são aqueles que não envolvem seres humanos devendo-se seguir o “Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”.

Além dos resultados presentes nos artigos, também foram realizadas ensaios que avaliam o EB quanto a sua toxicidade aguda e mutagenicidade em camundongos (*Mus musculus*) (ANEXO A). Estes testes fazem parte dos ensaios não clínicos que devem ser realizados, assim como a avaliação do potencial de irritação e corrosão em pele, teste de fototoxicidade e outros que podem ser realizados através de testes *in vitro* como determinado pela Resolução Normativa N°18, de 24 de setembro de 2014 (BRASIL, 2014).

Após a determinação da ausência de toxicidade, é necessária a realização de ensaios clínicos em seres humanos para se obter o máximo de segurança com o menor risco possível, garantindo o uso do produto em humanos. A etapa clínica deve ser muito bem programada quanto ao número de voluntários, e aprovação pelo Comitê de Ética em Seres Humanos. A perspectiva deste trabalho é iniciar os ensaios clínicos por meio de projeto de pesquisa a ser apresentado a órgão de fomento.

Além da forma farmacêutica gel, pretende-se desenvolver, em parceria com grupo de Tecnologia Farmacêutica, novas formas farmacêuticas em que o EB de *P. pluviosa* possa ser incorporado e utilizado nos pacientes. A elaboração de outras formas farmacêuticas visa uma melhor permeação do EB ou subfração e liberação controlada da mesma, além de melhor adaptação, aceitação e adesão pelo paciente.

## ***REFERÊNCIAS***



- AGYARE, C.; LECHTENBERG, M.; DETERS, A.; PETEREIT, F.; HENSEL, A. Ellagitannins from *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell.: Geraniin and furosins stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine*, v.18, p.617-624, 2011.
- AN, K.; NAYEEM, N. Formulation and evaluation of the methanolic extract of *Caesalpinia pulcherrima* leaves for its wound healing activity. *Asian Journal Pharmaceutical Research and Health Care*, v.4, p.90-94, 2012.
- BACCHI, E.M.; SERTIÉ, J.A.A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica*. 1995, 61, 204–207.
- BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal Ethnopharmacology*, v.73, p.271-275, 2000.
- BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T.R.; BABU, M. Skin substitutes: a review. *Burns*, v.27, p.534-544, 2001.
- 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.
- BHATTACHARYA, S. Wound healing through the ages. *Indian Journal of Plastic Surgery*, v.45, p.177-179, 2012.
- BISHOP, A. Role of oxygen in wound healing. *Journal of Wound Care*, v.17, p.399-402, 2008.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Normativa nº 18 – Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil - de 24 de setembro de 2014. Brasília, DF 2014.
- BRITANNICA ACADEMIC EDITION. Acessado em 24 de Julho de 2014. Disponível em: <http://britannica.com/EBchecked/topic/199651/Fabaceae>
- BUENO, F.G.; PANIZZON, G.P. MELLO, E.V.S.L.; LECHTENBERG, M.; PETEREIT, F.; MELLO, J.C.P.; HENSEL, A. Hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: Phytochemical investigations and influence on *in vitro* cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia*, v.99, p.252-260, 2014.
- CHAKRABARTI, S.; BISWAS, T.K.; SEAL, T.; ROKEYA, B.; ALI, L.; KHAN, A.K.A.; NAHAR, N.; MOSIHUZZAMAN, M.; MUKHERJEE, B. Antidiabetic activity of *Caesalpinia bonducella* F. in chronic type 2 diabetic model in Long-Evans rats and evaluation of insulin secretagogue property of its fractions on isolated islets. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.117-122, 2005.
- CHEW, Y.L.; LING CHAN, E.W.; TAN, P.L.; LIM, Y.Y.; STANSLAS, J.; GOH, J.K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. *BMC Complem. Altern. M.* 2011, 11, doi:10.1186/1472-6882-11-12.
- CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Wound healing plants of Jalgaon district of Maharashtra State, India. *Ethnobotanical Leaflets*, v.13, p.1-32, 2009.

- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; VENTRELLA, M.C.; LEITE, I.T.A.; BRAGA, J.T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminales) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore*, v.32, p.641-650, 2008.
- CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M. Collagen in the scarless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. *Wound repair and regeneration*, v.13, p.198-204, 2005.
- DETERS, L. A.; DAUER, A.; SCHNETZ, E.; FARTASCH, M.; HENSEL, A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, v.58, p.949-958, 2001.
- DIAS, A.M.A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R.A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, A.; CONCEIRO, A.; JÚNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.74, p.34-46, 2013.
- DICKSON, R.A.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. *Phytochemistry*, v.68, p. 1436-1441, 2007.
- DICKSON, R.A.; ANNAN, K.; FLEISCHER, T.C.; HOUGHTON, P.J. Bethaminin 3, a novel antibacterial cassane-type furanoditerpenoid from *Caesalpinia benthamiana*. *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*, v.2, p.21-26, 2012.
- ESIMONE, C.O.; NWORU, C.S.; JACKSON, C.L. Cutaneous wound healing activity of a herbal ointment containing the leaf extract of *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). *International Journal of Applied Research in Natural Products*, v.1, p.1-4, 2008.
- FARO, A.M.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E.; NARDI, A.B.; MOTTA, F.R.; EURIDES, D. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. *Ars Veterinaria*, v.24, p.001-008, 2008.
- FERREIRA, F.B.; BURITY, C.H.F.; PISSINATTI, A. Histologia do tegumento em *Cebus robustus* (Silva Jr., 2001) e *Cebus xanthosternus* (Wied-Neuwied, 1826): cativos, *Cebidae-Primates*. *Saúde e Ambiente em revista*, v.2, p.50-67, 2007.
- FLORA DO BRASIL. Acessado em: 24 de Julho de 2014. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>
- FLORES, Y.; VILA, J.; ALMANZA, G.R. Secondary metabolites from *Caesalpinia pluviosa*. *Revista Boliviana de Química*, v.23, 1-10, 2006.
- FRANCISCHETTI, I.M.B.; SA-NUNES, A.; MANS, B.J.; SANTOS, I.M.; RIBEIRO, J.M.C. The role of saliva in tick feeding. *Frontiers in Bioscience*, v.4, 2009.
- 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.
- GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.; LIU, C.; ZHU, Y.; MA, X.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology*, v.130, p.116-121, 2010.

- GEETHALAKSHMI, R. SAKRAVARTHI, C.; KRITIKA, T.; KIRUBAKARAN, M.A.; SARADA, D.V.L. Evaluation of antioxidant and wound healing potencies of *Sphaeranthus amaranthoides* Burm f. *Biomed Research International*, v.2013, p.1-7, 2013.
- GOISAN, A.; DIPIETRO, L.A. Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, v.28, p.321-326, 2004.
- GOODMAN, C.C.; FULLER, K. Pathology: Implications for the Physical Therapist. Library of Congress Cataloging-in-Publications Data. 3 ed. Saunders Elsevier:Missouri, 2009.
- GUARIGUATA, L.; WHITING, D.R.; HAMBLETON, I.; BEAGLEY, J.; LINNENKAMP, U.; SHAW, J.E. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.103, p.137-149, 2014.
- GUO, S.; DIPIETRO, L.A. Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, v.89, p.219-229, 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.
- HASLAM, E. Practical Polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1.ed., p.10-83, 1998.
- HEGGERS, J.P.; KUCUKCELEBI, A.; LISTENGARTEN, D.; STABENAU, J.; KO, F.; BROEMELING, L.D.; ROBSON, M.C.; WINTERS, W.D. Beneficial effect of Aloe on wound healing in an excisional wound model. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, v.2, p.271-277, 1996.
- HEMMATI, A.A.; AGHEL, N.; RASHIDI, I.; GHOLAMPUR-AGHDAMI, A. Topical grape (*Vitis vinifera*) seed extract promotes repair of full thickness wound in rabbit. *International Wound Journal*, v.8, p.514-520, 2011.
- 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, p.431-436, 2010.
- HOFMAN, K.; HALL, B.; CLEAVER, H.; MARSHALL, S. High-Throughput quantification of hydroxyproline for determination of collagen. *Analytical Biochemistry*, v.417, p.289-291, 2011.
- HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; MENSAH, A.Y. HENSEL, A.; DETERS, A.M. In vitro tests and ethnopharmacological investigations: Wound healing as an example. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.100-107, 2005.
- HSU, F.; HUANG, W.; WU, T.; LEE, M. CHEN, L.; LU, H.; HOU, W.; LIN, M. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of polyphenolics from pods of *Caesalpinia pulcherrima*. *International Journal of Molecular Science*, v.13, p.6073-6088, 2012.
- JAIN, S.K. Dictionary of Indian folk medicine and ethnobotany. Deep publication, Paschim Vihar, New Delhi, 1991 *apud* AYYANAR, M.; IGNACIMUTHU, S. Herbal medicines for wound healing among tribal people in Southern India: ethnobotanical and scientific evidences. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, v.2, p.29-42, 2009.
- JIANG, Y. et al. Epidemiology of chronic cutaneous wounds in China. *Wound repair and regeneration*, v.19, p.181-188, 2011.

- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.428-430, 2002.
- JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*, v.41, p.267-274, 1978 apud CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M. Collagen in the sacrlless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. *Wound repair and regeneration*, v.13, p.198-204, 2005.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 11<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.
- KAMATH, J.V.; RANA, A.C.; CHOWDHURY, A.R. Pro-healing effect of *Cinnamomum zeylanicum* bark. *Phytotherapy Research*, v.17, p.970-972, 2003.
- KAYANO, A.C.; LOPES, S.C.; BUENO, F.G.; CABRAL, E.C.; SOUZA-NEIRAS, W.C. et al. *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. *Malaria Journal*, v.10, p.112, 2011.
- KEKUDA, T.R.P.; MALLIKARJUN; SWATHI, D.; NAYANA, K.V.; AIYAR, M.B.; ROHINI, T.R. Antibacterial and antifungal efficacy of steam distillate of *Moringa oleifera* Lam.. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, v.2, p.34–37, 2010.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas Aplicadas*, v.30, p.241-248, 2009.
- 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.
- KUMAR, B.; VIJAYAKUMAR, M.; GOVINDARAJAN, R.; PUSHPANGADAN, P. Ethnopharmacological approaches to wound healing--exploring medicinal plants of India. *Journal of Ethnopharmacology*, v.114, p.103-113, 2007.
- LEWIS G.P. *Caesalpinia*. A revision of the *Poincianella-Erythrostemon* group. Royal Botanic Gardens, Kew, 1998 apud QUEIROZ, L.P. Leguminosas da caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.
- LEWIS G.P. Tribe Caesalpinieae. In LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, 2005 apud QUEIROZ, L.P. Leguminosas da caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, 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.
- MACKAY, D.; MILLER, A.L. Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review*, v.8, p.359-377, 2003.
- MAHAJAN, S.G.; MALI, R.G.; MEHTA, A.A. Protective effect of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. against inflammation associated with development of arthritis in rats. *Journal of Immunotoxicology*, v.4, p.39–47, 2007.

- MOLNÁR-PERL, I. HPLC of amino acids as o-phthalaldehyde derivatives. Quantification of amino acids and amines by chromatography. *Journal of Chromatography Library*, v.70, p.163-198, 2005.
- MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C. The use of Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p.1-11, 1991.
- MUHAMMAD, A.A.; PAUZI, N.A.S.; ARULSELVAN, P.; ABAS, F.; FAKURAZI, S. *In vitro* wound healing potential and identification of bioactive compounds from *Moringa oleifera* Lam. *BioMed Research International*, v.2013, p.1-10, 2013.
- MUTHUKUMAR, T.; SENTHIL, R.; SASTRY, T.P. Synthesis and characterization of biosheet impregnated with *Macrotyloma uniflorum* extract for burn/wound dressings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.102, p.694-699, 2013.
- MUTHUKUMAR, T.; ANBARASU, K.; PRAKASH, D.; SASTRY, T.P. Effect of growth factors and pro-inflammatory cytokines by the collagen biocomposite dressing material containing *Macrotyloma uniflorum* plant extract—*In vivo* wound healing. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.121, p.178-188, 2014.
- NAKAMURA, S.E.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F.J. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letter*, v.177, p.119-124, 2012.
- OLIVEIRA, A.F.; BATISTA, J.S.; PAIVA, E.S.; SILVA, A.E.; FARIAS, Y.J.M.D.; DAMASCENO, C.A.R.; BRITO, P.D.; QUEIROZ, S.A.C.; RODRIGUES, C.M.F.; FREITAS, C.I.A. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, p.302-310, 2010.
- PARK, E.; LEE, S.M.; JUNG, I.K.; LIM, Y.; KIM, J.H. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.410, p.514-519, 2011.
- QUEIROZ, L.P. Leguminosas da caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.
- QUEIROZ, L.A. New combinations in *Libidibia* (DC.) Schltdl. and *Poincianella* Britton & Rose (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Neodiversity*, v.5, p.11-12, 2010.
- REDDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical Biochemistry*, v.29, p.225-229, 1996.
- RODERO, M.P.; KHOSROTEHRANI, K. Skin wound healing modulation by macrophages. *International of Clinical & Experimental Pathology*, v. 3, p.643-653, 2010.
- ROSS, M.H.; PAWLINA, W. Histologia, texto e atlas em correlação com biologia celular e molécula. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. Dermatologia. 3 ed: São Paulo: Artes Médicas, 2007.
- SANTORO, M.M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Experimental Cell Research*, v.304, p.274-286, 2005.
- SASIDHARAN, S.; LOGESWARAN, S.; LATHA, Y. Wound healing activity of *Elaeis quineensis* leaf extract ointment. *International Journal of Molecular Science*, v.13, p.336-347, 2012.

- 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.
- SHAH, J.B. The history of wound care. *Journal of the American College of Certified Wound Specialists*, v.3, p.65-6, 2011.
- SHERRATT, J.A.; DALLON, J.C. Theoretical model of wound healing: past successes and future challenges. *Comptes Rendus Biologies*, v.325, p.557-564, 2002.
- SHETTY, B.S.; UDUPA, S.L.; UDUPA, A.L.; SOMAYAJI, S.N. Effect of *Centella asiatica* L (Umbelliferae) on normal and dexamethasone-suppressed wound healing in wistar albino rats. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, v.5, p.137-143, 2006.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; MEHTA, P.; VYAS, S.P.; SHUKLA, S. Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, v.125, p.252-256, 2009.
- SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. Fitoterapia Racional – Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. 4º ed. Manole, 2002.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, v.341, p.738-746, 1999.
- SRINIVASA, S.; SELVAM, G.G.; KARTHIK, S.; MATHIVANAN, K.; BASKARAN, R.; KARTHIKEYAN, M.; GOPI, M.; GOVINDASAMY, C. *In vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia sappan* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p.S136-S139, 2012.
- STADELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. *The American Journal of Surgery*, v.176, p. 26S-38S.
- STEGEMANN, H.; STALDER, K. Determination of hydroxyproline. *Clinica Chimica Acta*, v.18, p.267-273, 1967.
- SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules*, v.14, p.2167-2180, 2009.
- TRAKUR, R.; JAIN, N.; PATHAK, R.; SANDHU, S.S. Practices in wound healing studies of plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.2011, article ID 438056, 2011.
- VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *The Journal of International Medical Research*, v.37, p.1528-1542, 2009.
- ZANIN, J.L.B.; DE CARVALHO, B.A.; MARTINELLI, P.S.; DOS SANTOS, M.H.; LAGO, J.H.G.; SARTORELLI, P.; VIEGAS JR, C.; SOARES, M.G. The genus *Caesalpinia* L. (Caesalpinaceae): phytochemical and pharmacological characteristics. *Molecules*, v.17, p.7887-7902, 2012.
- WANG, R.; LECHTENBERG, M.; SENDKER, J.; PETEREIT, F.; DETERS, A.; HENSEL, A. Wound-healing plants from TCM: *in vitro* investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia*, v.84, p.308-317, 2013.
- WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v.27, p.1047-1053, 2004.

WOESSNER, J.F. The determination of determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. *Archives of biochemistry and biophysics*, v.93, p.440-447, 1961.

YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The phisiology of woung healing. *Surgery (Oxford)*, v.29, p.475-479, 2011.

## ***APÊNDICE***

---

---

Estes resultados foram obtidos durante o período de doutoramento e serão publicados juntamente com outros dados que estão sendo analisados.

## APÊNDICE A

## Toxicidade aguda e mutagenicidade

**A1 Comitê de Ética**

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo 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 e teve parecer favorável à sua execução (Parecer nº 090/2011; Protocolo nº 056/2009). A avaliação da toxicidade aguda e mutagenicidade foram realizadas de acordo com as diretrizes da ANVISA (BRASIL, 2004).

**A2 Toxicidade aguda**

No teste de toxicidade aguda foram utilizados 60 camundongos Swiss divididos em 6 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) e os mesmos foram tratados por gavagem em dose única. O grupo controle negativo recebeu apenas salina, enquanto os demais grupos receberam o EB de *P. pluviosa* nas doses de 1, 2, 3, 4 e 5 g/kg. Os animais foram observados, após a administração das doses, pelos períodos de: 15, 30, 60 min, 4, 8, 12 e 24 h e, após, diariamente até 14 dias. Foram observados os parâmetros alteração da locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e contorções abdominais.

Durante os dias de observação não foram encontradas alterações nos parâmetros de locomoção, frequência respiratória, piloereção, diarreia, sialorreia, alteração do tônus muscular, hipnose, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central e contorções abdominais. Após 14 dias da administração, os animais foram sacrificados com superdosagem da anestesia e autopsiados. Não ocorreram alterações anatômicas macroscópicas nos órgãos nas concentrações testadas. Durante o período de observação dos animais não houve nenhuma morte, apresentando uma dose letal  $DL_{50} > 5000$  mg/kg. Dentre as classes do sistema *Globally Harmonised System* (GHS) essa dosagem de  $DL_{50}$  não é classificada por serem substâncias de muito baixa toxicidade (ou praticamente atóxicas), pois não houve letalidade nas doses utilizadas nos camundongos para ambos os sexos avaliados.

**A3 Atividade mutagênica**

Para o teste de mutagenicidade foram utilizados 60 camundongos Swiss divididos em 6 grupos de 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas) e tratados por gavagem em dose única. O grupo controle negativo recebeu apenas salina e o grupo controle positivo ciclofosfamida (50 mg/kg). Os demais grupos foram testados com EB de *P. pluviosa* na dose de 3 g/kg. Após 24 h da administração, os animais foram sacrificados com superdosagem da anestesia e o par de fêmures retirado. Em seguida,

as epífises próximas foram limpas em soro fisiológico, seccionadas e a medula óssea foi retirada, lavada com soro bovino fetal e centrifugada (3000x g, 5 min). Foram realizados esfregaços do sedimento obtido em lâminas limpas e desengorduradas. Após secagem ao ar, estas lâminas foram coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa para detecção dos eritrócitos policromáticos micronucleados. Para cada animal foram preparadas 2 lâminas. Estas lâminas foram analisadas pela contagem em microscópio óptico (objetiva de 100x) de 1000 eritrócitos policromáticos. Dentre estes eritrócitos policromáticos, foi determinada a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados. O efeito mutagênico foi caracterizado caso houvesse um aumento significativo de eritrócitos policromáticos micronucleados em relação ao controle negativo (CASTRO et al., 2004). Análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney com  $*p<0,05$  comparado com o controle negativo.

Durante a avaliação de mutagenicidade, não foi relatada nenhuma morte dos animais. A concentração de EB testada (3 g/kg) não apresentou número de eritrócitos policromáticos micronucleados estatisticamente diferente do controle negativo (Tabela A1).

Tabela A1 – Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPM) encontrados em 1000 eritrócitos policromáticos. CP: controle positivo; CN: controle negativo; S3: 3 g/kg de extrato bruto de *P. pluviosa*; DP: desvio padrão;  $*p<0,05$ .

| Grupo | Sexo  | Média±DP  |
|-------|-------|-----------|
| CP    | Macho | 31,6±2,1* |
|       | Fêmea | 25,3±4,0* |
| CN    | Macho | 5,5±1,0   |
|       | Fêmea | 3,83±1,0  |
| S3    | Macho | 5,4±0,9   |
|       | Fêmea | 5,3±0,6   |

***ANEXOS***

---

---

## ANEXOS



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comitê de Conduta 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.



*Drª 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

www.ppg.uem.br - e-mail: ceeae@uem.br



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



Parecer emitido após reunião realizada em: 1 /11/2011

Parecer nº 090/2011

Pesquisador: João Carlos Palazzo  
de Mello

Sector: 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 do relatório final.*

#### Considerações e Parecer:

Após a análise dos contidos às folhas 157 a 177, envolvendo a solicitação de emenda de metodologia ao protocolo 056/2009, pesquisa "CAESALPINIA PELTOPHOROIDES E STRYPHONODENDRON ADSTRINGENS: ANÁLISE FITOQUÍMICA, TECNOLÓGICA E BIOLÓGICA IN VITRO E IN VIVO.", coordenada pelo Prof. Dr. JOÃO CARLOS PALAZZO DE MELLO, tendo em vista ao Projeto de Pesquisa de mestrado e doutorado em Ciências Farmacológicas, a desenvolver-se no bloco H-79 – DCM, constatou-se ter havido atendimento a todos os questionamentos levantados na primeira avaliação da emenda e constatado não haver contrariedade aos princípios éticos no uso de animais em experimentação esse Comitê autoriza a inclusão da emenda no referido protocolo e aguarda relatório final.

Dr. DE CÍCULO MARIN DE MORAES,  
Presidente do Conselho CEAE

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.

www.ppg.uem.br - e-mail: ceae@uem.br