



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



**ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO BRUTO DE *Poincianella pluviosa*
INCORPORADO A HIDROGÉIS**

ANA CAROLINA GUIDI

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

MARINGÁ, 2017

ANA CAROLINA GUIDI

**ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO BRUTO DE *Poincianella pluviosa*
INCORPORADO A HIDROGÉIS**

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

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

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

MARINGÁ, 2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

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

G947a Guidi, Ana Carolina
Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporada a hidrogéis / Ana Carolina Guidi. -- Maringá, 2017.
106 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Coorientadora: Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2017.

1. *Poincianella pluviosa*. 2. Cicatrização de feridas cutâneas. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Filme polimérico. 5. Ciclodextrina. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Mello, Eneri Vieira de Souza Leite, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

CDD 21.ed. 615.32

ECSL

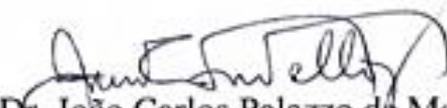
ANA CAROLINA GUIDI

ATIVIDADE CICATRIZANTE DO EXTRATO BRUTO DE *POINCIANELLA PLUVIOSA* INCORPORADA A HIDROGEIS

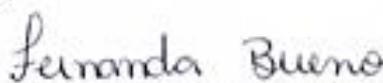
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior
Universidade Estadual de Londrina


Dra. Fernanda Giacomini Bueno
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, Bloco K80 e T22 e Laboratório de Histotécnica animal, Bloco H79 da Universidade Estadual de Maringá. Partes desse trabalho foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana da Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Biotecnologia Enzimática e Laboratório de Fotoacústica da Universidade Estadual de Maringá.

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

GUIDI, A. C.; BUENO, F. G.; MELLO, J. C. P.; LEITE-MELLO, E. V. S. Aplicação da ciclodextrina complexada com extrato de sibipiruna para cicatrização de feridas cutâneas. In: IX EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 2015, Maringá. IX EPCC - Encontro Internacional de Produção Científica UniCesumar, 2015. v. 9. p. 4-8.

GUIDI, A. C.; SOARES, G. C. A.; MEDEIROS, D. C.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; MELLO, J. C. P.; LEITE-MELLO, E. V. S. Análise de permeação cutânea por espectroscopia fotoacústica em feridas tratadas com extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado em filme polimérico. In: 1º Simpósio de Biotecnologia Ambiental & III Encontro de Graduandos e Pós-Graduandos de Biotecnologia, 2016, Maringá. Resumos do 1º Simpósio de Biotecnologia Ambiental & III Encontro de Graduandos e Pós-Graduandos de Biotecnologia, 2016.

KATO, C. G.; SA-NAKANISHI, A. B.; GUIDI, A. C.; MELLO, J. C. P.; PERALTA, R. M. Efeitos inibitórios *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto da casca de Sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) rico em tanino hidrolisável na atividade da amilase pancreática. In: 6º COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2016, Cascavel. Anais do 6º COSIMP, 2016. v. 6.

KATO, C. G.; GUIDI, A. C.; BUENO, F. G.; MELLO, J. C. P.; PERALTA, R. M. Efeito inibitório das frações aquosa e acetato de etila da casca de sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) na atividade da α -amilase pancreática. In: 6º COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2016, Cascavel. Anais do 6º COSIMP, 2016. v. 6.

GUIDI, A. C.; LENARTOWICZ, A. C.; SOARES, G. C. A.; PAULA, M. N.; MEDEIROS, D. C.; MORAIS, G. R.; MATIOLI, G.; BAESSO, M. L.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Poincianella pluviosa* em filme polimérico e em gel com aplicação de ciclodextrina. In: VII Seminário Anual do PCF, 2016, Maringá. Anais do VII Seminário Anual do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016. v. 7.

GUIDI, A. C.; MEDEIROS, D. C.; PAULA, M. N.; SOARES, G. C. A.; DELANORA, L. A.; LENARTOWICZ, A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Atividade cicatrizante e antimicrobiana de *Poincianella pluviosa* em filme polimérico. In: XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simposio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2017, Curitiba. Anais do XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia XVI Simposio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2017.

GUIDI, A. C.; MEDEIROS, D. C.; PAULA, M. N.; LENARTOWICZ, A. C.; MATIOLI, G.; MORAIS, G. R.; BAESSO, M. L.; OLIVEIRA JUNIOR, A. G.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Avaliação da permeação cutânea *ex vivo* de gel contendo extrato de *Poincianella pluviosa* complexado com ciclodextrina. In: XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2017, Curitiba. Anais do XI Simpósio Brasileiro de Farmacognosia e XVI Simpósio Latinoamericano de Farmacobotânica, 2017.

Premiação de mérito científico – 3º lugar. GUIDI, A. C.; KATO, C. G.; SA-NAKANISHI, A. B.; MELLO, J. C. P.; PERALTA, R. M. Efeitos inibitórios *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto da casca de Sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) rico em tanino hidrolisável na atividade da amilase pancreática. 6º COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2016.

*Dedico à minha família,
minha base.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, paciência e perseverança para sempre ir mais longe.

À minha amada família, meus pais Antonio Wagner e Aparecida, minha irmã Luciana e meu namorado Felipe, por todo carinho, apoio e incentivo nas minhas decisões.

Aos meus queridos orientadores João e Eneri, agradeço muito pela oportunidade e por serem espelhos para mim como profissionais.

À toda equipe Palafito, pela colaboração, amizade e conhecimentos repassados.

Às técnicas do laboratório de histologia, por todos os ensinamentos.

Aos alunos de iniciação científica Aline, Gustavo e Leonardo, por toda colaboração, ajuda e oportunidade de aprender ensinando.

À Daniela, Gutierrez, Claudio, Junior e Graciette, pelas contribuições para enriquecimento do trabalho.

Ao Programa de Ciências Farmacêuticas da UEM, por todo suporte.

À CAPES e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro durante o desenvolvimento da pesquisa.

Muito obrigada!!!



Ana Carolina Guidi nasceu em Maringá, PR, no dia 25/06/1990, filha de Antonio Wagner Guidi e Aparecida de Fatima Lima Guidi. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Dr. Gastão Vidigal, em Maringá. Em 2010 ingressou no curso de Farmácia do Centro Universitário de Maringá – UNICESUMAR, onde participou de projeto de iniciação científica relacionado à produtos naturais, cicatrização e inflamação, sob a orientação da Profa. Valéria do Amaral. Realizou estágio nos laboratórios de Histotécnica Animal do Departamento de Ciências Morfológicas e no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, do Departamento de Farmácia, ambos na Universidade Estadual de Maringá - UEM. Em 2015 ingressou no curso de especialização em Farmacologia aplicada à clínica no UNICESUMAR e também iniciou o mestrado acadêmico no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas na UEM, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e coorientação da Profa. Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello.

GUIDI, A. C. 2017. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado a hidrogéis. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas, Farmácia, Universidade Estadual De Maringá, Maringá, 104p.

RESUMO

A *Poincianella pluviosa* já foi descrita previamente como cicatrizante de feridas cutâneas incorporada em gel. Na tentativa de prolongar o contato do fármaco com a ferida, se propôs nesse trabalho avaliar a cicatrização de feridas com uso de filmes poliméricos e de sistemas carreadores como as ciclodextrinas. O trabalho foi dividido em duas partes: 1) Filme polimérico contendo extrato bruto de *P. pluviosa* (EB): caracterização, atividade cicatrizante e antiestafilocócica; 2) EB complexado com ciclodextrina (HP β CD): caracterização do complexo e atividade cicatrizante em gel. Os filmes foram avaliados quanto a suas propriedades físicas e mecânicas e a complexação do EB com HP β CD foi confirmada por testes espectroscópicos. A atividade antiestafilocócica dos filmes foi determinada com cepas de *Staphylococcus aureus*. Para ambos os experimentos *in vivo*, foram realizadas feridas no dorso de ratos e tratadas diariamente por 4, 7, 10 e 14 dias, com o filme ou o gel, de acordo com os grupos. No final de cada período, foi realizada análise de permeação cutânea e histológica quanto à reepitelização proliferação celular e para o tratamento com gel também foi analisado o colágeno. Os dados estatísticos foram obtidos por GraphPad Prism utilizando teste *t* e Mann-Whitney. Foi demonstrado que a presença do EB nos filmes aumentou sua capacidade de absorver água, diminuiu sua resistência e permeabilidade. O EB do filme permeou a pele, atingindo a derme, sendo capaz de influenciar na reepitelização aos 7 e 14 dias e estimular a proliferação celular aos 10 e 14 dias de tratamento, além de apresentar atividade antiestafilocócica frente a cepas de *S. aureus*. A complexação do EB com HP β CD foi confirmada sugerindo sua interação com partes mais apolares do EB. No tratamento com gel EB-HP β CD, houve permeação atingindo a derme, porém nas análises histológicas não foi demonstrado benefícios comparado ao controle negativo. Filmes com EB de *P. pluviosa* podem ser uma alternativa para cicatrização de feridas, protegendo e reparando o tecido e conferindo conforto ao paciente.

PALAVRAS-CHAVES: *Poincianella pluviosa*, cicatrização, *Staphylococcus aureus*, filme polimérico, hidroxipropil- β -ciclodextrina.

GUIDI, A. C. 2017. Healing activity of the crude extract of *Poincianella pluviosa* incorporated in hydrogels. Master degree - Pós-Graduação Em Ciências Farmacêuticas, Farmácia, Universidade Estadual De Maringá, Maringá, 104p.

ABSTRACT

Poincianella pluviosa has already been described as a healing of skin wounds incorporated in gel. In an attempt to prolong the contact of the drug with the wound, it was proposed in this study to evaluate wound healing using polymer films and carrier systems such as cyclodextrins. The work was divided in two parts: 1) Polymeric film containing crude extract of *P. pluviosa* (CE): characterization, healing and antimicrobial activity; 2) CE complexed with cyclodextrin (HP β CD): complex characterization and gel healing activity. The films were evaluated for their physical and mechanical properties and complexation of CE with HP β CD was confirmed by spectroscopic tests. The antimicrobial activity was determined with strains of *Staphylococcus aureus*. For the *in vivo* experiments, wounds were made on the back of rats and treated daily 4, 7, 10 and 14 days with the film or with the gel, according with the groups. In the end of each period, were made a skin permeation analysis and histological analysis for reepithelization and cell proliferation and for gel treatment the collagen was also analyzed. The statistical data were obtained by GraphPad Prism using the *t* test and Mann-Whitney. It was demonstrated that the presence of CE in the films increased the capacity of absorb water and decreased his resistance and permeability. The CE of the film permeated the skin, reaching the dermis, being able to influence the reepithelization at 7 and 14 days and stimulate the cell proliferation at 10 and 14 days of treatment, besides showing antimicrobial activity against strains of *S. aureus*. The complexation of CE with HP β CD was confirmed, suggesting its interaction with more nonpolar parts of the CE. In the CE-HP β CD gel treatment, there was permeation, reaching the dermis, but in the histological analysis, no benefits were demonstrated compared to the negative control. Films with CE of *P. pluviosa* can be an alternative for wound healing, protecting and repairing the tissue and giving comfort to the patient.

KEYWORDS: *Poincianella pluviosa*, wound healing, cutaneous wound, polymeric film, Hydroxypropyl- β -cyclodextrin.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Exemplar de <i>Poincianella pluviosa</i> , usada na arborização de cidades.....	25
2	Floração e frutificação de <i>Poincianella pluviosa</i>	25
3	Estruturas químicas das substâncias identificadas a partir das cascas do caule de <i>Poincianella pluviosa</i>	27
4	Estruturas químicas das substâncias identificadas das cascas do caule de <i>Poincianella pluviosa</i>	28
5	Estrutura química de caesalpinioflavona	29
6	Camadas estruturais da pele.....	31
7	Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica.....	36
 CAPÍTULO 1		
8	Coleta das cascas de <i>P. pluviosa</i>	41
9	Preparo do extrato bruto das cascas de <i>P. pluviosa</i>	42
10	Preparo dos filmes poliméricos: Filme base controle negativo (Fbase) e filme com extrato bruto de <i>P. pluviosa</i> (FEB) para tratamento das feridas.	43
11	Divisão dos grupos de animais para tratamento com filme, de acordo com período de tratamento.....	47
12	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: superfície do filme de carboximetilcelulose (A) Fbase e (C) FEB, em aumento de 6000x; corte longitudinal do filme de carboximetilcelulose (B) Fbase e (D) FEB, em aumento de 1600x.....	53
13	Permeabilidade ao vapor d'água de amostras de Filme base e Filme com EB. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e análise estatística realizada por teste <i>t</i> com $^*(P<0,05)$	55
14	Capacidade de absorção da umidade de amostras de Fbase (Filme CMC sem extrato) e FEB (Filme CMC com extrato).....	56
15	Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR com amostras de EB (Extrato), Fbase (Filme CMC) e FEB (Filme CMC+extrato).....	57
16	Fotografia da região dorsal do animal após confecção das feridas.....	59

17	Fotografia da região dorsal do animal após 4 (A), 7 (B), 10 (C) e 14 (D) dias de tratamento com FEB (esquerda) e Fbase (direita).....	60
18	Valores médios da área das feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com filme contendo EB de <i>P. pluviosa</i> (FEB) e filme sem o EB (Fbase) após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.....	61
19	Percentual de contração de feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com filme contendo EB de <i>P. pluviosa</i> (FEB) e filme sem o EB (Fbase) após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.....	61
20	Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da reepitelização de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com FEB por um período de (A) 4 - aumento de 4x e (B) 10 dias - aumento de 10x. Destaque para: (a) crosta com presença de resíduos de filme, (b) tecido de granulação, (c) tecido integro. As setas indicam o início e o final da área reepitelizada.....	62
21	Gráfico representativo da média±desvio padrão da medida do comprimento da língua de reepitelização (em µm), aos 4, 7 e 10 dias de tratamento de feridas, com FEB e Fbase (controle negativo); (n=5). Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(p<0,05).....	63
22	Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da espessura da epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com (A) Fbase e com (B) FEB aos 14 dias. As setas indicam o centro da ferida, com a epiderme completamente reestabelecida. Aumento de 10x.....	64
23	Gráfico representativo da média±desvio padrão da medida da espessura (em µm) da superfície reepitelizada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com FEB e Fbase aos 14 dias; (n=5). Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(p<0,05).....	64
24	Gráfico representativo da média±desvio padrão do número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas por 4, 7, 10 e 14 dias com FEB e Fbase. Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(P<0,05).....	65
25	Espectro de absorção óptica do extrato bruto de <i>P. pluviosa</i> (EB), filme com EB (FEB) e filme base – controle negativo (Fbase), realizado por espectroscopia fotoacústica.....	66
26	Diferença dos espectros de absorção do filme contendo EB (FEB) e filme base – controle negativo (Fbase) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, realizado por espectroscopia fotoacústica.....	67
 CAPÍTULO 2		
27	Estrutura química da hidroxipropil-β-ciclodextrinas (HPβCD).....	73

28	Divisão dos grupos de animais tratados com gel EB-HP β CD e gel base...	77
29	Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: (A) EB de <i>P. pluviosa</i> - em aumento de 1600x; (B) HP β CD - aumento de 1600x; (C) EB-HP β CD - aumento de 200x; D) EB-HP β CD - em aumento de 1600x.....	80
30	(A) Espectroscopia FTIR do complexo EB-HP β CD, mistura física de EB com HP β CD, EB de <i>P. pluviosa</i> (sibipiruna) e EB-HP β CD; (B) Ampliação de 1000 a 1200 cm ⁻¹ , evidenciando o deslocamento e supressão de picos.....	81
31	(A) Espectroscopia FT-Raman do complexo EB-HP β CD, mistura física de EB com HP β CD, EB de <i>P. pluviosa</i> (sibipiruna) e EB-HP β CD; (B) Ampliação de 1000 a 1500 cm ⁻¹ , evidenciando o aparecimento de picos.	82
32	Fotografia da região dorsal do animal após 4 (A), 7 (B), 10 (C) e 14 (D) dias de tratamento com gel EB-HP β CD (esquerda) e gel base (direita).....	84
33	Valores médios da área das feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com gel EB-HP β CD e gel base após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.....	85
34	Percentual de contração de feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com gel EB-HP β CD e gel base após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.....	85
35	Gráfico representativo da média \pm desvio padrão da medida do comprimento da língua de reepitelização (em μ m), aos 4 e 7 dias de tratamento de feridas, com gel EB-HP β CD e gel base.....	87
36	Gráfico representativo da média \pm desvio padrão do número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas por 4, 7, 10 e 14 dias com gel EB-HP β CD e gel base. Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(P<0,05).....	88
37	Gráfico representativo da média \pm desvio padrão da porcentagem de colágeno tipo III após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel EB-HP β CD e gel base. Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(p<0,05)	89
38	Gráfico representativo da média \pm desvio padrão da porcentagem de colágeno tipo I após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel EB-HP β CD e gel base. Análise estatística realizada por teste <i>t</i> com *(p<0,05).....	90
39	Espectro de absorção óptica do complexo EB-HP β CD, gel com EB-HP β CD, gel base e HP β CD, realizado por espectroscopia fotoacústica...	91
40	Diferença dos espectros de absorção do complexo EB-HP β CD, gel com EB-HP β CD, gel base e HP β CD, aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, realizado por espectroscopia fotoacústica.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Espessura e densidade dos filmes base e com EB.....	54
2	Propriedades mecânicas dos filmes base e com EB.....	54
3	Diâmetro (mm) da zona de inibição dos filmes com EB de <i>P. pluviosa</i> (FEB) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> cepa padrão, isolado clínico e multirresistente pelo método de difusão em meio sólido de filme.....	68
4	Concentração Inibitória Mínima (CIM) de filme com EB de <i>P. pluviosa</i> (FEB) sobre <i>Staphylococcus aureus</i> cepa padrão, isolado clínico e multirresistente.....	69
5	Principais picos observados no espectro de FTIR e FT-Raman do extrato bruto de <i>P. pluviosa</i>	83
6	Índice de maturação do colágeno das feridas tratadas com gel EB-HP β CD.....	88
7	Índice de maturação do colágeno das feridas que receberam controle negativo gel base.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HPIA	Atividade de inibição da polimerização do heme
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
NO	Óxido nítrico
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
NOSi	Enzima óxido nítrico-sintase
HGF	Fator de crescimento dos hepatócitos
EGF	Fator de crescimento epidermal
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissomo
PAS	Espectroscopia fotoacústica
EB	Extrato bruto
PT	Polifenóis totais
CMC	Carboximetilcelulose
FEB	Filmes com extrato bruto
Fbase	Filme base, usado como controle negativo
v/v	volume/volume
m/v	massa/volume
p/p	peso/peso
mPa	megapascal
T	Tração
E	Elongação
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
CEUA	Comissão de Ética no uso de Animais
HE	Coloração hematoxilina-eosina
ImaC	Índice de maturação do colágeno

CN	Coagulase negativa
CMH	Caldo Mueller Hinton
AMH	Ágar Mueller Hinton
UV-vis	Ultravioleta visível
rpm	Rotações por minuto
CIM	Concentração inibitória mínima
UFC	Unidade formadora de colônia
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
CD	Ciclodextrinas
α -CD	α - ciclodextrina
β -CD	β - ciclodextrina
γ -CD	γ - ciclodextrina
HP β CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
EB-HP β CD	Extrato bruto complexado com Hidroxipropil- β -ciclodextrina
FT-Raman	Espectroscopia Raman
q.s.p	Quantidade suficiente para

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21	
2.	REVISÃO DE LITERATURA	22	
2.1	ASPECTOS GERAIS	22	
2.1.1	Família Fabaceae	22	
2.1.2	Gênero <i>Caesalpinia</i>	23	
2.1.3	<i>Poincianella pluviosa</i> (DC.) L.P. Queiroz	24	
2.1.4	Compostos fenólicos	30	
2.2	ASPECTOS FARMACOLÓGICOS	31	
2.2.1	Pele	31	
2.2.2	Cicatrização de feridas	32	
2.2.3	Uso de hidrogéis na cicatrização de feridas	34	
2.2.4	Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	35	
2.3	ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA	35	
3.	OBJETIVO	37	
CAPÍTULO 1. Extrato bruto de <i>Poincianella pluviosa</i> incorporado em filme polimérico - caracterização do filme e avaliação das atividades cicatrizante e antiestafilocócica.....			39
1.	INTRODUÇÃO	40	
2.	MATERIAL E MÉTODOS	41	
2.1	PREPARO DO EXTRATO BRUTO	41	
2.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS	42	
2.3	PREPARO DO FILME POLIMÉRICO	43	
2.4	CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO	44	
2.4.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44	
2.4.2	Espessura e densidade	44	
2.4.3	Propriedades mecânicas	44	
2.4.3.1	Teste de tração e alongação	44	
2.4.3.2	Resistência à dobra	45	
2.4.4	Permeabilidade ao vapor d'água	45	

2.4.5	Capacidade de absorção de umidade	46
2.4.6	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR/ATR) (<i>Fourier Transform Infrared</i>)	46
2.5	ANIMAIS	46
2.5.1	Confecção e tratamento das feridas cutâneas	47
2.6	MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS	48
2.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA	48
2.7.1	Análise da reepitelização	49
2.7.2	Número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada	49
2.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
2.9	ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA	49
2.10	ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA	50
2.10.1	Preparo e avaliação da viabilidade do inóculo	50
2.10.2	Difusão em poços	51
2.10.3	Concentração inibitória mínima (CIM)	51
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4	CONCLUSÕES	70

CAPÍTULO 2. Extrato bruto de *Poincianella pluviosa* complexado com ciclodextrina e incorporado em gel – caracterização do complexo e avaliação da atividade cicatrizante..... 71

1.	INTRODUÇÃO	72
2	MATERIAL E MÉTODOS	74
2.1	EXTRATO BRUTO (EB)	74
2.2	INCORPORAÇÃO DO EB EM CICLODEXTRINA	74
2.3	CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO COM CICLODEXTRINA	75
2.3.1	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	75
2.3.2	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR/ATR) (<i>Fourier Transform Infrared</i>)	75
2.3.3	Espectroscopia Raman (FT-Raman) (<i>Fourier Transform Raman Spectroscopy</i>)	75

2.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	76
2.5	PREPARO DO GEL PARA TRATAMENTO DAS FERIDAS	76
2.6	ANIMAIS	76
2.6.1	Confecção e tratamento das feridas cutâneas.....	77
2.7	MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS	78
2.8	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	78
2.8.1	Análise da reepitelização.....	78
2.8.2	Número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada.....	78
2.8.3	Análise das fibras colágenas	78
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
2.10	ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	79
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4	CONCLUSÕES.....	92
	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS.....	103

1. INTRODUÇÃO

A pele recobre a superfície do corpo como uma barreira protetora contra o ambiente externo e micro-organismos, além de regular a temperatura corporal e evitar perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Danos tissulares desencadeiam imediatamente uma série de eventos celulares e moleculares que interagem para reconstituição do tecido lesado. A cicatrização de feridas é um processo dinâmico e complexo que envolve inflamação, proliferação e remodelação do tecido (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O processo de cicatrização pode ser dificultado devido à diminuição da imunidade e condições patológicas do paciente. Além disso, a falta de integridade da barreira cutânea torna-se alvo de bactérias que fazem parte da microbiota natural. Nessas condições, essas bactérias podem ser patogênicas e causar infecções que dificultam a cicatrização de feridas ou causar infecção sistêmica (GELATTI, et al., 2009; ISAAC et al., 2010).

Devido aos custos dos tratamentos destas patologias, associadas a uma cicatrização deficiente, a busca de novos medicamentos aceleradores do processo cicatricial vem tendo sua importância destacada, os quais são voltados principalmente para a formação do novo tecido (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

No mercado de medicamentos, o setor de fitoterápicos apresenta grande importância. Estima-se que a movimentação mundial de fitoterápicos seja de US\$ 20 bilhões por ano. Os produtos fitoterápicos representaram cerca de 2% do total faturado pela indústria farmacêutica em 2015, movimentando R\$ 1,6 bilhão (FEBRAFAR, 2017). No Brasil, o crescimento das vendas de fitoterápicos desperta interesse na indústria farmacêutica, tanto para isolamento de produtos químicos, por apresentarem relevante atividade farmacológica, quanto para utilização das plantas inteiras ou extratos padronizados das mesmas (ZUANAZZI; MAYORGA, 2010).

Apesar do desenvolvimento de produtos sintéticos, muitos fármacos são obtidos de matérias-primas vegetais (BERNARDES et al., 2017). O estudo de produtos naturais como agente cicatrizante vem se intensificando devido às substâncias que podem influenciar em uma ou mais fases da cicatrização. Novas tecnologias, incluindo o uso de extrativos vegetais incorporados a formas farmacêuticas, visam acelerar o processo cicatricial e reduzir suas complicações (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b). O uso de plantas como agentes antimicrobianos também demonstra importância na pesquisa. A atividade antimicrobiana pode ser em função das substâncias presentes como flavonoides, taninos, alcaloides, saponinas e terpenos (SOUZA, et al., 2007).

A estrutura da pele representa uma barreira eficaz na passagem de substâncias. As preparações tópicas, em diferentes formas farmacêuticas, podem produzir efeitos locais ou

sistêmicos (SILVA, 2010). Uma gama de curativos a base de hidrogel está disponível no mercado para o tratamento de pequenas queimaduras e feridas. Apresentam-se de diversas formas, como géis amorfos, gazes impregnadas com gel, filmes ou emplastos (MADAGHIELE et al., 2014).

Embora muitas pesquisas já tenham sido realizadas na área da cicatrização, ainda há muito que se pesquisar para aperfeiçoar e torná-las acessíveis à população. A *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz é uma árvore conhecida popularmente como “sibipiruna” e muito utilizada na arborização de cidades. Já foi descrita para o tratamento de disenteria (DEHARO et al., 2001), atividade antimalárica, *in vitro* e *in vivo* (BAELMANS et al., 2000; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; KAYANO et al., 2011), atividade antimicrobiana (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006), viabilidade e proliferação celular da pele *in vitro* (BUENO et al., 2014), atividade antitumoral *in vitro* (ZANIN et al., 2015), atividade cicatrizante *in vivo* (BUENO et al., 2016), inibição da enzima amilase pancreática *in vitro* e ação hipoglicêmica *in vivo* (KATO et al., 2016a, 2016b).

A partir de resultados demonstrados por Bueno et al. (2016), utilizando extrato bruto de *P. pluviosa* incorporado em gel para cicatrização de feridas cutâneas de ratos, buscou-se o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas contendo extrato dessa planta para o tratamento de feridas, evitando possíveis infecções que podem acometer a pele, procurando aumentar a eficiência terapêutica e proporcionar alívio e conforto para o paciente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, é a terceira maior família entre as Angiospermas. É distribuída mundialmente, com mais de 700 gêneros e cerca 20.000 espécies de árvores, arbustos, videiras e ervas. A maioria das espécies lenhosas são tropicais. As folhas geralmente são pinadas e em algumas espécies são simples ou reduzidas a escamas. A fruta é tipicamente uma leguminosa, ou vagem, que se abre quando seca, liberando as sementes (BRITANNICA ACADEMIC, 2017).

Apresentam grande importância ecológica, por serem dominantes em alguns ecossistemas. Grande parte da importância ecológica das leguminosas pode ser explicada pelo fato de muitas delas apresentarem em suas raízes associações simbióticas com microrganismos fixadores de nitrogênio (FERREIRA et al., 2015).

As espécies da família Fabaceae são muito utilizadas na medicina tradicional e representam a segunda maior família, em número de plantas medicinais (GAO et al., 2010). São também excelentes fontes vegetais de proteína para alimentação humana e animal, além de serem utilizadas como plantas aromatizantes, na adubação verde como rotação de culturas, produção de óleos, de madeira, gomas, corantes e inseticidas (FERREIRA et al., 2015).

A família Fabaceae vem sendo dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoidae e Papilionoidae. A subfamília Caesalpinioideae compreende quatro tribos, a Cercideae, Detarieae, Cassieae e Caesalpineae, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. A tribo Caesalpinieae possui um histórico taxonômico complexo, na qual inclui o gênero *Caesalpinia*, que se encontra organizado em grupos: *Coulteria*, *Erythrostemon*, *Guilandina*, *Libidibia*, *Mezoneiron*, *Poincianella* e *Tara* (QUEIROZ, 2010; TOZZI, 2016).

2.1.2 Gênero *Caesalpinia*

Caesalpinia L. sinonímia de *Poincianella* Britton & Rose, é um gênero de plantas pertencente à subfamília Caesalpinioideae, encontrada em zonas tropicais e subtropicais. O gênero compreende quase 140 espécies e inclui 25 nomes genéricos sob sua sinonímia. O gênero é polifilético e os gêneros foram reintegrados (QUEIROZ, 2010; GAGNON et al., 2013).

A circunscrição de *Caesalpinia* aceita atualmente é restrita e gêneros menores estão sendo desmembrados com base principalmente em resultados de filogenia molecular. O correto posicionamento e a transferência de muitas espécies para os novos gêneros recém-estabelecidos ainda requer estudos adicionais. Por essa razão, e considerando que ainda há grande parte das espécies identificadas sob *Caesalpinia*, são colocados em sinonímia (GAGNON et al., 2013; TOZZI, 2016).

A fim de ajustar a taxonomia das espécies brasileiras anteriormente classificadas em *Caesalpinia*, novas classificações foram propostas. A *Poincianella* Britton & Rose é um gênero neotropical segregado de *Caesalpinia* e possui aproximadamente 35 espécies com distribuição predominantemente na América Central e Caribe (QUEIROZ, 2010; GAGNON et al., 2013).

Embora já seja aceito por alguns autores, algumas espécies do gênero *Poincianella* são mantidas em *Caesalpinia* até que todas as transferências necessárias de nomenclatura tenham sido realizadas (GBIF, 2016).

O gênero vem sendo estudado para diversas atividades biológicas. Estudos revelaram ação antimicrobiana de *Caesalpinia sappan* Linn contra *Staphylococcus aureus* (KIM et al., 2004). Também é utilizada pela população indiana na cicatrização de feridas (CHOPDA; MAHAJAN, 2009).

A *Caesalpinia pulcherrima* Swartz é utilizada para o tratamento de diversas enfermidades. Chew et al. (2011) mostraram a atividade antioxidante do extrato bruto das flores e folhas de *C. pulcherrima*. Essa atividade também foi mostrada *in vitro* por Hsu et al. (2012) a partir de substâncias isoladas de frutos frescos. An e Nayeem (2012) avaliaram o extrato das folhas de *C. pulcherrima* quanto à ação na cicatrização de feridas e observaram que o extrato acelerou o período de reparação tecidual, aumentando a formação de colágeno e melhorando a resistência das feridas cicatrizadas quanto à ruptura.

O estudo fitoquímico das cascas de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. revelou a presença de taninos, podendo auxiliar na cicatrização das úlceras (BACCHI et al., 1995). Oliveira et al. (2010), em avaliação da cicatrização de feridas cutâneas de caprinos, conseguiram resultados significativos com o uso das cascas de *C. ferrea*. Dias et al. (2013) avaliaram uma matriz contendo extrato de *C. ferrea* e comprovaram o efeito anti-inflamatório, que pode auxiliar na cicatrização de feridas.

No sudeste da Ásia, as sementes de *Caesalpinia crista* (L.) são muito utilizadas como anti-helmíntico, antipirético, anti-inflamatório, antimalárico e no tratamento de reumatismo (KALAUNI et al., 2004).

A *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming é utilizada na medicina tradicional da Índia como hipoglicemiante, com ação comprovada como secretagogo de insulina na diabetes *mellitus* tipo 2 (CHAKRABARTI et al., 2005) e como cicatrizante de feridas (CHOPDA; MAHAJAN, 2009). Shukla et al. (2009) mostraram que a planta possui um potencial terapêutico podendo estimular as respostas imunes humoral e celular, com atividade imunomoduladora.

As cascas e raízes de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. & Zarucchi são utilizadas popularmente no tratamento de infecções tópicas e feridas, devido à ação antimicrobiana e antioxidante de substâncias presentes nas cascas e raízes (DICKSON; HOUGHTON; HYLANDS, 2007).

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

A espécie *Poincianella pluviosa* (DC.) L.P. Queiroz possui como sinonímia *Caesalpinia pluviosa* DC. var. *peltophoroides* (Benth.) G. P. Lewis (FLORA DO BRASIL 2020, 2017) e é conhecida popularmente como sibipiruna e falso-pau-Brasil. É uma árvore de médio porte (5-10 m), composta por folhas bipinadas e inflorescência com racemo

terminal (30-140 flores por racemo), com flores de coloração amarelo-douradas, o que lhe confere utilização como planta ornamental, na arborização de cidades, além de possuir potencial madeireiro (BRUN, 2012; TOZZI, 2016) (Figuras 1 e 2).



Figura 1. Exemplar de *Poincianella pluviosa*, usada na arborização de cidades (Foto: Ana Carolina Guidi, 11-2016).



Figura 2. Floração e frutificação de *Poincianella pluviosa* (BRUN, 2012).

No Brasil, pode ser encontrada na região do Pantanal, Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, distribuindo-se no Norte (Pará), Nordeste (Bahia, Paraíba, Pernambuco),

Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná) (FLORA DO BRASIL 2020, 2017).

Bueno (2014) realizou testes de toxicidade aguda e mutagenicidade utilizando extrato bruto das cascas de *P. pluviosa*. Em ambos os testes não foram encontradas alterações macroscópicas ou morte dos animais durante os períodos de avaliação, sendo considerada de baixa toxicidade ou praticamente atóxica.

As plantas desse gênero são ricas em taninos. Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversos problemas estomacais. Na Bolívia, a distribuição da *P. pluviosa* é muito grande e sua casca é altamente valorizada por ser utilizado para tratamento de disenteria (DEHARO et al., 2001). Apesar do uso popular da abundância da espécie, nenhum estudo científico foi demonstrado.

O extrato das cascas mostrou atividade para inibição da polimerização do heme (HPIA) para a detecção de atividade antimalárica, também mostrando atividade *in vitro* em cultura de *Plasmodium falciparum* sensível à cloroquina e resistente à cloroquina (BAELMANS et al., 2000).

Flores, Vila e Almanza (2006) isolaram dois compostos fenólicos a partir das cascas do caule, galato de etila (1) e rhuschalcona VI (2) e ainda relataram a presença de lupeol (3), ácido betulínico (4) e estigmasterol (5), demonstrados na Figura 3. No mesmo trabalho, o extrato diclorometânico e substâncias puras foram testados contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, inibição da polimerização do heme (HPIA) e teste *in vitro* contra *Plasmodium falciparum*, demonstrando boa atividade.

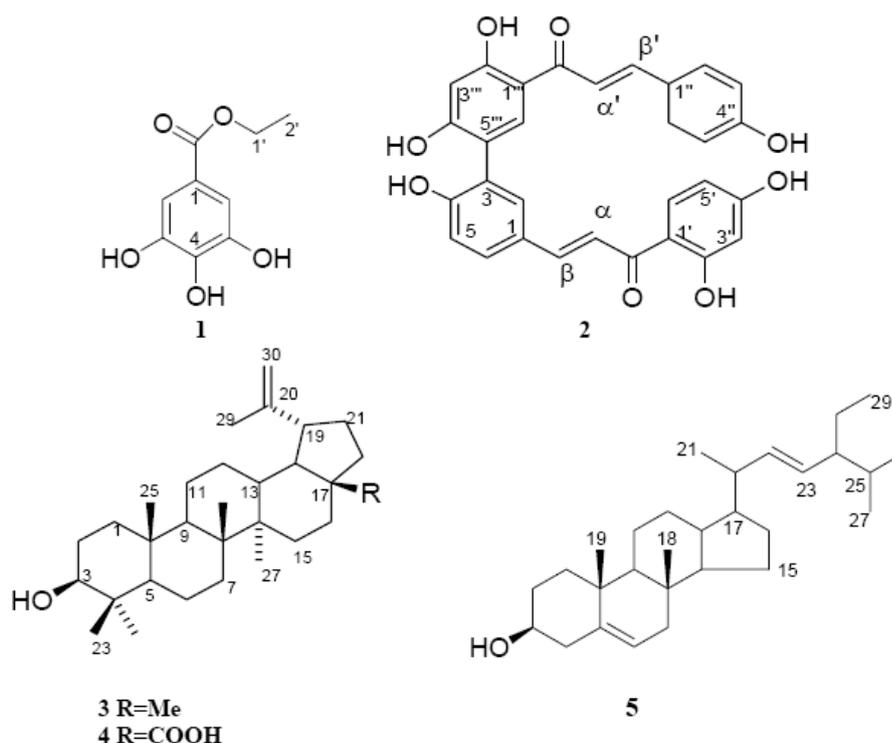


Figura 3. Estruturas químicas das substâncias identificadas a partir das cascas do caule de *Poincianella pluviosa* (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006).

Rodrigo et al. (2010) identificaram esteróis, taninos, flavonoides e saponinas. A atividade antimalárica contra *Plasmodium falciparum* foi demonstrada *in vitro* por Kayano et al. (2011) em concentrações não tóxicas do extrato bruto obtido a partir da casca do caule. Suas frações também apresentaram atividade significativa contra cepas sensíveis e resistentes à cloroquina. Quando combinada com artesunato, potencializou a atividade deste, inibindo significativamente a parasitemia. A atividade antimalárica também foi sustentada *in vivo*, em ratos infectados com *Plasmodium chabaudi*. No mesmo trabalho, análises espectrométricas sugeriram a presença de um novo composto, provavelmente um isômero de quercetina, que pode ser responsável pela atividade descrita.

Bueno et al. (2014) também investigaram as substâncias do extrato das cascas do caule e confirmaram a presença de vários polifenóis e taninos hidrolisáveis, sugerindo a presença de pirogalol (1), ácido gálico (2), éster metílico de ácido gálico (3), ácido elágico (4), corilagina (5), 1,4,6-tri-*O*-galoil-glicose (6), telimagrandina I (7), 1,2,3,6-tetra-*O*-galoil-glicose (8), ácido malotínico (9), telimagrandina II (10), 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil glicose (11), geraniina (12) e ácido malotusínico (13), demonstrados na Figura 4. No mesmo estudo, os autores demonstraram que o extrato da casca atua na viabilidade e proliferação de células da pele, estimulando queratinócitos humanos e fibroblastos dérmicos *in vitro*. Essa atividade foi atribuída a quantidades elevadas de taninos hidrolisáveis presente na planta.

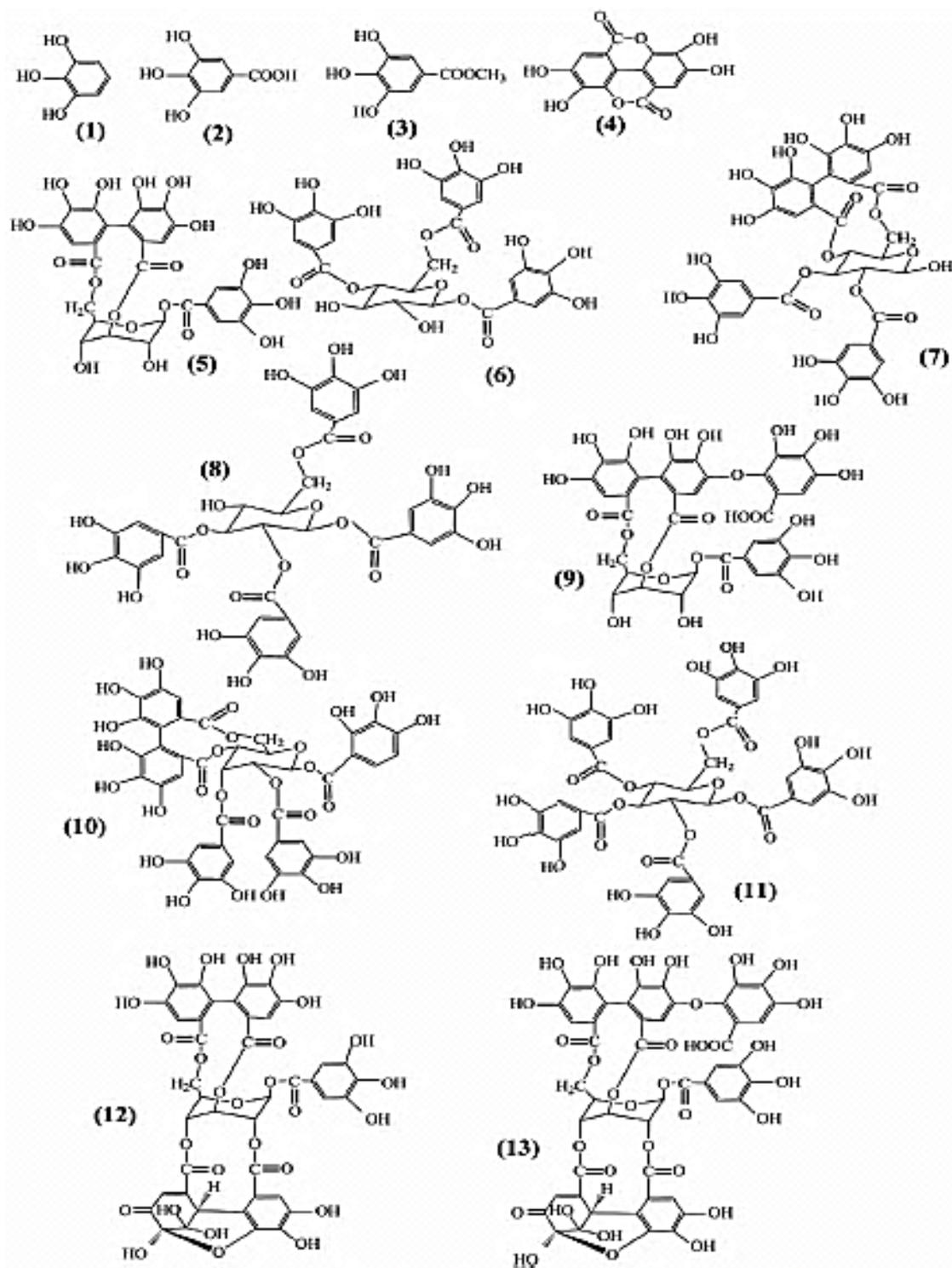


Figura 4. Estruturas químicas das substâncias identificadas nas cascas do caule de *Poecianella pluviosa* (BUENO et al., 2014).

Zanin et al. (2015) investigaram a presença de compostos com atividade antitumoral nas cascas de *Caesalpinia pluviosa* var. *peltrophoroides* e isolaram um novo biflavonoide, denominado caesalpinioflavona (Figura 5). A caesalpinioflavona mostrou atividade antitumoral

in vitro, capaz de reduzir a viabilidade de linhagens de células tumorais do carcinoma de pulmão humano, carcinomas de mama humano e carcinoma hepatocelular de rato.

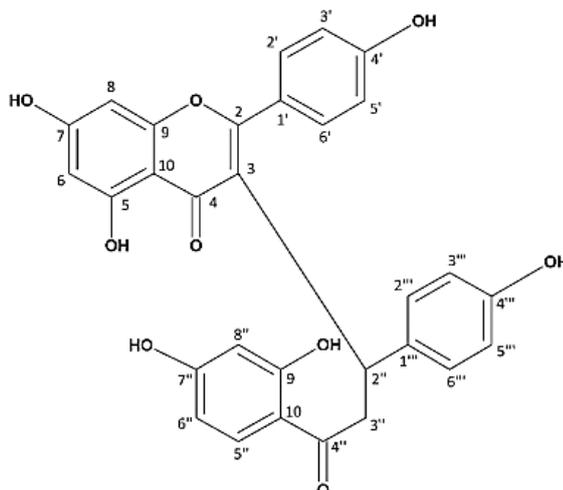


Figura 5. Estrutura química de caesalpinioflavona (ZANIN et al., 2015).

Bueno et al. (2016) avaliaram a atividade cicatrizante do extrato bruto das cascas de *P. pluviosa* e relataram ação sobre o reparo tecidual em feridas cutâneas de ratos normoglicêmicos. O estudo histológico mostrou que o extrato estimulou o processo de reepitelização, aumentando o número de metáfases nos primeiros dias de tratamento e estimulando a maturação das fibras colágenas, permitindo a formação de um tecido epitelial com um aspecto organizado. As proteínas analisadas durante os dias de tratamento foram reguladas, tendo um aumento significativo na produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), superóxido dismutase 2 (SOD-2) e ciclooxygenase 2 (COX-2). O tratamento de feridas cutâneas utilizando o extrato bruto das cascas também foi demonstrado em ratos diabéticos por Bueno (2014). O tratamento 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.

A propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (PERERA et al., 2016). O extrato bruto e frações das cascas de *P. pluviosa* foram investigados quanto ao potencial inibitório sobre a amilase pancreática *in vitro* e ação hipoglicêmica *in vivo*, mostrando que possui poder inibitório sobre a amilase pancreática, diminuindo os níveis glicêmicos pós-prandiais em decorrência da ingestão de amido. A inibição dessas enzimas podem ser uma alternativa terapêutica para redução da diabetes tipo II e obesidade (KATO et al., 2016a, 2016b).

2.1.4 Compostos fenólicos

Os fenóis apresentam grande importância econômica. Eles contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais e são utilizados como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. São ainda empregados industrialmente na fabricação de resinas e explosivos, como matéria-prima farmacêutica, para tratamento de hiperpigmentação da pele ou analgésico, na indústria de tintas e corantes e como antioxidantes em alimentos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

As substâncias fenólicas apresentam grande diversidade estrutural e estão distribuídos no reino vegetal, nos micro-organismos e também fazem parte do metabolismo de animais. Possuem como característica em sua molécula um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, na forma livre ou fazendo parte de ésteres, éteres ou heterosídeos, sendo solúveis em água e em solventes orgânicos polares (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

Devido à grande variedade de combinações que acontece na natureza, os compostos resultantes são chamados de polifenóis. São classificados em diversas categorias e destacam-se os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis, como os mais comuns de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007).

Os taninos são solúveis em água, com massa molecular entre 500 e 3000 *u*, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e vegetais. A palavra tanino é originalmente derivada do termo “tanante”, pois o material vegetal produz couro a partir de peles. Apresentam a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatinas e proteínas (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; MELLO; SANTOS, 2017).

Segundo a sua estrutura química, os taninos são divididos em dois grupos, os hidrolisáveis e os condensados e estão presentes em quase todas as partes das plantas. Quanto à distribuição no reino vegetal, os taninos condensados ocorrem amplamente em plantas lenhosas, tanto em gimnospermas quanto em angiospermas e os hidrolisáveis estão quase restritos às dicotiledôneas herbáceas e lenhosas (MELLO; SANTOS, 2017).

As aplicações de drogas com taninos estão relacionadas, principalmente, com suas propriedades adstringentes. Devido à capacidade de ligação às proteínas, também tem a capacidade de inibir enzimas, exercendo efeito sobre o trato gastrointestinal quando utilizado por via interna (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; PERERA et al., 2016).

2.2 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

2.2.1 Pele

A pele recobre a superfície do corpo, sendo considerada um dos maiores órgãos, alcançando cerca de 16% do peso corporal. Apresenta-se como uma barreira protetora contra o ambiente externo e micro-organismos, além de regular a temperatura corporal e evitar perda de água. A pele é constituída por uma porção epitelial com origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (Figura 6). A principal célula componente da epiderme é o queratinócito e da derme, o fibroblasto. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não pertence à pele, mas atua como suporte para ela (ISAAC et al., 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

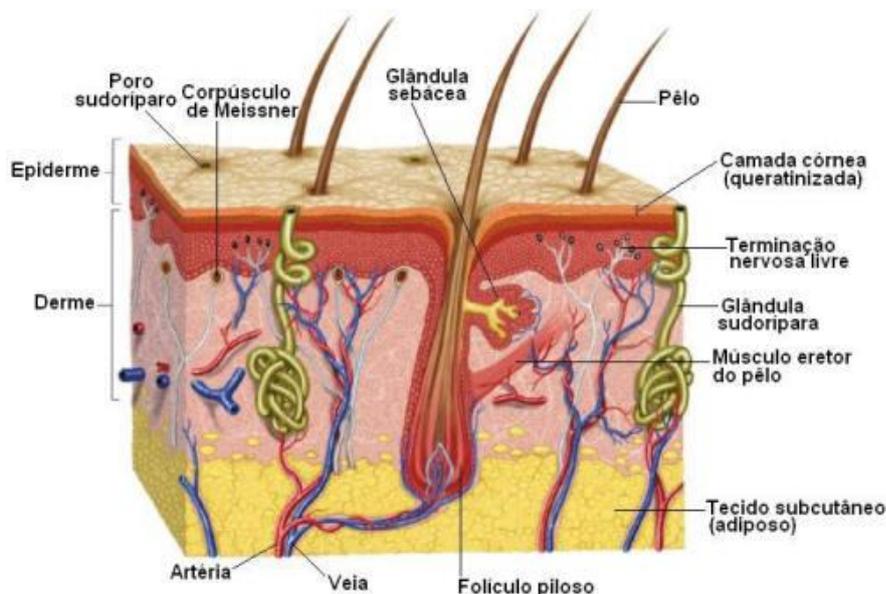


Figura 6. Camadas estruturais da pele (Fonte: www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp acessado em 17/06/2017).

Além dos queratinócitos, a epiderme apresenta melanócitos (formadores de pigmentos que protegem da luz ultravioleta), células de Langerhans (apresentadoras de antígenos) e células de Merkel (receptoras para o tato) (YOUNG et al., 2007).

A epiderme é dividida em estratos ou camadas: córnea, granulosa, espinhosa e basal. O estrato córneo é o mais externo, formada por células cornificadas (queratinizadas), anucleadas e mortas. Sua espessura pode variar de acordo com a região em que se encontra. A camada granulosa encontra-se abaixo da camada córnea e é formada por três ou quatro camadas de células achatadas (OVALLE; NAHIRNEY, 2008). A camada espinhosa possui várias camadas de células, com formato poligonal e se tornam mais

achatadas em direção à superfície. Nela há presença de desmossomos que permitem a união entre as células e uma resistência da pele ao atrito. A presença dos desmossomos permite que as células basais se liguem entre si e entre os queratinócitos (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O estrato basal ou germinativo é o mais profundo, possuindo uma única camada de células que se acomoda sobre uma membrana basal. Nesse estrato há presença de células-tronco com intensa atividade mitótica dos queratinócitos, que levam a renovação celular da epiderme (OVALLE; NAHIRNEY, 2008; ROSS; PAWLINA, 2008).

A derme é o tecido conjuntivo em que a epiderme está apoiada e une a pele ao tecido subcutâneo ou hipoderme. Pode apresentar espessura variável, de acordo com sua localização. Este tecido é composto por fibras elásticas e colágenas, responsáveis pela elasticidade e tonicidade da pele, além de vasos sanguíneos e terminações nervosas. A derme é constituída de duas camadas: papilar (superficial) e reticular (profunda) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A camada papilar é estreita, constituída de tecido conjuntivo frouxo, apresenta fibras colágenas delicadas, entrelaçadas com fibras delgadas do sistema elástico. A camada reticular encontra-se abaixo da papilar e possui fibras colágenas e elásticas maiores que na papilar. Contém vasos sanguíneos, nervos e anexos cutâneos (YOUNG et al., 2007). É composta de vasos linfáticos e sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O colágeno é a proteína mais abundante nos seres humanos e o principal componente da pele, constituindo 80% do peso seco da derme e a base de sua estrutura e resistência. Na matriz dérmica há essencialmente dois tipos de colágeno: tipo I e tipo III, correspondendo respectivamente a cerca de 80-85% e 15-20% do total desta proteína. O tipo I apresenta diâmetro total de 1 a 20 μm e está localizado principalmente na derme reticular, a mais profunda da pele. O colágeno tipo III apresenta diâmetro de 0,5 a 2 μm e está presente, em sua maioria, na derme papilar, localizada mais superficialmente (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

2.2.2 Cicatrização de feridas

A capacidade de auto-regeneração é uma característica de todos os organismos vivos. Quaisquer danos tissulares desencadeiam imediatamente sinais que caracterizam o processo inflamatório, resultando em rubor, tumor, calor e dor (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O início do processo cicatricial é imediato após a lesão e consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para reconstituição do tecido lesado (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). A cicatrização de feridas é um

processo que envolve três etapas que se sobrepõem de forma contínua: inflamatória, proliferativa e remodelagem do tecido (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A divisão do processo de reparo é baseada nos aspectos macroscópicos e histológicos dominantes em cada etapa (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase inflamatória depende principalmente da atividade plaquetária, da cascata de coagulação, de mediadores químicos e de células inflamatórias (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Os eventos iniciais estão voltados ao tamponamento dos vasos sanguíneos, pois em alguns casos, ocorre ruptura com conseqüente extravasamento de seus constituintes. Ocorre 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. O tecido lesado e o coágulo passam a estimular a liberação de fatores de crescimento e citocinas pré-inflamatórias, entre eles o fator de crescimento de derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010). Os monócitos e neutrófilos removem partículas estranhas, bactérias e tecido morto do leito da ferida, sendo que a ação antimicrobiana dos polimorfonucleares é pela produção de radicais livres de oxigênio e, a dos macrófagos, é pela síntese aumentada de óxido nítrico (NO) (ISAAC et al., 2010).

O segundo estágio do processo de cicatrização é a fase de proliferação, que se caracteriza por fibroplasia, angiogênese e reepitelização. A fibroplasia ocorre por volta do quarto dia, dando início à formação do tecido de granulação, que é um tecido edematoso, caracterizado por muitos espaços vazios, formado por vasos imaturos que podem se romper e sangrar facilmente. O ressecamento da crosta presente na ferida auxilia na sua contração, diminuindo seu tamanho e arrastando o tecido para o centro da ferida. Ocorrem migração e proliferação de fibroblastos, concomitante à síntese de novos componentes da matriz extracelular. Na derme, os fibroblastos são importantes na secreção de proteoglicanos, fibronectina, elastina, laminina e colágeno (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

Na angiogênese ocorre a formação de novos vasos a partir dos adjacentes à ferida. Os principais agentes angiogênicos envolvidos são o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o TGF- β . A ação do VEGF é dependente da presença de NO, que estimula sua síntese e induz uma supra-regulação da enzima óxido nítrico-sintase (NOSi). Os vasos recém-formados são característicos do tecido de granulação, e tem por finalidade nutrir e oxigenar os tecidos em crescimento (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

A reepitelização tem por função reestruturar as funções da epiderme que foram perdidas com a ocorrência da lesão, ativando queratinócitos que proliferam, migram e

diferenciam, restabelecendo a proteção do tecido subjacente. Possuem quantidades crescentes de queratina e, na pele íntegra, entram em processo de apoptose nas duas últimas camadas. Entre os fatores que facilitam a reepitelização estão o FGF, o fator de crescimento dos hepatócitos (HGF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), estímulos a receptores ativados por proliferador de peroxissomo (PPARs) e um campo elétrico na ferida, que direciona a migração de queratinócitos através de moléculas de sinalização celular (ISAAC et al., 2010).

Por volta do décimo dia a ferida encontra-se totalmente preenchida pelo tecido de granulação, neovascularizada e na presença de fibras colágenas, iniciando a terceira e última fase do processo cicatricial, o remodelamento. Nesta fase, o tecido continua a ser enrijecido por mais fibras colágenas obtendo aparência de massa fibrótica característica de cicatriz. Há mudança do tipo de colágeno que a compõe e de sua disposição. O colágeno tipo III, inicialmente mais abundante que o tipo I, vai sendo degradado, enquanto o colágeno I vai tendo sua produção aumentada pelos fibroblastos. Enquanto PDGF estimula maior degradação de colágeno I e síntese de colágeno III, TGF- β induz maior secreção do primeiro. A quantidade de fibras colágenas secretadas durante o período de cicatrização determina a resistência à tração da ferida (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; ISAAC et al., 2010).

2.2.3 Uso de hidrogéis na cicatrização de feridas

Os hidrogéis podem ser definidos como estruturas poliméricas tridimensionais, altamente hidrofílicas, cuja principal propriedade é a de absorverem grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (ALMEIDA, 2010). Podem apresentar formas físicas diferentes, incluindo formas moldadas sólidas (lentes de contato macias), matrizes de pó prensadas (pílulas ou cápsulas para ingestão oral), micropartículas, revestimentos (em implantes ou cateteres, em pílulas ou cápsulas, ou revestimentos na parede capilar interna na eletroforese capilar), membranas (reservatório em sistemas transdérmicos de libertação de fármaco ou para géis de eletroforese), sólidos encapsulados (bombas osmóticas) e líquidos (formam géis com mudança de temperatura) (HOFFMAN, 2012).

Além de conforto, os hidrogéis poliméricos proporcionam umidade ideal para cicatrização enquanto protegem a ferida. Atualmente estão disponíveis vários curativos especializados para o tratamento de queimaduras e outros tipos de feridas, capazes de absorver e reter o exsudado da ferida. O ambiente úmido facilita o desbridamento do tecido necrótico e reepitelização espontânea da pele, proporcionando simultaneamente uma cobertura temporária e imediata das feridas e uma barreira mecânica às infecções. Vários curativos podem também incluir antibióticos específicos ou diferentes agentes

antibacterianos na sua formulação, de modo a proteger ainda mais o leito da ferida de contaminações microbianas indesejadas (MADAGHIELE et al., 2014).

2.2.4 Infecção por *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é o patógeno humano mais importante do gênero *Staphylococcus*, composto de 33 espécies, 17 das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (RATTI; SOUSA, 2009). A distribuição de *S. aureus* é muito ampla, devido a sua capacidade de resistir à dessecação e ao frio, podendo permanecer viável por longos períodos em partículas de poeira. Pode ser encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o próprio homem seu principal reservatório, além de estar presente em diversas partes do corpo, como fossas nasais, garganta, intestinos e pele (SANTOS et al., 2007). As taxas de colonização estafilocócica são altas entre os pacientes com diabetes tipo I, usuários de drogas intravenosas, pacientes submetidos a hemodiálise, pacientes cirúrgicos e pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. As pessoas colonizadas com cepas de *S. aureus* estão em maior risco de se infectarem com essas cepas (LOWY, 1998).

A maioria das infecções humanas são causadas por patógenos oportunistas, como o *S. aureus*, que são tipicamente encontrados na microbiota normal do paciente. Esses organismos não produzem doenças em seus locais normais, mas estabelecem doenças quando introduzidos em sítios desprotegidos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). A bacteremia pode causar infecções em sítios anatômicos distantes, como endocardites, osteomielites, piodartrites e formação de abscessos metastáticos, em particular em pele, tecidos subcutâneos, pulmões, fígado, rins e cérebro (SANTOS et al., 2007)

2.3 ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Para a eficácia do tratamento tópico, é necessário que a droga presente na formulação, consiga permear a pele e chegar às camadas internas. Essa eficácia pode ser estabelecida por meio da determinação da taxa de penetração cutânea, do perfil de distribuição e do tempo de permanência do medicamento na região da ferida. O estudo da permeação cutânea serve para otimizar as formulações farmacêuticas dermatológicas, permitindo uma maior permeação do fármaco na pele e conseqüentemente uma melhor ação terapêutica (BARRY, 2001; SEHN, 2006).

A Espectroscopia Fotoacústica (*Photoacoustic spectroscopy* - PAS) já demonstrou ser uma valiosa ferramenta para medir a permeação e distribuição de medicamentos ou cosméticos através da pele *in vitro* e *ex vivo*. Em estudos de cicatrização de feridas, o

método é eficiente para medir o comportamento da taxa de penetração de uma substância presente na formulação durante diferentes estágios de cicatrização (SEHN, 2006; MELO et al., 2010; PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

PAS é uma medida direta da absorção, ou seja, as medidas não sofrem interferência da luz transmitida, refletida ou espalhada (PEDROCHI, 2004). A partir dela, pode-se realizar separação espectral dos diversos constituintes das formulações através da absorção óptica, obtida no espectro total da formulação. Por ser uma técnica muito sensível, apresenta muitas vantagens, destacando-se a possibilidade de se determinar o perfil de penetração das substâncias ao longo da espessura da amostra, detecção de baixas concentrações dos componentes absorvedores na amostra e a não destruição da amostra, permitindo que a amostra testada seja reutilizada para outros ensaios (SEHN, 2006).

O efeito fotoacústico é gerado ao incidir-se uma luz monocromática, obtida a partir de uma lâmpada de Xenon que passa por um monocromador. O feixe de luz é modulado por uma hélice mecânica. A amostra fica acondicionada em uma célula fotoacústica fechada que contenha um gás. A incidência da luz e sua absorção fazem com que haja uma excitação dos níveis internos de energia da amostra. Por um processo de desexcitação não radiativo, a radiação absorvida causa um aquecimento periódico local na amostra, que gera uma onda de pressão no gás em contato com ela. Um microfone acoplado à câmara detecta a variação da pressão no gás que resulta no sinal fotoacústico (Figura 7) (PEDROCHI, 2004; PINTO et al., 2015).

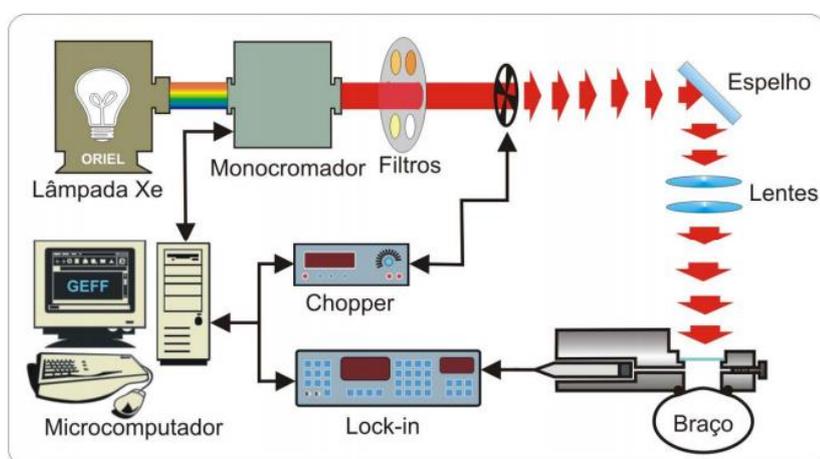


Figura 7. Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica (PEDROCHI, 2004).

3. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade cicatrizante do extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado a dois diferentes hidrogéis: filme polimérico e gel contendo extrato complexado com ciclodextrina.

Dessa forma, a dissertação foi organizada em dois capítulos, de acordo com o tratamento utilizado:

Capítulo 1: Extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado em filme polimérico – caracterização do filme e avaliação das atividades cicatrizante e antiestafilocócica.

Objetivos específicos

- Preparar extrato bruto das cascas de *P. pluviosa* (EB)
- Determinar teor de polifenóis totais do EB
- Preparar o filme polimérico contendo o EB
- Realizar testes de caracterização do filme
- Confeccionar e tratar feridas cutâneas no dorso de ratos com o filme
- Efetuar análise macroscópica através da área das feridas
- Avaliar a permeação cutânea do EB por meio da espectroscopia fotoacústica
- Realizar análise histológica de fragmentos de pele contendo as feridas, para medida do epitélio neoformado e contagem da proliferação de queratinócitos na camada basal e supra-basal.
- Verificar a atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*.

Capítulo 2: Extrato bruto de *Poincianella pluviosa* complexado com ciclodextrina e incorporado em gel – caracterização do complexo e avaliação da atividade cicatrizante.

Objetivos específicos

- Complexar EB de *P. pluviosa* em ciclodextrina
- Realizar a caracterização do complexo
- Determinar teor de polifenóis totais do EB e do complexo
- Preparar géis para tratamento tópico
- Confeccionar e tratar feridas cutâneas no dorso de ratos com os géis
- Efetuar análise macroscópica por meio da área das feridas

- Avaliar a permeação cutânea em espectroscopia fotoacústica
- Realizar análise histológica de fragmentos de pele contendo as feridas, para medida do epitélio neoformado, contagem da proliferação de queratinócitos na camada basal e supra-basal e análise das fibras colágenas.

CAPÍTULO 1

Extrato bruto de *Poincianella pluviosa* incorporado em filme polimérico – caracterização do filme e avaliação das atividades cicatrizante e antiestafilocócica

1. INTRODUÇÃO

Apesar do desenvolvimento de produtos sintéticos, muitos fármacos são obtidos de matérias-primas vegetais (BERNARDES et al., 2017). A *Poincianella pluviosa* é muito abundante nas cidades e seus extratos e substâncias isoladas já demonstraram atividades farmacológicas. É utilizada popularmente na Bolívia para tratamento de disenteria (DEHARO et al., 2001), já foi descrita com ação na inibição da atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo* (BAELMANS et al., 2000; FLORES; VILA; ALMANZA, 2006; KAYANO et al., 2011), o extrato e substâncias isoladas demonstraram atividade contra a bactéria *Staphylococcus aureus* (FLORES; VILA; ALMANZA, 2006), mostrou boa resposta na viabilidade e proliferação de células da pele (BUENO et al., 2014), apresentou atividade antitumoral *in vitro*, capaz de reduzir a viabilidade das linhas de células tumorais do carcinoma de pulmão humano, carcinomas de mama humano e carcinoma hepatocelular de ratos (ZANIN et al., 2015), cicatrizante de feridas cutâneas (BUENO et al., 2016), inibição enzimática sobre a amilase pancreática *in vitro* e ação hipoglicêmica *in vivo* (KATO et al., 2016a; 2016b).

Muitas espécies do mesmo gênero também já foram descritas, revelando diversas atividades, entre elas: ação antimicrobiana (KIM et al., 2004), cicatrizante de feridas (CHOPDA; MAHAJAN, 2009; AN; NAYEEM, 2012; OLIVEIRA et al., 2010), anti-inflamatório (DIAS et al., 2013), antioxidante (CHEW et al., 2011; HSU et al., 2012), anti-helmíntico, antipirético, antimalárico e tratamento de reumatismo (KALAUNI et al., 2004) e hipoglicemiante (CHAKRABARTI et al., 2005).

As drogas vegetais podem ser veiculadas em formulações destinadas a tratamentos tópicos e auxiliar na cicatrização de feridas. Curativos comercializados pelas indústrias vem sendo utilizados para este fim, porém o acesso a estes pode ser restrito, tornando-se necessário investigar outras formas de terapia na busca de alternativas voltadas para o uso popular e de custo acessível (HADDAD et al., 2000; COELHO et al., 2002). Uma dessas alternativas é o uso de hidrogéis na forma de placas ou filmes poliméricos.

Devido a sua estrutura, os hidrogéis apresentam propriedades necessárias para se ajustar a feridas localizadas em diferentes locais do corpo (MADAGHIELE et al., 2014). Os filmes são formados a partir de uma base polimérica e podem intensificar o contato do fármaco com a barreira epitelial (CARVALHO; CHORILLI; GREMIÃO, 2014). Há uma tendência crescente no desenvolvimento de formulações que englobam múltiplos materiais, buscando abordar simultaneamente diferentes aspectos de cicatrização de feridas, controle de infecção e flexibilidade de curativo (MADAGHIELE et al., 2014).

As infecções podem retardar o processo de cicatrização ou impedir a cura. O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria frequentemente encontrada na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. Caso as barreiras naturais estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, as bactérias podem alcançar outras regiões e se alojar no tecido e provocar uma lesão local a partir desses sítios (SANTOS et al., 2007).

Assim, o uso de filmes poliméricos contendo extrato bruto de *P. pluviosa* pode ser uma boa alternativa no tratamento de feridas por aumentar a adesão do paciente ao tratamento, prolongar o tempo de contato com a ferida e proteger contra infecções oportunistas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PREPARO DO EXTRATO BRUTO

Foram utilizadas cascas do caule de *Poincianella pluviosa*, coletadas de uma árvore recém-cortada pela Secretaria Municipal dos Serviços Públicos (SEMUSP) na zona urbana da cidade de Maringá, Paraná, Brasil (Figura 8).



Figura 8. Coleta das cascas de *P. pluviosa* (Foto: Ana Carolina Guidi, 01-2015).

O EB foi preparado seguindo metodologia descrita por Bueno et al. (2012). Cascas fragmentadas, secas e moídas em moinho de martelos (Tigre ASN5) foram extraídas em Ultra-turrax (UTC 115 KT) por 15 min, empregando etanol 50% (v/v) como líquido extrator,

na proporção de 10% (m/v). Em seguida, o extrato foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizado (EB) (Figura 9).

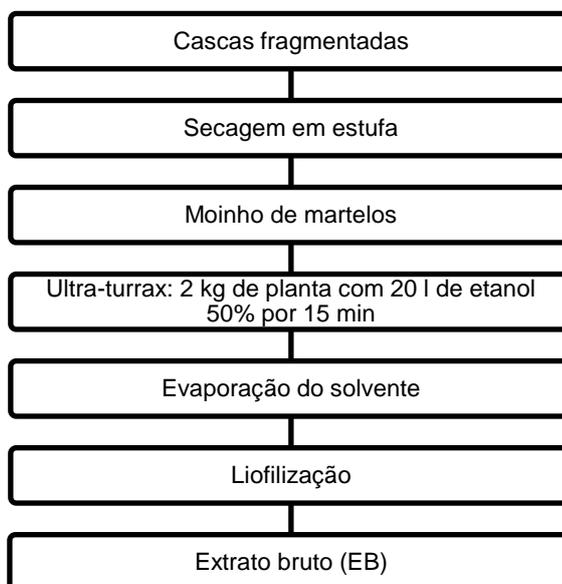


Figura 9. Preparo do extrato bruto das cascas de *P. pluviosa*.

2.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

O teor de polifenóis totais (PT) foi determinado para o EB de *P. pluviosa*, como critério no controle de qualidade, a fim de padronizar a concentração adotada por Bueno et al. (2016). A determinação de PT foi realizada conforme descrito e validado por Bueno et al. (2012).

Para a determinação de PT, 5 mg do EB foram diluídos com água em um balão volumétrico de 25 mL. Foram transferidos 2 mL dessa solução para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 mL de água, sendo o balão completado com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução foi medida a absorvância a 760 nm, utilizando a água como branco.

Para o preparo da solução mãe do padrão de pirogalol foram utilizados 2,5 mg desse padrão em um balão volumétrico de 100 mL, diluído em água destilada. Dois mililitros dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 mL de água, completando o volume com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução foi medida a absorvância a 760 nm, utilizando a água como branco.

O teor de polifenóis é calculado por:

$$PT (\%) = \frac{Conc \text{ padrão} \times Abs \text{ amostra} \times Teor \text{ do padrão}}{Conc. \text{ amostra} \times Abs \text{ padrão}}$$

Onde: Conc. = massa / fator de diluição

Os resultados obtidos na determinação do teor de polifenóis totais foram expressos como média \pm desvio padrão, utilizando o programa Excel®, versão 2010 (Microsoft Office; Microsoft®).

2.3 PREPARO DO FILME POLIMÉRICO

Os filmes poliméricos foram preparados utilizando solução de carboximetilcelulose (CMC) 2% (v/v) em água e incorporado 1% de EB de *P. pluviosa*, de acordo com o esquema demonstrado na Figura 10. A concentração de EB incorporada no filme foi de 1%, a mesma concentração adotada por Bueno et al. (2016) no preparo do gel para tratamento de feridas.

Esta mistura foi dispersa sobre um molde de silicone com espessura fixa, para obtenção de um filme polimérico de espessura fina. Após, foi levado à estufa (36 °C) por 24 h para secagem.

Para o tratamento das feridas, os filmes com EB de *P. pluviosa* (FEB) foram cortados em 1,5 cm², para que cobrisse a área das feridas. Como controle negativo, foi utilizado o filme de CMC sem extrato (Fbase), preparado da mesma maneira.

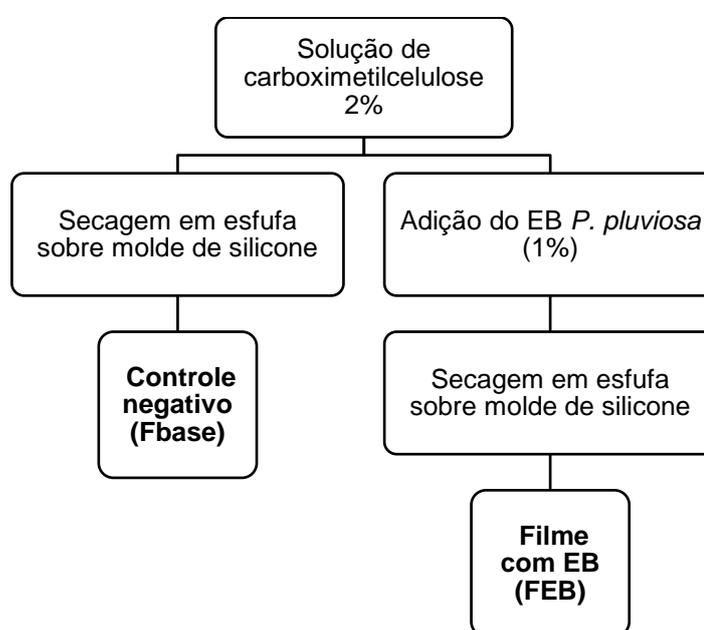


Figura 10. Etapas do preparo dos filmes poliméricos: filme base controle negativo (Fbase) e filme com extrato bruto de *P. pluviosa* (FEB) para tratamento das feridas.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DO FILME POLIMÉRICO

2.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob responsabilidade do Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

A morfologia de superfície e corte transversal dos filmes FEB e Fbase foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura utilizando o equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 10^6 torr. As amostras foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram geradas em modo topográfico (elétrons secundários) a 9 kV.

2.4.2 Espessura e densidade

A espessura dos filmes foi determinada usando micrometro (KingTools) com resolução de 0,01 mm. Para cada filme, amostras de $2,25 \text{ cm}^2$ foram medidas em cinco pontos diferentes (NESSEEM, EID, EL-HOUSENY, 2011).

Para determinar a densidade, as amostras de filmes foram pesadas após secagem em estufa a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 h. A densidade dos filmes foi calculada utilizando a equação:

$$\rho = \frac{m}{A \times h}$$

onde ρ é a densidade (g/mL), m é a massa (g), A é a área da superfície (mm^2) e h é a espessura (mm) da amostra do filme. Quatro replicatas foram realizadas para cada filme.

2.4.3 Propriedades mecânicas

2.4.3.1 Teste de tração e alongação

Os experimentos foram realizados na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) com colaboração do Prof. Dr. Claudio Roberto Novello.

Os testes foram realizado usando um texturômetro Stable Micro Systems SMD, modelo TA.XT Plus, equipado com probe específica para o ensaio. Os testes foram desenvolvidos com separação inicial das garras de 40 mm, velocidade inicial de 3 mm/s e

velocidade de teste 0,3 mm/s. Cinco amostras de cada filme, com dimensões de 6x2 cm, foram tracionadas até a ruptura e as respectivas curvas de tensão (mPa) por deformação (%) foram registradas.

Os dados de tensão-deformação foram coletados por um microcomputador e utilizados para determinar a resistência à tração (T) e porcentagem de alongação (E), de acordo com as equações:

$$T = \frac{F}{A}$$

$$E = \frac{\Delta L \times 100}{L \times A}$$

onde: F é a força no ponto de ruptura (N), A é a área transversal (mm²), L é o comprimento inicial da amostra e ΔL é o comprimento que o patch aumentou (mm) (TOLEDO et al., 2016).

2.4.3.2 Resistência à dobra

A resistência à dobra dos filmes foi avaliada dobrando manual e repetidamente o filme no mesmo local, até a quebra ou até 300 vezes, sendo este último considerado satisfatório para uma boa propriedade de resistência (DESHMANE et al., 2009). O número de vezes que um filme pode ser dobrado sem quebrar corresponde ao valor de resistência à dobra. Este teste foi realizado em três amostras de cada filme.

2.4.4 Permeabilidade ao vapor d'água

Amostras de cada filme, com dimensões apropriadas, foram colocadas em uma célula de permeação contendo 10 mL de água purificada. As células foram então pesadas e colocadas em dessecador com 0% de umidade relativa e 25 °C. As células foram pesadas novamente após 1, 2, 3 e 4 dias. A redução no peso das células indica a quantidade de água que permeou através do filme. A permeabilidade ao vapor d'água foi calculada utilizando a equação (KANIG; GOODMAN, 1962):

$$WVP = \frac{m}{t \times A}$$

onde: m é o peso da água permeada (g), t é o tempo (dias) e A é a área do filme (mm²). As análises foram realizadas em triplicata.

2.4.5 Capacidade de absorção de umidade

Amostras dos filmes (225 mm²) foram secas em estufa a 36 °C por 20 h. Cada amostra seca foi colocada em uma peneira e pesada. Este sistema foi imediatamente submerso em água purificada. O excesso de água foi removido e o sistema foi pesado novamente. Este processo foi repetido em intervalos pré-determinados (0,5; 1; 2; 3; 4; 5 e 10 min para Fbase e 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 20; 30; 45 e 60 min para FEB). A equação abaixo foi usada para calcular a capacidade de absorção de umidade em cada intervalo de tempo (AMNUAIKIT et al., 2005; NESSEEM, EID, EL-HOUSENY, 2011):

$$MUC(\%) = [(W_s - W_d) \cdot 100] / W_d$$

onde: W_s é o peso do filme intumescido e W_d é o peso do filme seco. As análises foram realizadas no mínimo em triplicata.

2.4.6 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR/ATR) (*Fourier Transform Infrared*)

Os espectros FT-IR do EB, FEB e Fbase foram obtidos utilizando um espectrômetro de transformação de Fourier infravermelho (modelo Vertex 70v, Bruker, Alemanha). A gama espectral foi de 400-4000 cm⁻¹ com 128 varreduras e uma resolução de 2 cm⁻¹ (MANGOLIM et al., 2014).

2.5 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as regras de cuidado e uso de animais de laboratório descritos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi aprovado pela comissão com o parecer nº 9861231115 (Anexos 1 e 2).

Foram utilizados 32 ratos Wistar com 60 dias (220-280 g), machos, provenientes do Biotério Central da UEM, os quais permaneceram em gaiolas individuais no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal – LEA do Bloco T22 (Departamento de Farmácia –

Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil), em condições padronizadas (temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de $50\pm 10\%$), ciclo dia-noite de 12 h e ração e água *ad libitum*.

Foram divididos em 4 grupos (n=8) de acordo com o período de tratamento: 4, 7, 10 e 14 dias. De cada grupo, 3 animais foram utilizados para análise de permeação cutânea (PAS) e 5 para análise histológica (Figura 11).

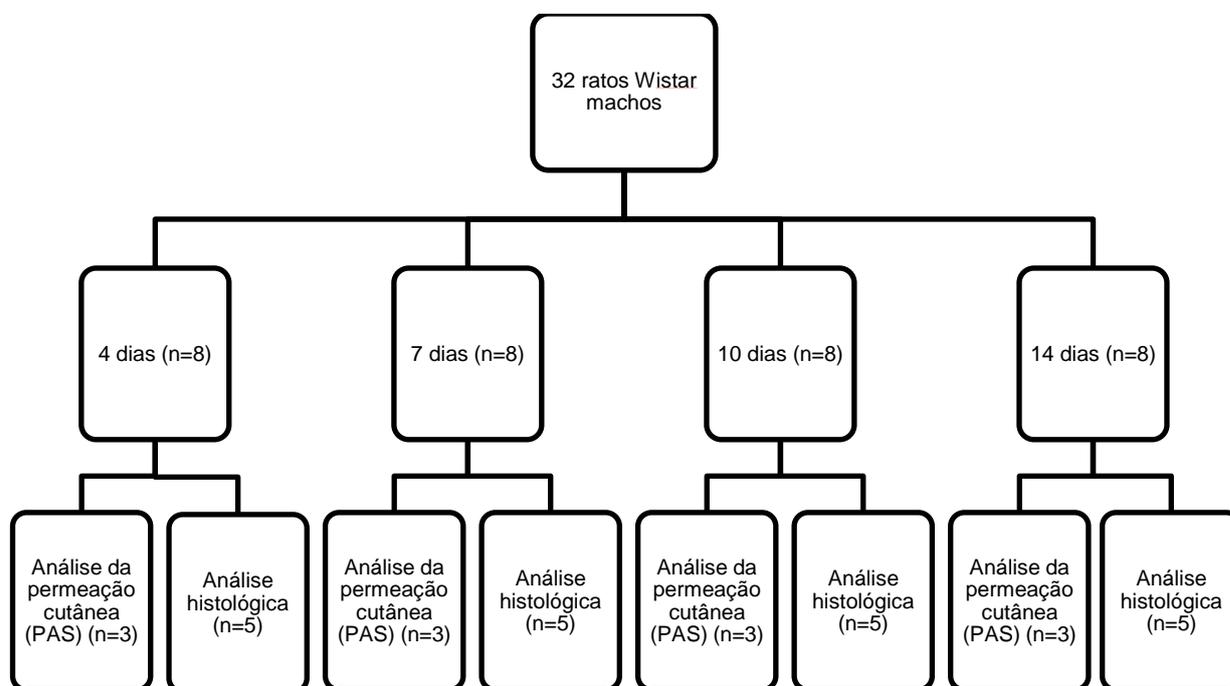


Figura 11. Divisão dos grupos de animais para tratamento com filme, de acordo com período de tratamento.

2.5.1 Confeção e tratamento das feridas cutâneas

Para a confecção de feridas excisionais, os animais foram anestesiados com Tiopental (40 mg/kg) associado com Lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg), via intraperitoneal. Após epilação manual e assepsia do local, um molde foi utilizado para marcar a área de confecção das feridas (1 cm²). Com auxílio de tesoura, foram feitas duas feridas com remoção de fragmento de pele (epiderme e derme) do dorso dos animais.

A ferida esquerda recebeu tratamento com FEB e a ferida direita recebeu o Fbase. A aplicação dos filmes foi realizada diariamente, umedecendo previamente a ferida com solução salina (0,9%) e pressionando levemente para adesão. O tratamento foi iniciado a partir do dia posterior a confecção das feridas (BUENO et al., 2016).

Após 4, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose de Tiopental (120 mg/kg, via intraperitoneal) associado com lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg). As feridas cutâneas foram avaliadas quanto ao seu aspecto macroscópico e removidas para análise de permeação por PAS e análise histológica (com margem de pele sadia em torno da ferida).

2.6 MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS

A medida das feridas foi obtida após sua confecção e ao final de cada período de tratamento por decalque em folha plástica transparente. Esses registros foram digitalizados juntamente com escala milimétrica e ampliados. A área das feridas foi calculada utilizando o programa Image Pro-Plus® (v. 4.5). Os resultados foram expressos em cm². O grau de contração das feridas foi expresso em percentual, determinado a partir da equação:

$$\% \text{ de contração} = 100 \cdot \frac{(W_o - W_i)}{W_o}$$

onde: W_o = área inicial da ferida e W_i = área da ferida no dia da coleta (4, 7, 10 e 14 dias) (OLIVEIRA et al., 2010).

2.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os animais receberam por via endovenosa 0,5 mg/kg de Sulfato de Vincristina (Oncovin Lilly®), duas horas antes da eutanásia, para bloquear a proliferação celular (BESSION, 2014).

Fragmentos de pele contendo as feridas foram removidos e fixados em solução de Bouin (ácido pícrico:ácido fórmico:ácido acético; 75:25:5; v/v) por 24 h. Foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo (Leica – Biosystems® RM 2245, Nussloch, Alemanha), com 6 µm de espessura, em cortes semisseriados a partir do centro da ferida. Os cortes foram dispostos em duas lâminas, com cinco cortes cada. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para análise da reepitelização e número de metáfases bloqueadas presentes na camada basal e supra-basal da epiderme neoformada. Foram analisados três cortes de cada lâmina (BUENO et al., 2016).

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon® Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera Nikon DS-FI1C cooled digital® (Nikon, Tóquio, Japão), com imagens transmitidas através do sistema D-DA simple analyzer, ao monitor colorido LCD G205HV®, congeladas e digitalizadas por meio de computador Intel Pentium

Processor® E 5700 LGA775. A análise das imagens foi realizada no programa Image Pro-plus® versão 4.5.

2.7.1 Análise da reepitelização

Nas imagens referentes aos animais que ainda não completaram a reepitelização, o comprimento das duas margens (línguas de reepitelização) da epiderme neoformada foram medidas e os valores obtidos foram somados. Nas imagens referentes às feridas que já se encontravam reepitelizadas, foi realizada a medida da espessura em três pontos distintos no centro do epitélio neoformado. As análises foram realizadas utilizando aumento de 10X (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

2.7.2 Número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada

A proliferação de queratinócitos foi determinada pela contagem de células epiteliais bloqueadas na metáfase na camada basal e supra basal da língua de reepitelização. Para padronização das medidas, foi considerado nos cortes um comprimento total da língua de reepitelização de 10000 μm . O resultado foi expresso em número de metáfases/mm. O aumento utilizado para a contagem das metáfases foi de 40X (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises macroscópicas (área das feridas e percentual de contração) e histológicas do tratamento com FEB e Fbase foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism® 5 (Copyright GraphPad Software, Inc.). Os dados foram submetidos à verificação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas foram determinadas através do teste *t* pareado para resultados paramétricos e Mann-Whitney, para resultados não paramétricos, sendo considerado $p < 0,05$ como critério de significância. (BESSION, 2014; BUENO et al., 2016).

2.9 ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

O experimento foi realizado no Laboratório de Fotoacústica do Departamento de Física, sob responsabilidade e orientação do Prof. Dr. Mauro Luciano Baesso. O arranjo

experimental para as medidas de espectroscopia fotoacústica em amostras *ex vivo* foram descritos por Rocha et al. (2007).

Ao final de cada período de tratamento, amostras das feridas foram removidas e encaminhadas imediatamente ao laboratório de fotoacústica para análise da permeação cutânea. No dia da análise, tratamento das feridas foi feito 30 min antes da coleta, tempo necessário para a droga permear a pele.

Os espectros fotoacústicos foram medidos usando uma frequência de modulação de 22 Hz e digitalizados entre 200 e 800 nm. A absorção óptica foi medida como uma função do comprimento de onda de radiação. As amostras de pele foram analisadas na superfície dermal (parte interna da ferida).

O EB, o FEB e o Fbase foram avaliados previamente para verificar a região espectral de absorção. Os espectros fotoacústicos das feridas tratadas com FEB foram subtraídos dos espectros dos controles negativos, resultando um espectro que corresponde à permeação do EB.

2.10 ATIVIDADE ANTIESTAFILOCÓCICA

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob responsabilidade do Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

A atividade antiestafilocócica foi testada contra os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *S. aureus* N315 (multirresistente) e *S. aureus* CN (isolado clínico). Os meios de cultura utilizados foram caldo e ágar Mueller Hinton (CMH e AMH) preparados de acordo com as instruções do fabricante (Becton, Dickinson and Company).

Para o preparo de amostra de FEB, fragmentos de 8 mm de diâmetro foram esterilizados em luz UV por 5 min e transferidos para microtubos cônicos contendo 150 µL de água destilada esterilizada. Os tubos foram agitados em vórtex (1200 rpm) por 2 min ou até a total homogeneização. O Fbase foi utilizado como controle negativo nos ensaios e uma solução estoque de Gentamicina 1 mg/mL foi utilizada como controle positivo.

2.10.1 Preparo e avaliação da viabilidade do inóculo

A partir de culturas estoques, as bactérias foram cultivadas em CMH e incubadas a 37 °C por 24 h. O inóculo foi obtido a partir de subcultura em AMH em fase exponencial de crescimento e ajustadas para uma concentração celular de 10^8 UFC/mL, em tampão fosfato-salino, utilizando escala de 0,5 de McFarland. No final de cada experimento, foi feito o plaqueamento da suspensão de inóculo para confirmação da viabilidade celular.

2.10.2 Difusão em poços

Segundo a técnica de difusão em poços preconizada por HARRIS et al. (1989), poços de aproximadamente 8 mm foram perfurados em placas de Petri contendo AMH inoculados com 1% de inóculo para cada microrganismo teste. Aos poços foram adicionados 150 µL da solução do FEB. As placas foram incubadas por 18 h a 37 °C. Após a incubação, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em milímetros (mm) com auxílio de um paquímetro. A concentração final da solução de Gentamicina usada em cada réplica foi de 0,02 mg/mL.

2.10.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) do filme com EB, para cada cepa foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo, conforme metodologia preconizada pelo CLSI (2011) a um inóculo final de 5×10^4 (UFC)/mL. Foram realizadas diluições 2X seriadas em meio de crescimento CMH em placas de poliestireno de 96 poços (5000 – 9,7 µg/mL). Em seguida, o inóculo foi adicionado a cada poço. As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A CIM foi definida como a menor concentração que resultou na inibição do crescimento bacteriano. O experimento foi realizado em triplicata e repetido três vezes.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os metabólitos secundários das plantas possuem grande importância na natureza e diversas atividades já foram atribuídas aos polifenóis. O teor de polifenóis totais (PT) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, se baseia na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (coloração amarela) pelas hidroxilas fenólicas produzindo um complexo de coloração azul que é absorvido no UV. A coloração formada é controlada pelo número de hidroxilas presentes no composto ou de grupos com potencial oxidativo (BUENO et al., 2012).

O teor de PT encontrado no EB de *P. pluviosa* foi de $26,62 \pm 0,07$ %. Esse achado aproxima-se com valor encontrado e padronizado por Bueno et al. (2016) que foi de 22,7%. Apesar dos extratos terem sido obtidos das cascas de árvores da mesma espécie, o teor de metabólitos durante o desenvolvimento pode sofrer alterações, dependendo da origem e da época da coleta (KREIS; MUNKERT; PÁDUA, 2016). A incorporação de extrato de *P. pluviosa* em filme polimérico não foi encontrada na literatura, constituindo uma nova alternativa para tratamentos tópicos.

Bueno et al. (2016) utilizaram gel com extrato bruto das cascas de *P. pluviosa* e o resultado favorável para a cicatrização de feridas foi atribuído a grande quantidade de polifenóis totais e taninos presentes na planta. A partir desses resultados, buscou-se o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica em filme, para facilitar a aplicação, adesão e conforto no tratamento.

A procura por produtos naturais que podem estimular a reparação tecidual visa o desenvolvimento de formulações não tóxicas para o tratamento de feridas. Extratos e substâncias isoladas de *P. pluviosa* já demonstraram boa atividade em testes antibacterianos contra as bactérias *S. aureus* (FLORES, VILA, ALMANZA; 2006) e também na cicatrização de feridas cutâneas em ratos normoglicêmicos (BUENO et al., 2016).

A ação dos taninos na cura de feridas, queimaduras e inflamações ocorre por meio da ligação dos taninos ao tecido lesado, formação uma camada protetora sobre o local lesionado. Esta camada isola a ferida do ambiente para reduzir a permeabilidade e a exsudação da ferida, promovendo a reparação tecidual, contração da ferida e aumento da formação de vasos capilares e fibroblastos (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005; HERNANDES et al., 2010; RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

Além do trabalho de Bueno et al. (2016), outros trabalhos envolvendo a cicatrização de feridas já relataram que essa atividade pode ser devido ao alto teor de taninos presentes. Bueno et al. (2014) já havia relatado essa relação em estudo *in vitro* com queratinócitos humanos e fibroblastos dérmicos, com extrato e fração hidroalcoólica a partir da casca do caule de *P. pluviosa* e a atividade estimulante foi atribuída à grande quantidade de taninos hidrolisáveis.

Extratos da casca do caule de espécies de *Stryphnodendron* apresentam diversas propriedades farmacológicas e podem estar correlacionadas com seu alto teor de taninos. O extrato bruto da casca de *S. polyphyllum* influenciou na proliferação celular do processo de cicatrização de feridas cutâneas de ratos e sugeriram que esta atividade possa existir devido à presença de taninos (LOPES et al., 2005). Para cicatrização de feridas, a aplicação tópica da pomada contendo *S. adstringens* atuou sobre os queratinócitos, estimulando uma resposta proliferativa destas células ao longo da margem da reepitelização (HERNANDES et al., 2010).

No preparo da formulação, o hidrogel na forma de filme apresentou homogeneidade e flexibilidade que permitiu a fácil remoção dos moldes de silicone após a secagem. Para as análises, as amostras de filmes foram cortadas nas dimensões necessárias, indicando que os mesmos não mostraram fragilidade. O FEB apresentou coloração acastanhada e opaca, enquanto Fbase, sem coloração e levemente opacos.

Devido ao filme polimérico utilizado não apresentar uma superfície adesiva, procurou-se uma formulação com boa aderência à pele do rato quando umedecida. Desta

maneira foi utilizada a carboximetilcelulose (CMC), um éter de celulose que forma excelentes filmes devido à sua estrutura polimérica e cadeias de alto peso molecular (GHANBARZADEH; ALMASI; ENTEZAMI, 2010).

Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura mostraram que os filmes (Fbase e FEB) apresentaram uma superfície uniforme e sem falhas (Figura 12). Algumas ranhuras foram observadas no corte longitudinal do Fbase, aparentemente reduzida com a incorporação do EB.

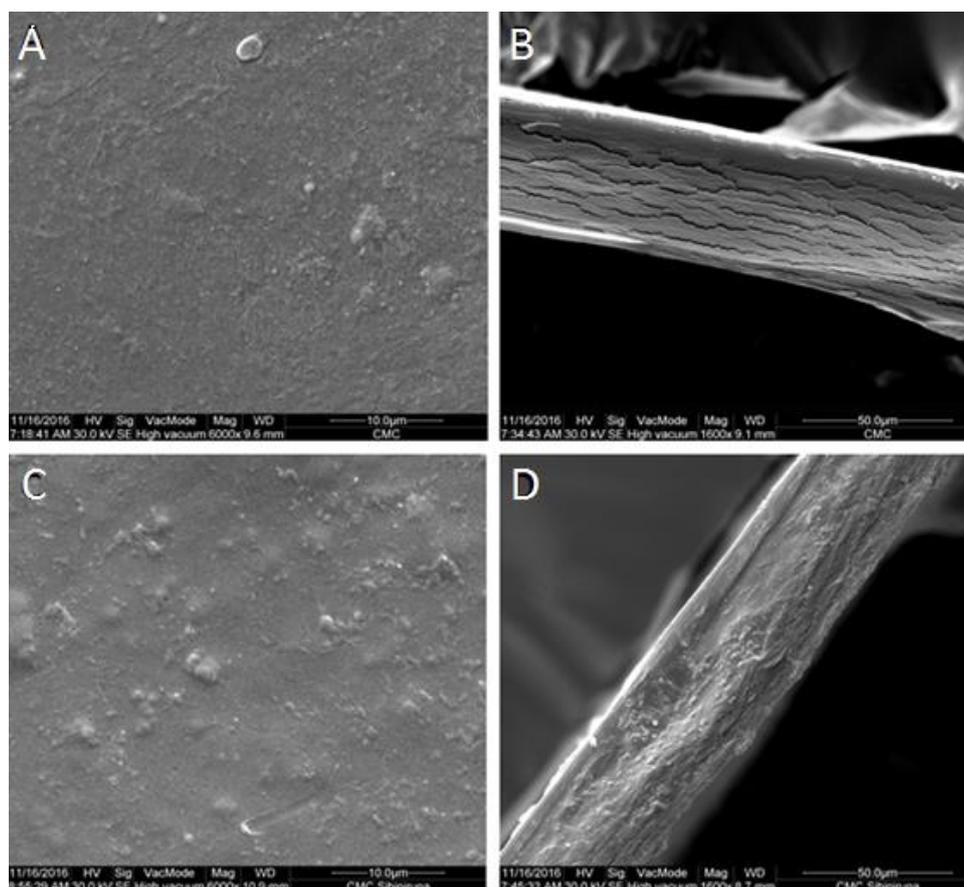


Figura 12. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: superfície do filme de carboximetilcelulose (A) Fbase e (C) FEB, em aumento de 6000x; corte longitudinal do filme de carboximetilcelulose (B) Fbase e (D) FEB, em aumento de 1600x.

O hidrogel na forma de filme possui algumas características que um produto deve oferecer no tratamento de feridas, como a proteção de áreas periféricas, mantém a umidade no leito da ferida, baixo custo, facilidade de aplicação e adaptabilidade (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b).

Os dados referentes à espessura e densidade dos filmes estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que a adição do EB resultou no aumento da espessura dos filmes, mas diminuiu a densidade, quando comparado com o Fbase. A diminuição da densidade do

filme com EB pode estar relacionada à diminuição da força de ligação entre a cadeia polimérica. Com a adição de compostos, há um impedimento de interações, que tende à descontinuidade estrutural da cadeia polimérica (SAYANJALI; GHANBARZADEH; GHIASSIFAR, 2011; MARTUCCI et al., 2015). Essas características também são refletidas nas propriedades mecânicas dos filmes.

Tabela 1. Espessura e densidade dos filmes base e com EB.

Formulação	Espessura (mm)* (10^{-3} cm)	Densidade (g/mL)* (10^{-3} g/mL)
Filme base	2,9 ± 0,5	1,342 ± 0,127
Filme com EB	7,6 ± 1,1	0,966 ± 0,054

*Média ± desvio padrão

As propriedades mecânicas dos filmes estão apresentadas na Tabela 2. A investigação das propriedades mecânicas é útil para avaliar as propriedades básicas formadoras de filme (TOLEDO et al., 2015). Para avaliar as propriedades mecânicas dos filmes foram realizados teste de resistência à tração, percentual de alongação e resistência à dobra.

Tabela 2. Propriedades mecânicas dos filmes base e com EB

Formulação	Tração (mPa)*	Elongação (%)*	Resistência a dobra (vezes)
Filme base	22,26 ± 4,63	105,19 ± 1,40	>300
Filme com EB	11,79 ± 3,43	101,42 ± 0,64	225,50 ± 10,50*

*Média ± desvio padrão

mPa: megapascal

A resistência à tração é uma medida da resistência do filme enquanto o percentual de alongação é uma medida da capacidade de resistência da película antes da quebra (SAYANJALI; GHANBARZADEH; GHIASSIFAR, 2011). De acordo com os resultados, a adição do EB alterou as propriedades do filme, deixando-o menos extensível e menos resistente. O filme base mostrou maior resistência à dobra que o filme contendo o extrato, evidenciando uma perda na plasticidade com a adição do extrato.

Esses resultados já eram esperados, haja vista que em outros trabalhos envolvendo filmes, a incorporação de aditivos diferentes dos agentes de reticulação provocaram

diminuição da resistência do filme. Essa diminuição pode ser atribuída à redução na ligação da estrutura polimérica (CAGRI; USTUNOL; RYSER, 2001; SAYANJALI; GHANBARZADEH; GHIASSIFAR, 2011).

A perda da resistência em filmes também foi observada por outros autores. Yuan et al. (2015) incorporaram carvacrol sozinho e em combinação com extrato cascas de romã em películas de quitosana, mostrando uma diminuição significativa na resistência a tração e alongação. A alteração nas propriedades mecânicas pode ser devido ao desenvolvimento de uma estrutura com menos mobilidade e, portanto, menor flexibilidade e resistência à fratura após a adição de agentes hidrofóbicos à composição da película. Martucci et al. (2015) observaram diminuição significativa da resistência à tensão e alongação em filmes de gelatina após a adição de óleos essenciais à formulação quando comparado ao controle.

Quanto à permeabilidade ao vapor d'água, durante os quatro dias avaliados, o FEB se mostrou menos permeável quando comparado ao Fbase (Figura 13) o que pode estar relacionado ao bloqueio dos poros da matriz de polímero com a adição de componentes na formulação (SAYANJALI; GHANBARZADEH; GHIASSIFAR, 2011).

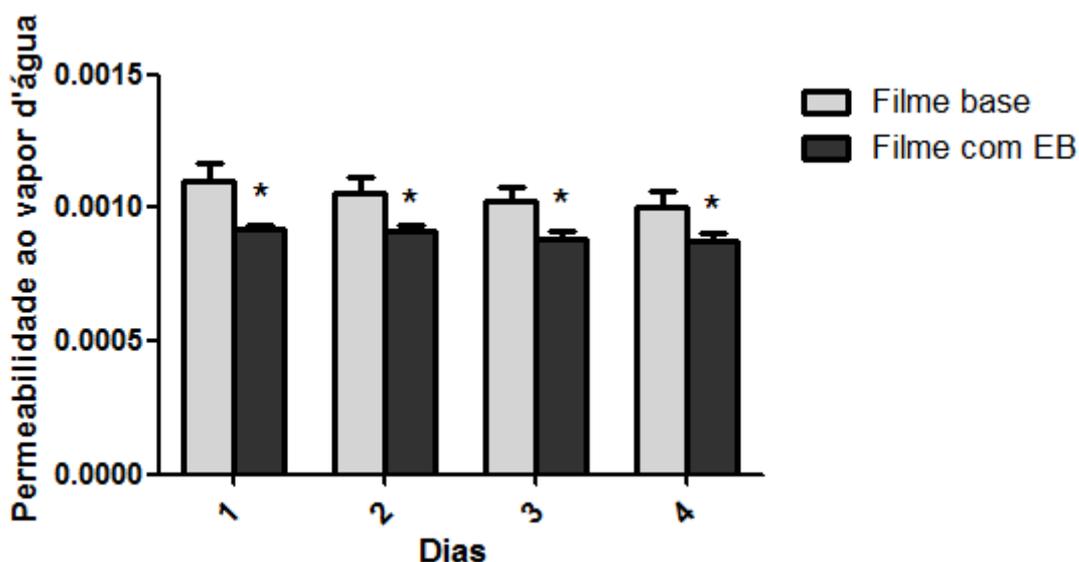


Figura 13. Permeabilidade ao vapor d'água de amostras de Filme base e Filme com EB. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão e análise estatística realizada por teste *t* com *($P < 0,05$).

De acordo com Yuan et al. (2015), quando se deseja melhorar as propriedades de barreira à água de filmes, compostos hidrofóbicos, tais como lipídios e óleos essenciais são incorporados. A diminuição da permeabilidade ao vapor d'água pode ocorrer devido à modificação da porção hidrofóbica da película.

A determinação da capacidade de absorção de água de um polímero é muito importante para sua caracterização como hidrogel, devendo apresentar uma capacidade de

absorção de água de pelo menos 10%. Esta característica é influenciada por diversos fatores, tais como a hidrofiliicidade ou hidrofobicidade dos diferentes compostos constituintes do polímero, de grupos reativos dos mesmos, do pH do meio onde é inserido cada polímero ou da força iônica do mesmo (ALMEIDA, 2010). A Figura 14 mostra a capacidade de absorção de umidade dos filmes ao longo de um período de 60 min.

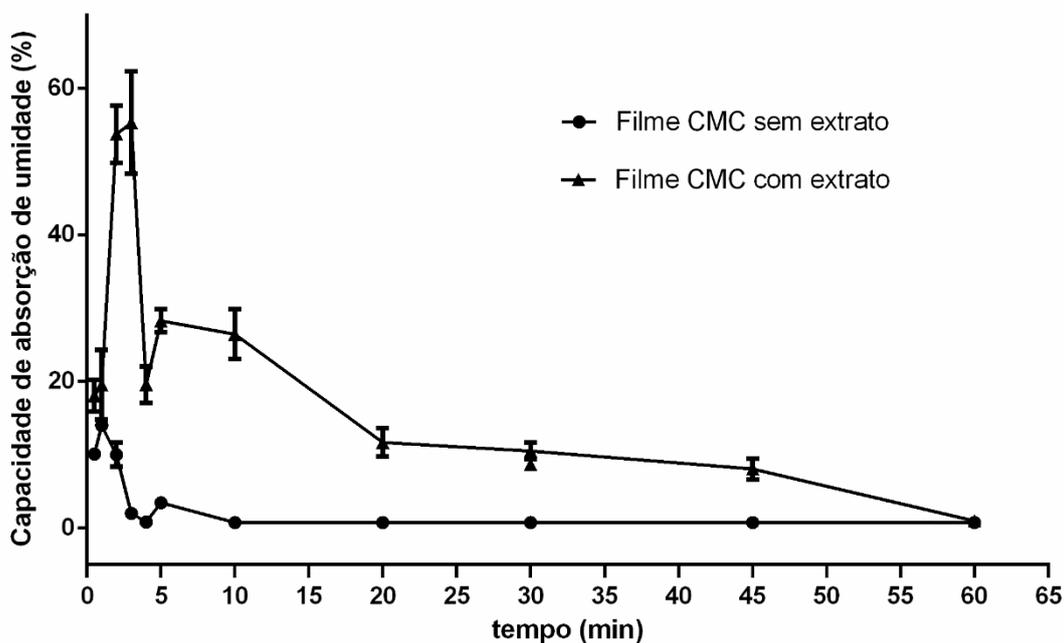


Figura 14. Capacidade de absorção da umidade de amostras de Fbase (Filme CMC sem extrato) e FEB (Filme CMC com extrato).

O FEB apresentou uma maior capacidade de absorver água quando comparado ao Fbase. Essa capacidade foi acentuadamente maior nos primeiros minutos do experimento, e se manteve maior até o final da análise. O maior índice de absorção foi observado no FEB nos primeiros 5 min do teste. Após esse período, teve uma queda na absorção, mantendo um índice mais baixo até o final do teste. O Fbase, embora com índice mais baixo, também exibiu absorção nos primeiros minutos, dissolvendo-se completamente após 10 min de teste.

A carboximetilcelulose (CMC) tem um elevado grau de hidrofiliicidade. O EB, sendo também hidrofílico, pode ter contribuído para aumentar a hidrofiliicidade e, conseqüentemente, a capacidade de absorção de água do FEB. Segundo Toledo et al. (2015) na presença de água, ocorre um rápido relaxamento da cadeia polimérica, que pode ser favorecido pela presença do EB na formulação.

A Espectroscopia de Infravermelho com Transformadas de Fourier (FTIR) é uma das técnicas espectroscópicas mais utilizadas na identificação dos diferentes grupos

constituintes de um dado material. Os espectros de FTIR combinados (Figura 15) apresentaram uma banda forte e larga na região de 3000 a 3600 cm^{-1} em comum para o EB, o filme polimérico de CMC e filme com EB. Estas bandas são características de estiramento axial de ligações O-H com ligação de hidrogênio intermolecular provenientes de associações poliméricas existentes nas amostras. Já em 2859 e 2930 cm^{-1} ocorrem as bandas relacionadas a deformação axial C-H, mais evidente para a CMC.

As bandas intensas na região de 1600 cm^{-1} são características para grupo carbonila, mais especificamente a deformação axial do grupo carbóxi (COOH) presente nas amostras que contém CMC. Bandas em 1326 e 1263 cm^{-1} correspondem á deformação axial C-O e, as demais bandas situadas entre 1200 -400 cm^{-1} tem origem nas vibrações C-H presentes em todas as amostras.

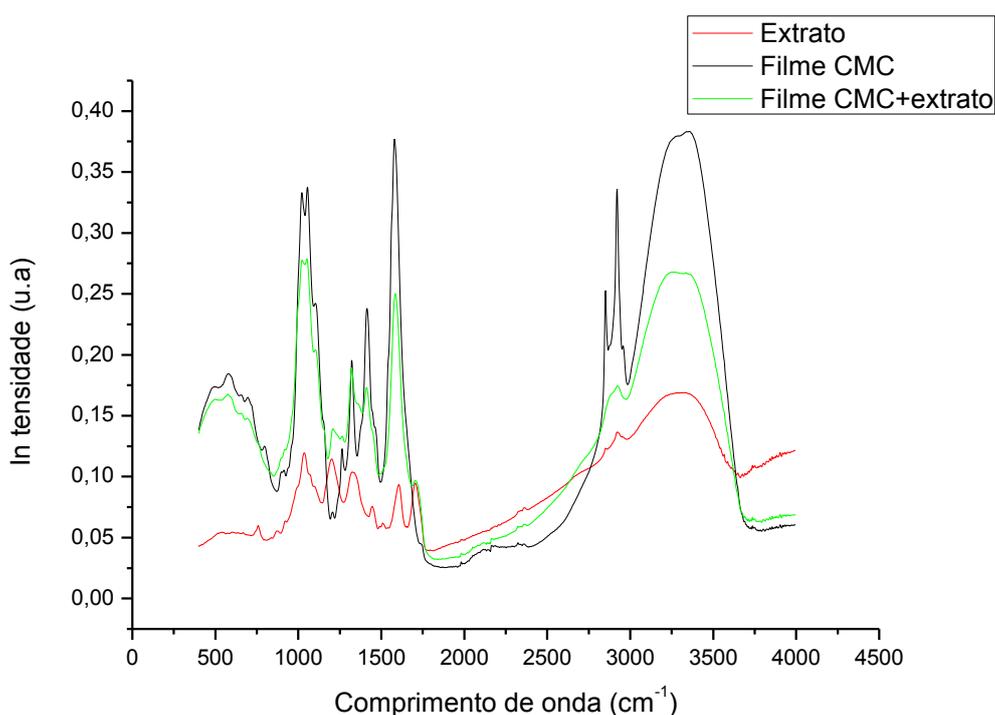


Figura 15. Espectrofotometria no infravermelho por metodologia FTIR com amostras de EB (Extrato), Fbase (Filme CMC) e FEB (Filme CMC+extrato).

Comparando-se os espectros de EB, filme de CMC e filme de CMC com EB, nota-se grande similaridade. O espectro do filme com EB (Filme CMC+extrato, Figura 15) sugere ser a somatória das principais bandas encontradas nos espectros individuais de EB e CMC. Isto indica a interação das substâncias presentes no EB com as moléculas da matriz polimérica, o que também pode ser observado nos dados resultantes das propriedades mecânicas dos filmes.

A técnica FTIR se baseia na propriedade dos materiais, principalmente de suas ligações químicas possuírem frequências de vibração e de alongação específicas, às quais correspondem a níveis energéticos específicos da molécula. Deste modo, quando a radiação incide sobre o material e o atravessa, a molécula absorve-a. No entanto, como cada grupo funcional apresenta valores diferentes e característicos para vibração, alongação e rotação, a leitura do espectro, e as suas bandas, permite a verificação dos tipos de grupos que constituem cada composto (MORRAN et al., 2012).

Testes preliminares utilizando diferentes filmes sobre a pele e ferida foram realizados em animais para que se conseguisse uma boa adesão. Foi observado que filmes mais espessos ou que apresentavam uma superfície adesiva não permitiam a respiração da pele, resultando na deposição de tecido morto na região da ferida, abaixo do filme, com coloração esbranquiçada/amarelada na lesão. Após 24 h da aplicação destes filmes, os mesmos foram removidos para aplicação de um novo filme. Este teste não mostrou resultado satisfatório, pois acabava removendo a crosta ou parte do epitélio neoformado, lesionando a pele e prejudicando o fechamento da ferida.

Filmes mais finos e flexíveis, sem a superfície adesiva permitiram adesão na pele íntegra e ferida quando umedecido, sem deposição de tecido morto sobre ele. Foram aplicados diariamente, sem a necessidade de retirar o filme colocado no dia anterior. Notou-se que o filme se manteve aderido por 24 h, principalmente nos primeiros dias de tratamento. Com o passar dos dias, com o fechamento da ferida, há uma dificuldade em umedecer a pele para aplicar o filme e, conseqüentemente, uma piora na aderência. Isso sugere o uso do filme para feridas extensas e abertas, como úlceras de pressão e queimaduras extensas, pela facilidade de aplicação e adesão nesses locais, sem a necessidade de manuseio, o que pode proporcionar conforto ao paciente.

Portanto, o filme polimérico é uma alternativa por apresentar maior praticidade no uso em feridas, se comparada a géis e pomadas, por serem de difícil retirada pelo paciente, quando em contato com roupas ou superfícies (LOPES, 2013).

Para a avaliação da cicatrização de feridas, adotou-se o modelo de duas feridas paralelas no dorso de ratos, na altura das patas dianteiras (Figura 16). Essa região é escolhida, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal.



Figura 16. Fotografia da região dorsal do animal após confecção das feridas (Foto: Ana Carolina Guidi, 22/04/2016).

Por atingir toda a espessura da pele, essa ferida é considerada um tipo de lesão cutânea total e mimetiza uma lesão cutânea grave em que a cicatrização espontânea é sempre lenta, dessa forma, a ferida tem estímulo máximo das respostas fisiológicas, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central (FERREIRA et al., 2008).

No acompanhamento macroscópico do tratamento com FEB, as feridas não apresentaram sinais sugestivos de infecção como secreção, presença de pus e de odor fétido ou retardo no processo cicatricial (OLIVEIRA et al., 2010).

A contração da ferida pode ser influenciada pela concentração de taninos presente na formulação. Eles promovem a cicatrização de feridas através de vários mecanismos celulares, principalmente devido às suas propriedades adstringentes e antimicrobianas (RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

A contração da ferida é uma etapa importante do fechamento da lesão cutânea e raramente leva à perda da função desses tecidos. Se essa contração for pequena, retarda o fechamento da ferida, permitindo sangramentos e infecções. Entretanto, o fechamento definitivo de uma ferida se deve principalmente à formação do tecido de granulação e à reepitelização (FERREIRA et al., 2008). Os miofibroblastos, através de seus filamentos de actina, são capazes de reduzir a área da lesão facilitando a epitelização por estarem alinhados nos eixos de contração, produzindo movimentos centrípetos das bordas da ferida. A contração do tecido de granulação pode estar associada a ação de mediadores de prostaglandinas (COELHO et al., 1999).

As fotografias apresentadas na Figura 17 mostram a sequência da restauração da pele em função do tempo de tratamento com FEB e Fbase nos períodos padronizados (4, 7, 10 e 14 dias).

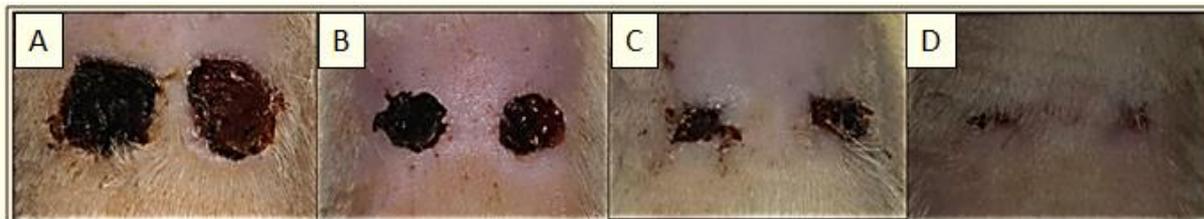


Figura 17. Fotografia da região dorsal do animal após 4 (A), 7 (B), 10 (C) e 14 (D) dias de tratamento com FEB (esquerda) e Fbase (direita). (Fotos: Ana Carolina Guidi, 2016).

O acompanhamento da evolução da medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é o parâmetro muito empregado na prática clínica, por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica (FERREIRA et al., 2008).

As feridas que receberam FEB apresentaram crosta mais escura do que as que receberam Fbase. Em ambas houve exsudação plasmática com formação de crostas superficiais até o 7º dia. Após o 10º dia, a crosta se destacou, evoluindo para epitelização completa, que ocorreu por volta do 14º dia. O crescimento sobre a área reepitelizada iniciou após 10 dias de tratamento.

Como a contração ocorre de forma centrípeta, as feridas, que inicialmente eram quadradas, reduziram seu tamanho, originando margens irregulares sem figura geométrica definida.

O decalque foi feito no dia da confecção das feridas (dia zero) e no final de cada período de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias). Apesar das marcações serem feitas com um molde de 1 cm² para a confecção das feridas, elas tendem a sofrer uma distensão após o corte e a retirada do fragmento de pele devido a distensão provocada pela incisão transversal às linhas de Langer (COELHO et al., 1999), resultando em uma área maior, mostrada como dia zero no gráfico (Figura 18).

A medida da área das feridas referentes ao tratamento com FEB e controle (Fbase) e o percentual de contração, estão apresentados nas Figuras 18 e 19, respectivamente. Em ambas as análises, a evolução ocorreu de forma gradativa, mas sem diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos controle e FEB.

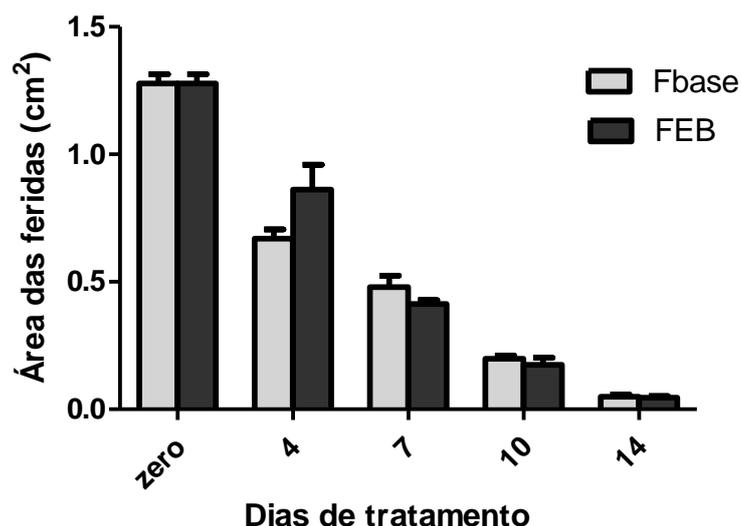


Figura 18. Valores médios da área das feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com filme contendo EB de *P. pluviosa* (FEB) e filme sem o EB (Fbase) após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

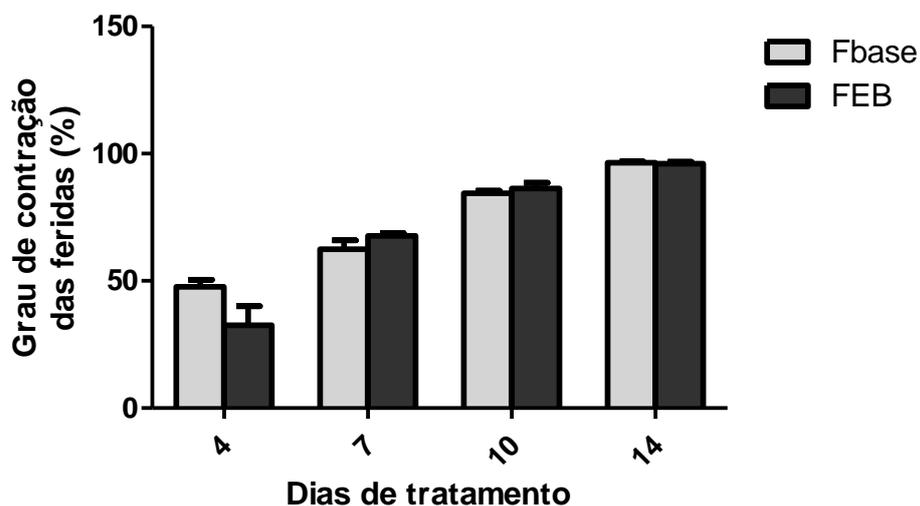


Figura 19. Percentual de contração de feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com filme contendo EB de *P. pluviosa* (FEB) e filme sem o EB (Fbase) após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

No estudo histológico as feridas foram avaliadas com base no comprimento e espessura da superfície reepitelizada. A cicatrização da ferida caracteriza-se, entre outros fatores, pela hemostasia, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. A epitelização, que é o processo de renovação epitelial após a lesão, envolve a proliferação e

migração das células epiteliais para o centro da ferida (RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

As feridas após 4, 7 e 10 dias de tratamento apresentaram duas margens de reepitelização e uma restauração completa ocorreu após 14 dias. A pele adjacente à ferida apresentava aspecto normal caracterizando a efetividade da contração da borda e restauração da área lesada.

A Figura 20 mostra os cortes histológicos corados por HE após 4 e 7 dias de tratamento com FEB. Na análise do epitélio neoformado durante todos os períodos de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias) com os filmes FEB e Fbase, a área reepitelizada se manteve pequena ou inexistente até o 10º dia de tratamento. Nos cortes histológicos foi possível observar resíduos do filme aderido à crosta da ferida em praticamente todos os dias, mostrando que o filme, ou parte dele, ficou aderido sobre a crosta da ferida. Embora frouxo, o tecido de granulação já foi observado desde os cortes obtidos com 4 dias de tratamento.

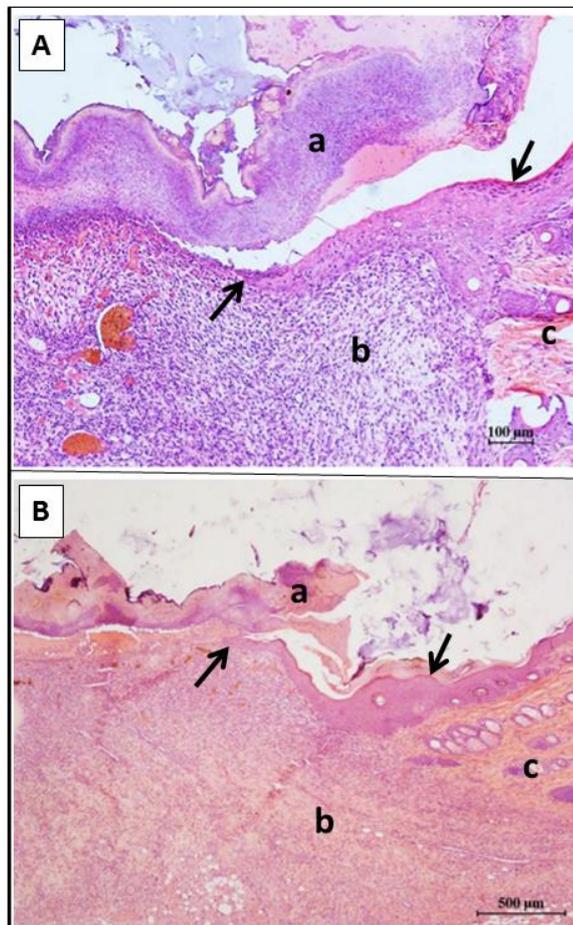


Figura 20. Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da reepitelização de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com FEB por um período de (A) 4 dias - aumento de 4x e (B) 10 dias - aumento de 10x. Destaque para: (a) crosta com presença de resíduos de filme, (b) tecido de granulação, (c) tecido íntegro. As setas indicam o início e o final da área reepitelizada.

O comprimento da epiderme neoformada avalia a migração horizontal dos queratinócitos a partir da margem em direção ao centro da ferida. A migração dessas células se dá pela matriz provisória formada e seguindo a orientação do gradiente químico de substâncias quimioatraentes (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005). O movimento dos queratinócitos é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003a). Nas feridas de 4, 7 e 10 dias, duas margens de reepitelização (línguas de reepitelização) foram medidas, somadas e os resultados foram expressos em micrômetros.

As feridas tratadas com FEB apresentaram comprimento da superfície de reepitelização maior em 7 dias ($p < 0,05$) quando comparada ao controle negativo (Fbase) (Figura 21), mostrando atuação do EB na migração dos queratinócitos para o centro da ferida. Aos 4 e 10 dias não foi observado diferença estatística.

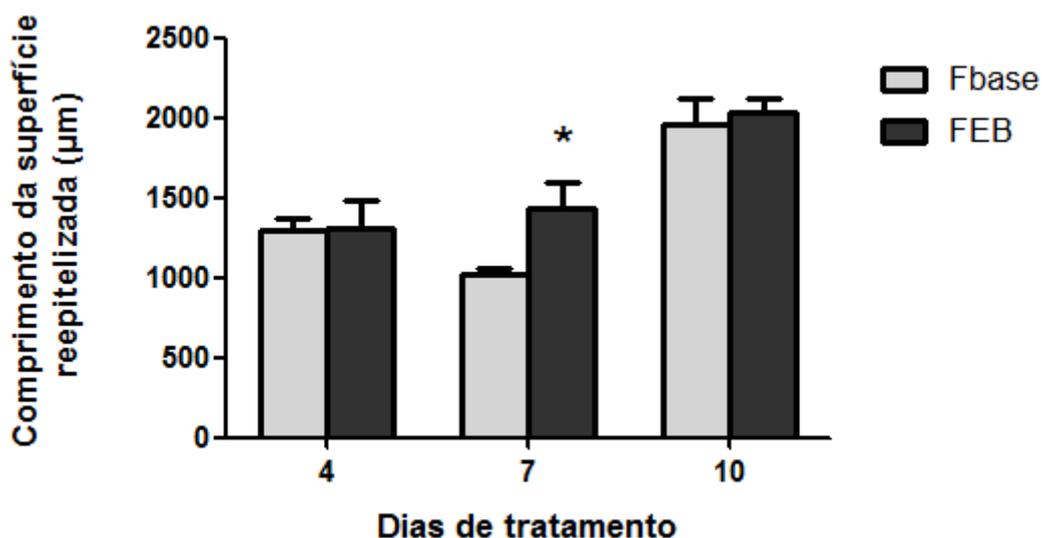


Figura 21. Gráfico representativo da média±desvio padrão da medida do comprimento da língua de reepitelização (em μm), aos 4, 7 e 10 dias de tratamento de feridas, com FEB e Fbase (controle negativo); ($n=5$). Análise estatística realizada por teste t com $*(p < 0,05)$.

Com aplicação diária do filme polimérico as feridas apresentaram a epiderme completamente formada após 14 dias. No trabalho realizado por Bueno et al. (2016), em que utilizou formulação em gel com a mesma concentração de EB de *P. pluviosa*, a reepitelização completa ocorreu após 10 dias de tratamento. O filme formou uma espécie de curativo, cobrindo a ferida, principalmente nos estágios iniciais. Sugere-se que essa proteção provocada pela presença física do filme pode ter retardado o processo de formação da nova epiderme.

A Figura 22 mostra o centro das feridas tratadas com FEB e Fbase após 14 dias, totalmente recoberta pela epiderme. A espessura da epiderme neoformada está relacionada com a diferenciação do tecido, sendo uma maneira indireta de determinar a migração vertical dos queratinócitos (BESSION, 2014).

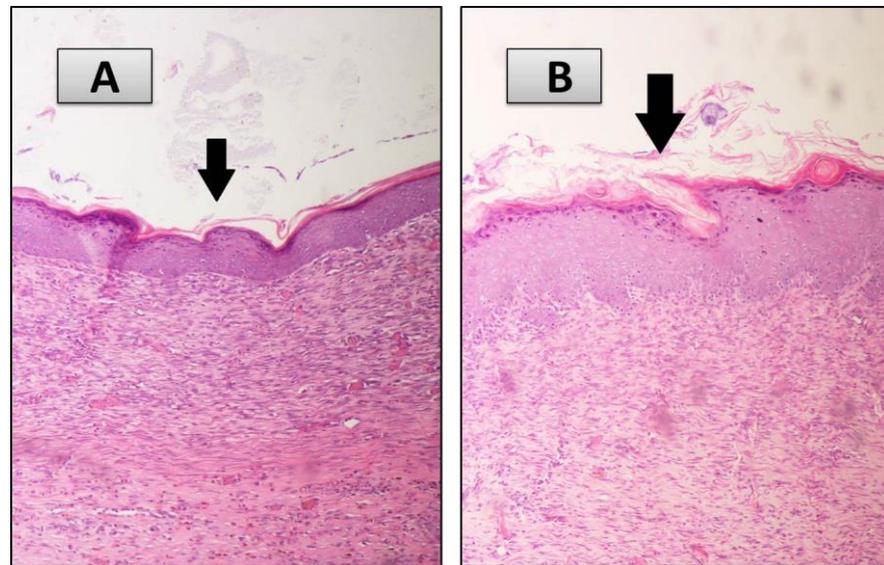


Figura 22. Fotomicrografias de cortes histológicos com coloração HE para medida da espessura da epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com (A) Fbase e com (B) FEB aos 14 dias. As setas indicam o centro da ferida, com a epiderme completamente reestabelecida. Aumento de 10x.

A espessura da epiderme neoformada foi medida em diferentes pontos no centro da ferida. Aos 14 dias (Figura 23), as feridas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), mostrando um aumento na espessura da epiderme nas feridas tratadas com FEB.

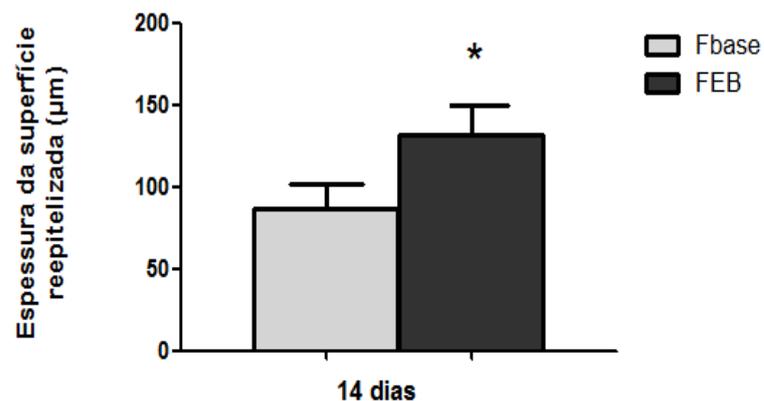


Figura 23. Gráfico representativo da média \pm desvio padrão da medida da espessura (em μm) da superfície reepitelizada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas com FEB e Fbase aos 14 dias; (n=5). Análise estatística realizada por teste *t* com $*(p < 0,05)$.

A proliferação celular na epiderme neoformada foi avaliada pela contagem das células epiteliais bloqueadas em metáfase, nas camadas basal e supra-basal. O sulfato de vincristina é um quimioterápico que interrompe a mitose na fase de metáfase (FARO et al., 2008), permitindo a contagem das células em cortes histológicos.

A figura 24 mostra o gráfico da proliferação celular no epitélio após tratamento com filme com EB de *P. pluviosa*. Aos 4 e 7 dias não houve diferença estatística entre os grupos tratado e controle, porém, aos 10 e 14 dias houve uma maior proliferação celular, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) no FEB comparado ao Fbase. O resultado pode ter sido alcançado pelo efeito do EB sobre os queratinócitos, estimulando uma resposta proliferativa destas células ao longo da margem da reepitelização (HERNANDES et al., 2010).

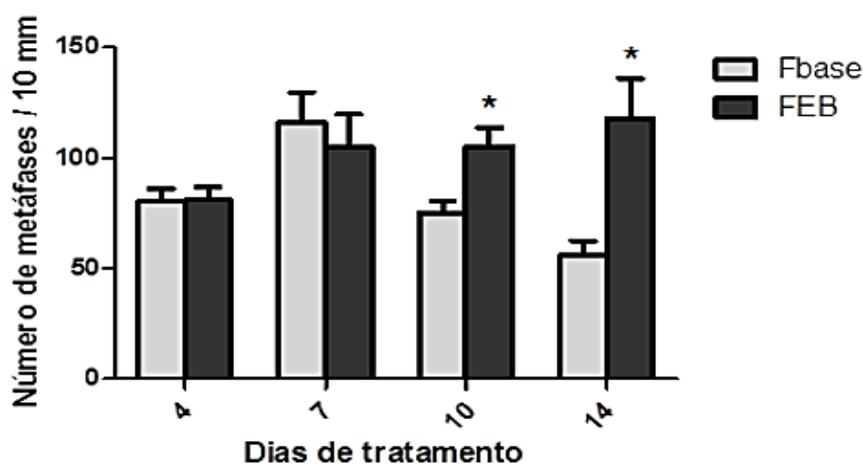


Figura 24. Gráfico representativo da média \pm desvio padrão do número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas por 4, 7, 10 e 14 dias com FEB e Fbase. Análise estatística realizada por teste *t* com * ($P < 0,05$).

A Figura 24 mostra que o EB de *P. pluviosa* influenciou a proliferação de queratinócitos *in vivo* a partir do 10º dia e se manteve no 14º. Esses dados são compatíveis com a avaliação da reepitelização (Figura 23), refletindo na espessura da epiderme neoformada após a completa reepitelização. Em estudo *in vitro* realizado por Bueno et al. (2014), queratinócitos e fibroblastos foram estimulados pelo EB de *P. pluviosa*. O EB também demonstrou aumento do número de metáfases *in vivo*, em cortes histológicos de feridas cutâneas tratadas por 7 dias (BUENO et al. 2016).

A técnica de permeação cutânea através da absorção óptica em espectrofotômetro fotoacústico (PAS) mostrou a absorção do EB nas feridas tratadas com o filme. Para verificar a região espectral de absorção, o EB, FEB e Fbase foram avaliados previamente,

apresentados na Figura 25. As bandas presentes no espectro servem como indicadores na demonstração da penetração.

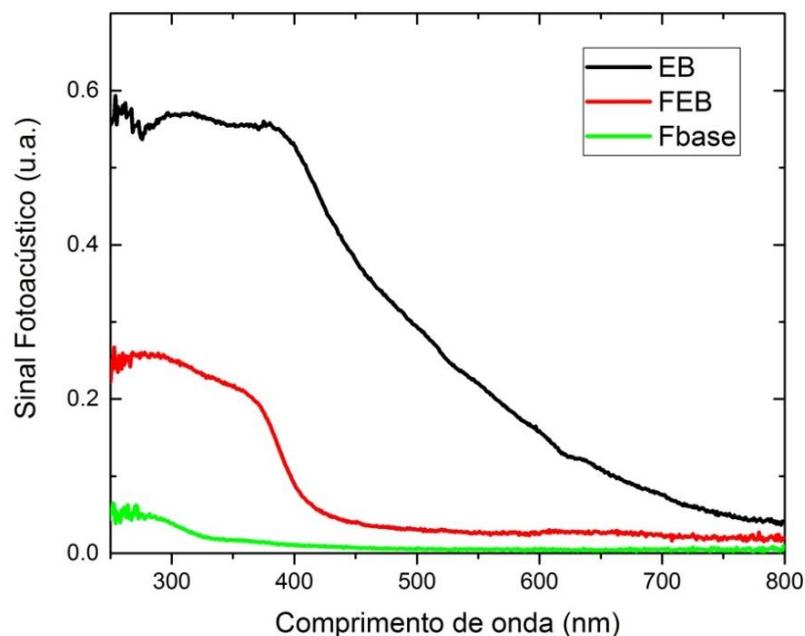


Figura 25. Espectro de absorção óptica do extrato bruto de *P. pluviosa* (EB), filme com EB (FEB) e filme base – controle negativo (Fbase), realizado por espectroscopia fotoacústica.

Na Figura 25, a banda presente na região de 350-400 nm é a provável banda do EB, pois não está presente no filme base (controle negativo). O FEB apresentou o um sinal menor que o EB por estar na formulação e, portanto, em menor concentração.

A Figura 26 mostra o perfil de permeação cutânea, obtido pela subtração do espectro de absorção do controle negativo (Fbase) pelo espectro obtido na derme tratada (FEB), oferecendo o perfil de absorção resultante apenas para o EB.

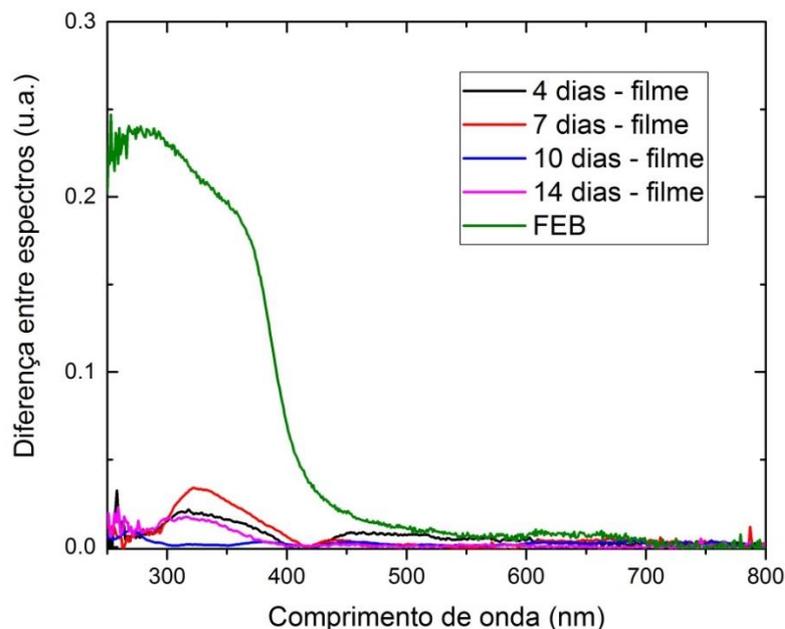


Figura 26. Diferença dos espectros de absorção do filme contendo EB (FEB) e filme base – controle negativo (Fbase) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, realizado por espectroscopia fotoacústica.

A maior taxa de penetração foi observada após 4 e 7 dias de tratamento (Figura 26). Nesta fase, a crosta é a principal barreira para a propagação, mas a característica da formulação quando aplicada, pode torná-la mais úmida e flexível, favorecendo a permeação das substâncias (SEHN et al., 2009). Nesse período também foi observado uma melhor adesão do filme. Isso pode estar relacionado com a maior absorção do EB em 4 e 7 dias.

Nos primeiros dias, a pele ferida ainda não se encontrava reepitelizada e estava em processo de formação de tecido de granulação. Mesmo com essa formação de tecido e com a inflamação presente no local, nota-se que o EB penetrou através da pele, atingindo o lado oposto da epiderme e agindo sobre o tecido lesado. Após 7 dias, apesar da contração da margem, o ferimento ainda está aberto, o que favoreceria a taxa de penetração. Esse achado pode estar relacionado ao maior comprimento da superfície reepitelizada, observada também aos 7 dias (Figura 21).

Aos 10 dias, o restabelecimento parcial da barreira epitelial, caracterizada pela reepitelização e queratinização da epiderme pode interferir na taxa de permeação dos fármacos (BESSION, 2014). Nesse período, a análise não mostrou a presença do EB na derme (Figura 26).

O aumento subsequente da taxa de permeação do EB em 14 dias pode estar relacionado à remodelação do tecido vascular (SEHN et al 2009). Mesmo com a epiderme completamente reestabelecida após 14 dias (Figura 22), a espectroscopia fotoacústica mostrou que o EB atingiu a derme, sendo capaz de estimular a proliferação celular.

A aplicação tópica de drogas tem sido usada para tratar diversos processos patológicos da pele. Para que este tratamento seja eficaz, o medicamento presente na formulação deve atingir a camada interna da pele (derme) e ter uma permeabilidade mínima à corrente sanguínea. O tratamento tópico depende das características de permeação da formulação. O estudo das taxas de penetração dos compostos e sua eficácia para atingir a camada profunda da ferida durante as várias fases do processo de cicatrização é de extrema importância para avaliar mecanismos que controlam a interação das substâncias com a ferida, contribuindo para otimizar formulações para uma melhor resposta terapêutica (SEHN et al., 2009; PINTO et al., 2015).

A atividade antiestafilocócica *in vitro* de filmes com EB de *P. pluviosa* foi avaliada inicialmente pela mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento. Os resultados estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Diâmetro (mm) da zona de inibição dos filmes com EB de *P. pluviosa* (FEB) sobre *Staphylococcus aureus* cepa padrão, isolado clínico e multirresistente pelo método de difusão em meio sólido de filme

	Zona de inibição (5 mg/mL)*		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> N315 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i> CN ^b
Filme com EB (FEB)	3,28 ± 0,38	2,85 ± 0,38	4,86 ± 0,75
Controle Positivo	18 ± 0,00	3 ± 0,00	24 ± 0,00
Controle negativo (Fbase)	NA	NA	NA

* Concentração equivalente a 1,65 mg/mL no FEB; NA: Não ativo; ^a*Staphylococcus aureus* N315 cepa multirresistente; ^b*Staphylococcus aureus* isolado clínico coagulase negativa; ^cGentamicina (0,02 mg/mL).

Os resultados obtidos para o filme com EB, não são comparáveis ao controle positivo, visto que a Gentamicina é uma substância pura. Porém fica evidenciado que os filmes contendo EB demonstraram atividade antiestafilocócica para as três cepas utilizadas no ensaio com formação de halo de inibição de crescimento.

Diferentes concentrações solubilizadas do EB, FEB, Fbase e Gentamicina foram testadas e a Concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano. Os resultados obtidos para CIM estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de filme com EB de *P. pluviosa* (FEB) sobre *Staphylococcus aureus* cepa padrão, isolado clínico e multirresistente

	CIM (mg/mL)		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	<i>Staphylococcus aureus</i> N315 ^a	<i>Staphylococcus aureus</i> CN ^b
EB de <i>P. pluviosa</i>	0,62	1,25	0,31
Filme com EB (FEB)	3,00	>3,00	1,50
Controle Positivo ^c	0,02	0,04	0,02
Controle Negativo (Fbase)	NA	NA	NA

NA: Não ativo; ^a*Staphylococcus aureus* N315 cepa multirresistente; ^b*Staphylococcus aureus* isolado clínico coagulase negativa; ^cGentamicina.

O EB de *P. pluviosa* apresentou resultados satisfatórios na determinação da CIM para as cepas de *S. aureus* testadas. Esses resultados também puderam ser observados com o FEB, apesar da concentração de EB no filme ser menor. As concentrações testadas de FEB só não foram satisfatórias para o ensaio com a cepa multirresistente.

Os resultados favoráveis para essa atividade podem ser devido a presença de compostos fenólicos e taninos presentes no EB de *P. pluviosa* (AGYARE et al., 2013; MARTUCCI et al., 2015). Outras plantas já foram descritas com esse potencial contra *S. aureus*.

Feridas abertas podem ser alvo de bactérias oportunistas pode prolongar a duração do tratamento, causando dificuldade na cicatrização ou ate levar a infecção sistêmica dependendo da gravidade. Dados da literatura sobre a atividade antibacteriana de extratos vegetais, avaliada frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, mostram o grande potencial das plantas para tratamento terapêutico (NASCIMENTO et al., 2000).

O *S. aureus* faz parte da microbiota natural, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênico em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade, comum de infecções cutâneas (GELATTI, et al., 2009).

Flores, Vila e Almanza (2006) demonstraram a atividade antimicrobiana do extrato diclorometânico e substâncias isoladas de *P. pluviosa* contra cepas de *S. aureus* (ATCC-25923/6538).

A atividade antimicrobiana de muitas plantas ocorre devido a compostos sintetizados no metabolismo secundário, como os compostos fenólicos (NASCIMENTO et al., 2000).

A atividade antibacteriana do extrato bruto de *S. adstringens* contra *S. aureus* foi atribuído à sua constituição e teor de compostos fenólicos da classe dos taninos presentes na casca de *S. adstringens* (AUDI et al., 2004; SOUZA et al., 2007). Extrato e fração das

cascas do caule de *Maytenus rigida*, também foram testadas contra *S. aureus* e apresentaram atividade na inibição de crescimento (SANTOS et al., 2011).

Feridas de caprinos foram tratadas com pomada contendo *Caesalpinia ferrea*, mesmo gênero da *P. pluviosa* e observou-se que não houve crescimento da bactéria *S. aureus*, indicando que a ação antimicrobiana pode estar relacionada à presença de taninos na composição fitoquímica (OLIVEIRA et al., 2010).

4 CONCLUSÕES

O filme polimérico não se mostrou irritante, causando baixa agitação nos animais após as aplicações. A ausência de água na formulação permite o fácil armazenamento, sem necessidade de conservantes na formulação. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se considerar que o EB de *P. pluviosa* incorporado em filme polimérico mostrou melhora na reepitelização da ferida em relação ao controle negativo, apresentando proliferação mitótica significativa e comprovada permeação cutânea, favorecendo o processo de cicatrização. O uso de uma formulação com finalidade cicatrizante que também traz benefícios na prevenção de infecção é uma excelente alternativa terapêutica.

CAPÍTULO 2

Extrato bruto de *Poincianella pluviosa* complexado com ciclodextrina e incorporado em gel – caracterização do complexo e avaliação da atividade cicatrizante

1. INTRODUÇÃO

Muitos extratos de plantas utilizados na medicina popular são estudados para o tratamento de doenças da pele, pois são acessíveis e supostamente seguros devido a menos reações de hipersensibilidade (TSALA et al., 2016). A *P. pluviosa*, já teve sua ação cicatrizante comprovada, agindo no reparo tecidual de feridas de ratos normoglicêmicos (BUENO et al., 2016) e diabéticos (BUENO, 2014), além da proliferação de fibroblastos e queratinócitos demonstrados *in vitro* (BUENO et al., 2014).

As pesquisas sobre o processo de reparação tissular são extremamente dinâmicas, assim como o desenvolvimento de recursos para favorecê-lo. Um produto eficaz para auxiliar na cicatrização de feridas deve oferecer conforto, boa relação custo/benefício e manter o leito da ferida com umidade ideal. Muito usado na cicatrização de feridas, o hidrogel é um gel formado por uma rede tridimensional de polímeros em meio aquoso, podendo se apresentar na forma de gel transparente, amorfo ou filme. A forma em gel amorfo pode ser utilizada no tratamento de diversas patologias e em várias fases da cicatrização (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003b; ALLEN Jr; POPOVICH; ANSEL, 2013).

Na busca de novas formulações farmacêuticas têm surgido diversos sistemas carreadores de fármacos, com a finalidade de modular a cinética de liberação, melhorar a absorção, aumentar a estabilidade do fármaco ou direcioná-lo para uma determinada população celular (SALTÃO; VEIGA, 2001; MORIWAKI et al., 2009).

Uma das alternativas que vem sendo estudada e aplicada para esse fim são as ciclodextrinas (CD), amplamente utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica e na agricultura. Um grande número de complexos de CD com fármacos tem sido produzidos, os quais foram também introduzidos em formulações transdérmicas para melhorar a liberação e a capacidade de permear a pele (MARTINS; VEIGA, 2002; MORIWAKI et al., 2009).

As CD têm sido bastante utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, particularmente devido às suas propriedades complexantes, as quais proporcionam incremento de solubilidade e consequente aumento da taxa de dissolução de fármacos pouco solúveis, estabilidade, redução de irritações (gástrica, dérmica ou ocular) bem como diminuição ou eliminação de odores ou sabores desagradáveis em formulações líquidas e em alguns casos, melhorando a biodisponibilidade (SALTÃO; VEIGA, 2001; LYRA et al., 2010).

As CD são oligossacarídeos cíclicos, compostos por unidades de glicose unidas através de ligações α -1,4, originadas da degradação do amido pelas enzimas glicosiltransferases sintetizadas por alguns microrganismos. As que são obtidas com maior

rendimento são comumente conhecidas como CD naturais e contém seis, sete ou oito unidades de glicose, sendo denominadas de α -ciclodextrinas (α -CD), β -ciclodextrinas (β -CD) e γ -ciclodextrinas (γ -CD), respectivamente (VENTURINI et al., 2008; LYRA et al., 2010; MANGOLIM et al., 2014; VALENTINI et al., 2015).

A hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), conforme apresentada na Figura 27, é um derivado de CD hidroxialquilado e é amplamente utilizado para aumentar a solubilidade, a estabilidade e a biodisponibilidade dos fármacos, devido à sua solubilidade em água relativamente mais elevada e a menor toxicidade do que a β -CD (HSU et al., 2013).

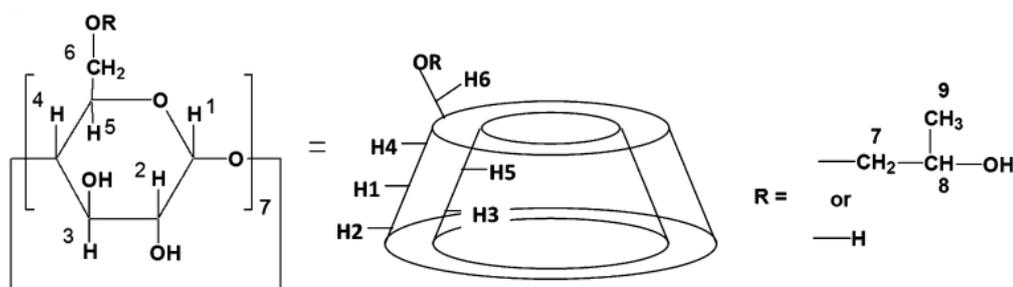


Figura 27. Estrutura química da hidroxipropil- β -ciclodextrinas (HP β CD) (HSU et al., 2013).

As CD possuem grupos hidroxilas primários e secundários orientados para o exterior do anel formado, conferindo um exterior bastante hidrofílico e uma cavidade hidrofóbica, onde as moléculas hóspedes ou parte delas são encapsuladas (LYRA et al., 2010; VALENTINI et al., 2015). Em ambiente aquoso, CD são capazes de formar complexos de inclusão com muitos fármacos, incorporando uma molécula de droga total ou pelo menos alguma porção lipofílica de uma molécula dentro da cavidade (DE PAULA et al., 2007).

As CD foram introduzidas nas formulações transdérmicas para melhorar a liberação e a capacidade de permeação do fármaco na pele (MARTINS; VEIGA, 2002). Tem sido demonstrado que algumas β -CD modificadas são capazes de interagir com componentes lipofílicos do estrato córneo e melhorar a absorção da droga de administração transdérmica, além de agir como intensificadores de absorção (DE PAULA et al., 2007; MARTINS; VEIGA, 2002).

Sugere-se que as CD atuem como transportadores, captando as moléculas de fármaco hidrofóbico em solução e distribuindo-os nas membranas biológicas, como a pele, mucosas ou córneas. A membrana relativamente lipofílica tem baixa afinidade pelas moléculas de CD hidrofílicas e devido ao tamanho relativamente grande das CDs, praticamente não atravessam a pele. Por esta razão, elas permanecem na fase hidrofílica da membrana, ou seja, no veículo aquoso (creme óleo/água ou hidrogel) e apenas a fração

livre de fármaco vai sendo absorvida (MARTINS; VEIGA, 2002; OLIVEIRA, SANTOS; COELHO, 2009).

Grande número de complexos de CD com fármacos já foram produzidos. O complexo de inclusão com piroxicam foi capaz de aumentar o fluxo do fármaco em três vezes através da pele de rato. Em complexo com clonazepam, a CD melhorou o seu perfil de liberação a partir do hidrogel de carbopol através de uma membrana de nitrato de celulose (MARTINS; VEIGA, 2002). De Paula et al. (2007) demonstraram que a complexação de estradiol com CD aumentou significativamente o fluxo e permeabilidade de estradiol através da pele.

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar o complexo HP β CD com EB e avaliar a cicatrização de feridas cutâneas de ratos, utilizando o complexo, na tentativa de melhorar a liberação do EB na pele e, conseqüentemente se obter melhor resposta terapêutica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 EXTRATO BRUTO (EB)

O EB foi preparado de acordo com a metodologia descrita por Bueno et al. (2012). Foram utilizadas cascas do caule de *Poincianella pluviosa*, coletada na cidade de Maringá, Paraná, Brasil. O lote de EB utilizado foi cedido pelo Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito da Universidade Estadual de Maringá.

2.2 INCORPORAÇÃO DO EB EM CICLODEXTRINA

A incorporação do EB de *P. pluviosa* em ciclodextrina foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Enzimática, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Graciette Matioli.

Para preparar o complexo, foi utilizada a HP β CD (Cavasol® W7 HP), cedida pela Wacker Chemical Corporation e o EB, na proporção 1:1 (p/p). Primeiramente, adicionou-se 0,5 g de HP β CD em 6,0 mL de água purificada e a mistura foi agitada até completa solubilização. De forma similar, 0,5 g do EB foram solubilizados em 4,0 mL de solução hidroetanólica (50%, v/v). As soluções obtidas foram misturadas, vertendo-se lentamente a solução do extrato sobre a solução de HP β CD, mantida sob agitação e temperatura de 38 °C em reator de vidro encamisado. A agitação foi mantida por 4 h à 38 °C. Após, o sistema foi resfriado até 25 °C e agitado por mais 1 h. A amostra foi acondicionada em frasco de vidro, congelada e liofilizada por 24 h para obtenção do complexo na forma de pó (EB-HP β CD).

2.3 CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO COM CICLODEXTRINA

2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob responsabilidade do Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior.

A morfologia de superfície e corte transversal do EB, HP β CD e EB-HP β CD foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura utilizando o equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 106 torr. As amostras foram montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas em microscópio eletrônico de varredura. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 9 kV.

2.3.2 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR/ATR) (*Fourier Transform Infrared*)

Uma mistura física de EB com HP β CD na proporção de 1:1 (p/p) foi realizada sem passar pelo processo de complexação, a fim de comparação dos espectros.

Os espectros FT-IR do EB, HP β CD, complexo EB-HP β CD e mistura física foram obtidos utilizando um espectrômetro de transformação de Fourier infravermelho (modelo Vertex 70v, Bruker, Alemanha). A gama espectral foi de 400-4000 cm^{-1} com 128 varreduras e uma resolução de 2 cm^{-1} (MANGOLIM et al., 2014).

2.3.3 Espectroscopia Raman (FT-Raman) (*Fourier Transform Raman Spectroscopy*)

Os espectros Raman do EB, HP β CD, complexo EB-HP β CD e mistura física foram obtidos utilizando um espectrômetro de transformação de Fourier infravermelho (modelo Vertex 70v com módulo Ram II, Bruker, Alemanha) equipado com um detector refrigerado com nitrogênio Germanium. Um laser Nd:YAG foi usado para uma excitação a 1064 nm com até 200 mV. Todos os espectros foram obtidos com uma média de 500 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} (MANGOLIM et al., 2014).

2.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE POLIFENÓIS TOTAIS

O teor de polifenóis totais (PT) foi determinado para o EB e para o EB-HP β CD, a fim de padronizar e utilizar a mesma concentração de EB de *P. pluviosa* adotada por Bueno et al. (2016), no tratamento de feridas cutâneas (gel com 1% de EB, apresentando 22,7% em PT). A determinação de PT foi realizada conforme Bueno et al. (2012) utilizando o método de Folin-Ciocalteu, descrita na seção 3.2 do Capítulo 1.

2.5 PREPARO DO GEL PARA TRATAMENTO DAS FERIDAS

Para preparar o gel base foi utilizado Carbopol 940 NS (1%), Trietanolamina (1%), óleo de amêndoas (3%) e água destilada (q.s.p.). Para o preparo do gel base, o carbopol 940 NS foi pulverizado em gral de porcelana e a água destilada foi acrescentada aos poucos, mexendo até dissolver o carbopol por completo. A trietanolamina foi adicionada, mexendo até obter a consistência de gel. Foi adicionado o óleo de amêndoas e homogeneizado.

Em uma parte desse gel base foi incorporado o complexo EB-HP β CD em proporção equivalente a 1%. O cálculo da proporção a ser incluída considerou o valor de PT do complexo e a proporção de extrato e HP β CD utilizada no preparo do complexo. O gel base foi utilizado como controle negativo.

2.6 ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as regras de cuidado e uso de animais de laboratório descritos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi aprovado pela comissão com o parecer nº 9861231115 (Anexos 1 e 2).

Foram utilizados 32 ratos Wistar com 60 dias (220-280 g), machos, provenientes do Biotério Central da UEM, os quais permaneceram em gaiolas individuais no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal – LEA do Bloco T22 (Departamento de Farmácia – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil), em condições padronizadas (temperatura de 22 \pm 1 °C e umidade relativa de 50 \pm 10%), ciclo dia-noite de 12 h e ração e água *ad libitum*.

Foram divididos em 4 grupos (n=8) de acordo com o período de tratamento: 4, 7, 10 e 14 dias. De cada grupo, 3 animais foram utilizados para análise de permeação cutânea (PAS) e 5 para análise histológica (Figura 28).

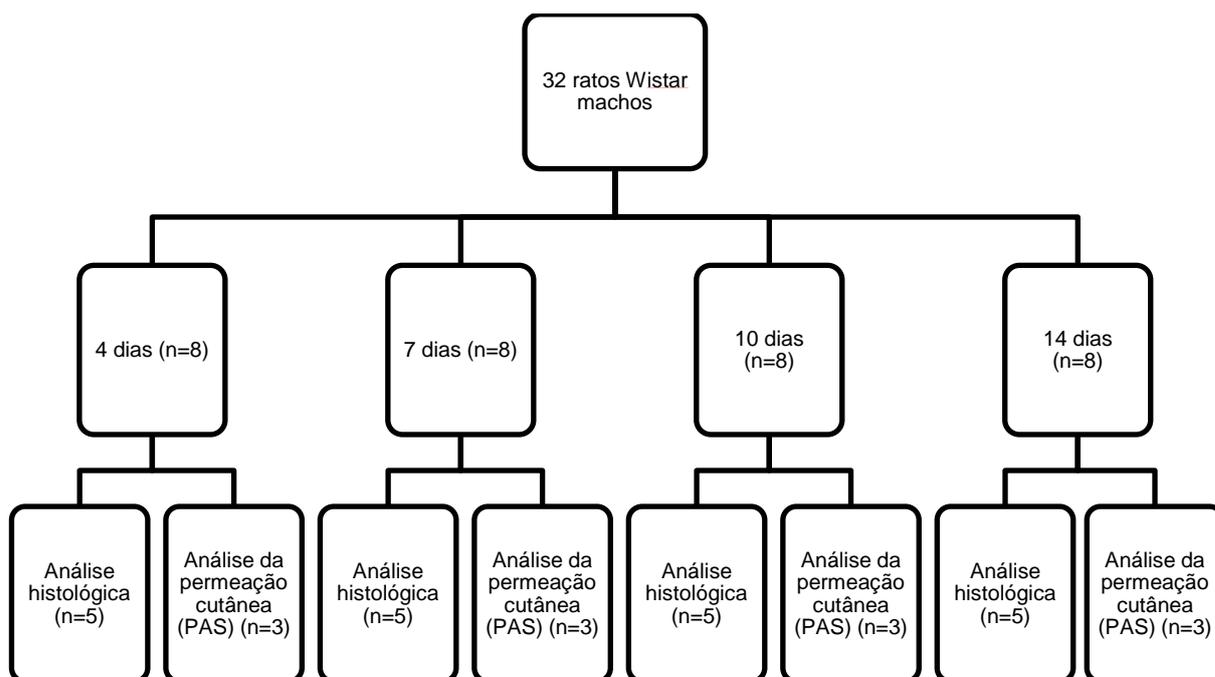


Figura 28. Divisão dos grupos de animais tratados com gel EB-HP β CD e gel base.

2.6.1 Confeção e tratamento das feridas cutâneas

Para a confecção de feridas excisionais, os animais foram anestesiados com Tiopental (40 mg/kg) associado com Lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg), via intraperitoneal. Após epilação manual e assepsia do local, um molde foi utilizado para marcar a área de confecção das feridas (1 cm²). Com auxílio de tesoura, foram feitas duas feridas com remoção de fragmento de pele (epiderme e derme) do dorso dos animais.

A ferida esquerda recebeu tratamento diário com gel EB-HP β CD e a ferida direita recebeu o controle negativo gel base. O tratamento foi realizado diariamente sobre as feridas. Para aplicação do gel foi utilizada espátula plástica e quantidade que cobrisse a área da ferida (aproximadamente 0,2 g). O tratamento foi iniciado a partir do dia posterior a confecção das feridas (BUENO et al., 2016).

Após 4, 7, 10 e 14 dias, os animais foram eutanasiados com sobredose de Tiopental (120 mg/kg, via intraperitoneal) associado com lidocaína 10 mg/mL (7 mg/kg). As feridas cutâneas foram avaliadas quanto ao seu aspecto macroscópico e removidas para análise de permeação por PAS e análise histológica (com margem de pele sadia em torno da ferida).

2.7 MEDIDA DA ÁREA DAS FERIDAS

A medida das feridas foi obtida após sua confecção e ao final de cada período de tratamento. O cálculo da área das feridas e grau de contração foram realizados seguindo a mesma metodologia da seção 2.6 do Capítulo 1.

2.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A montagem das lâminas para análise histológica foi realizada de acordo com a metodologia descrita na seção 2.7 do Capítulo 1.

Os cortes foram dispostos em quatro lâminas, com cinco cortes cada e foram analisados três cortes de cada lâmina (BUENO et al., 2016). Duas lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para análise da reepitelização e número de metáfases bloqueadas presentes na camada basal e supra-basal da epiderme neoformada e as outras duas lâminas foram coradas pela técnica de Picrosírius para a quantificação da área ocupada pelas fibras colágenas tipo I e III.

As imagens foram capturadas em microscópio óptico Nikon® Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão) acoplado a uma câmera Nikon DS-FI1C cooled digital® (Nikon, Tóquio, Japão), com imagens transmitidas através do sistema D-DA simple analyzer, ao monitor colorido LCD G205HV®, congeladas e digitalizadas por meio de computador Intel Pentium Processor® E 5700 LGA775. A análise das imagens foi realizada no programa Image Pro-plus® versão 4.5.

2.8.1 Análise da reepitelização e número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada

A análise de reepitelização e contagem do número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada foi realizada de acordo com a metodologia descrita na seção 2.7.2 do Capítulo 1.

2.8.2 Análise das fibras colágenas

As imagens foram capturadas em microscópio óptico, utilizando fonte de luz polarizada C-SP simple polarizer. O microscópio equipado com polarizador permite birrefringência das fibras colágenas, de modo que o fundo das lâminas permanece com coloração preta e as fibras colágenas são coradas de vermelho/amarelo e verde. Em cada corte histológico, foram considerados três campos da ferida: um campo central e dois

laterais, próximos às margens da ferida. Foi utilizada a objetiva de 20X para a captura das imagens.

A quantificação da área ocupada pelas fibras foi realizada por meio do programa Image Pro-Plus® (v. 4.5). A calibração do sistema foi baseada na densidade óptica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, selecionando-se o valor limite de melhor resolução.

Para definir os pixels a serem contados pelo programa foram selecionados tons de vermelho, amarelo e verde. As fibras verdes foram consideradas como tipo III (imaturas) e as vermelhas/amarelas como tipo I (maduras). A porcentagem de área ocupada pelo colágeno tipo I e tipo III é calculada considerando a área total de cada campo (PINTO et al., 2015; BUENO et al., 2016).

Com base nessas porcentagens de colágeno, foi determinado o índice da maturação do colágeno (ImaC), definido como a razão entre a porcentagem da área ocupada pelo colágeno tipo I sobre o tipo III. Valores maiores do que 1 indicam a predominância de colágeno tipo I e valores menores que 1 indicam a predominância do colágeno tipo III (CORREA-NETO et al., 2009).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises macroscópicas (área das feridas e percentual de contração) e histológicas do tratamento com gel EB-HP β CD e gel base foram submetidos à análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism® 5 (Copyright GraphPad Software, Inc.). Os dados foram submetidos à verificação da normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram apresentados como média \pm desvio padrão e as diferenças significativas foram determinadas através do teste *t* pareado para resultados paramétricos e Mann-Whitney, para resultados não paramétricos, sendo considerado $p < 0,05$ como critério de significância (BESSON, 2014; BUENO et al., 2016).

2.10 ANÁLISE DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA EM ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Ao final de cada período de tratamento dos animais tratados com gel EB-HP β CD e gel base, as amostras de pele com ferida foram removidas e encaminhadas imediatamente ao laboratório de fotoacústica para análise da permeação cutânea, seguindo metodologia descrita na seção 3.7, Capítulo 1.

O EB-HP β CD, HP β CD, gel EB-HP β CD e gel base foram avaliados previamente para verificar a região espectral de absorção. Os espectros fotoacústicos das amostras de pele

tratados com EB-HP β CD foram subtraídos dos controles negativos gel base, resultando um espectro que corresponde à permeação do EB.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A formação do complexo EB-HP β CD foi caracterizada pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Espectroscopia Raman (FT-Raman).

A microscopia eletrônica de varredura revelou uma morfologia esférica na HP β CD (Figura 29 - B). Quando ocorreu o processo de complexação com EB (Figura 29 - C e D), essa conformação foi perdida e o complexo assumiu características semelhantes ao EB (Figura 29 - A), ou seja, uma morfologia irregular.

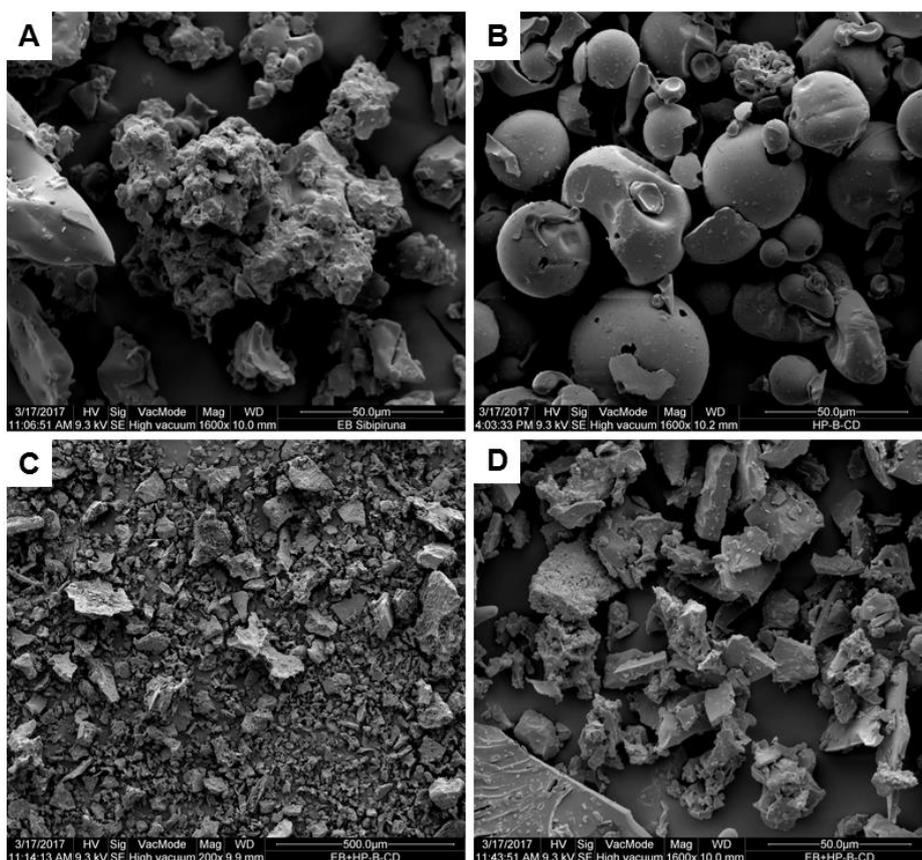


Figura 29. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura: (A) EB de *P. pluviosa* - em aumento de 1600x; (B) HP β CD - aumento de 1600x; (C) EB-HP β CD - aumento de 200x; (D) EB-HP β CD - em aumento de 1600x.

A análise FTIR foi realizada para avaliar a complexação do EB com HP β CD, comprando-se com o EB, com a HP β CD e com a mistura física de EB com HP β CD,

apresentados na Figura 30-A. A espectroscopia FTIR é amplamente utilizada para demonstrar a formação de complexos de inclusão (MOHAN et al., 2012).

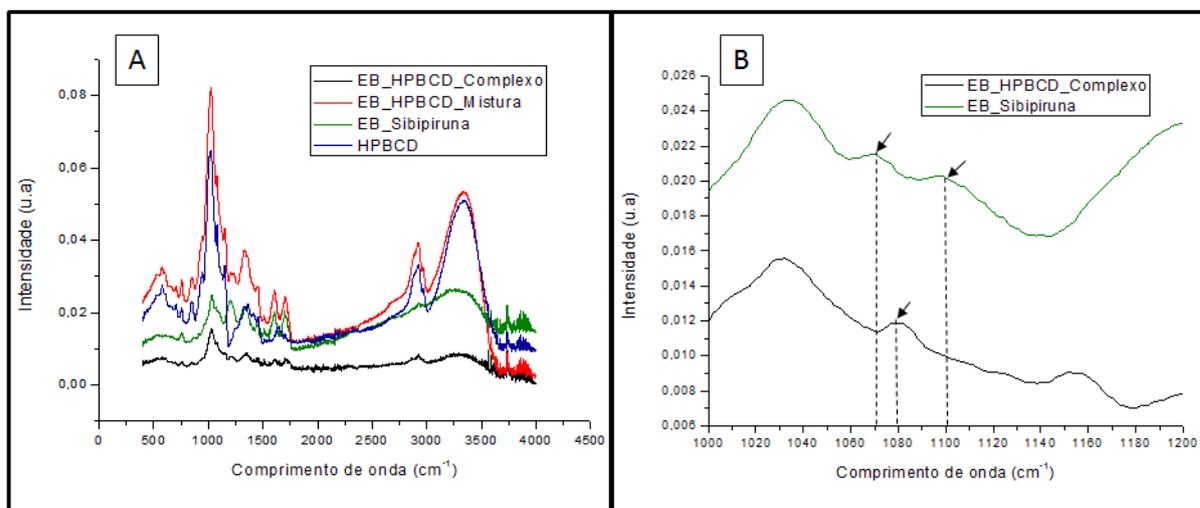


Figura 30. (A) Espectroscopia FTIR do complexo EB-HP β CD, mistura física de EB com HP β CD, EB de *P. pluviosa* (sibiruna) e EB-HP β CD; (B) Ampliação de 1000 a 1200 cm^{-1} , evidenciando o deslocamento e supressão de picos.

Nos espectros da Figura 30-B é possível observar o deslocamento da banda em 1070 cm^{-1} (EB) para 1080 cm^{-1} (complexo EB-HP β CD). Este deslocamento é indicativo da formação do complexo EB-HP β CD. Essa região é característica de vibrações entre ligações C-O de ésteres, álcoois e fenóis. Devido às características da HP β CD, com cavidade hidrofóbica, é provável que a interação e formação do complexo de inclusão estejam ocorrendo com as moléculas de menor polaridade presentes no extrato. A supressão do pico em 1100 cm^{-1} , quando o extrato é complexado, indica interação entre os componentes (MANGOLIM et al., 2014). Após passar pelo processo de complexação, interações intermoleculares irão refletir em alterações nos espectros de infravermelhos, levando a mudanças no número de ondas e intensidade de picos, alargamento de banda e novas bandas de absorção, que são indicativos da formação do complexo (MOHAN et al., 2012).

Segundo Mohan et al. (2012) a espectroscopia Raman também é uma excelente ferramenta para estudar a formação de complexos de inclusão. A Figura 31 mostra o espectro FT-Raman do complexo EB-HP β CD, mistura física, EB de *P. pluviosa* e HP β CD, evidenciando que os picos referentes a ciclodextrina (HP β CD) parecem ser suprimidos pela presença do EB, tanto no espectro da mistura física simples quanto do complexo.

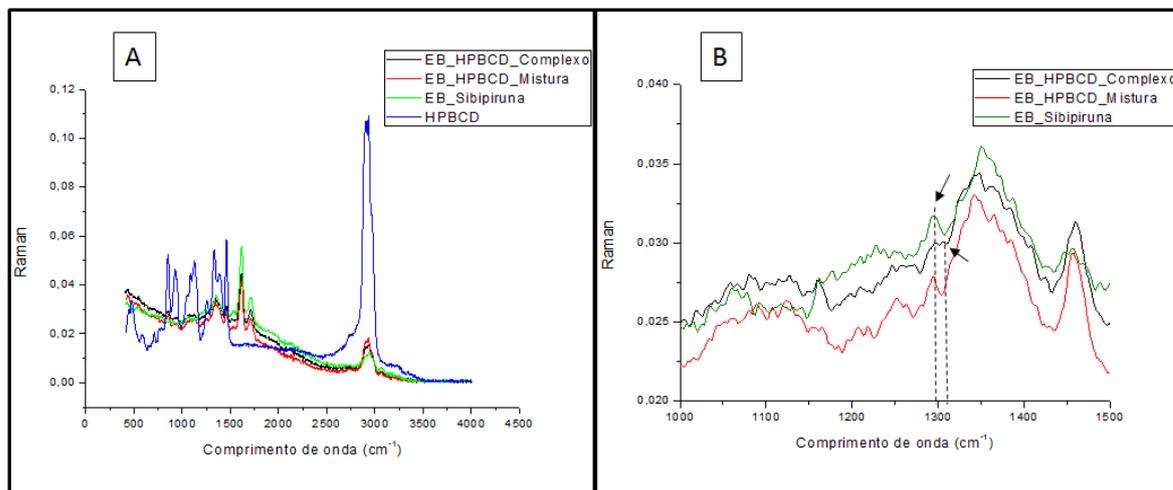


Figura 31. (A) Espectroscopia FT-Raman do complexo EB-HP β CD, mistura física de EB com HP β CD, EB de *P. pluviosa* (sibipiruna) e EB-HP β CD; (B) Ampliação de 1000 a 1500 cm^{-1} , evidenciando o aparecimento de pico.

Na Figura 31-B, é possível observar o deslocamento da banda em 1295 cm^{-1} , pertencente ao extrato. No espectro do complexo, aparece deslocado para 1300 cm^{-1} , enquanto na mistura ele permanece inalterado. As bandas nessa região são associadas a deformação axial de ligações C-O. Este deslocamento é um indicativo da formação do complexo com a HP β CD. O aparecimento de um pico em 1310 cm^{-1} no espectro do complexo sugere interações entre os componentes da formulação, visto que o mesmo pico não está presente na mistura física, relacionado a C-O. Conforme mencionado, a complexação deve ter ocorrido com as substâncias de menor polaridade presentes no extrato (MANGOLIM et al., 2014).

A presença do extrato pode ter deslocado os picos pertencentes a ciclodextrina para uma frequência mais baixa, e por isso poucos picos são visíveis na mistura e no complexo. Os espectros Raman de ciclodextrinas apresentam regiões livres de bandas que podem ser utilizadas como janelas para monitorar modos convidados relevantes (MOHAN et al., 2012).

Os principais picos do espectro de FTIR e FT-RAMAN do EB estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Principais picos observados no espectro de FTIR e FT-Raman do extrato bruto de *P. pluviosa*.

FTIR-ATR (cm ⁻¹)	FT-RAMAN (cm ⁻¹)	Relacionado
3000- 3600	3000- 3600	Vibrações de estiramento de Hidroxilas (O-H)
2859- 2930	2859- 2930	Deformação C-H
1650- 1800	1650- 1800	Deformação grupo carbonila (C=O)
1263- 1326	1263- 1326	Deformação C-O
400- 1200	400- 1200	Vibrações de deformação de C-H

O estudo da formação de complexos de extrato bruto com HPβCD já foi realizado por Hsu et al. (2013) utilizando EB de *Rheum palmatum* L. e, por Hsu, Tsai e Tsai (2014), com EB de *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. Nesses estudos, a complexação com HPβCD foi realizada para melhorar a solubilidade aquosa e a formação do complexo foi confirmada por métodos cromatográficos e espectroscópicos, comparando os resultados do EB, HPβCD, mistura física e complexo.

Promover conforto e alívio imediato da dor são as características mais vantajosas dos hidrogéis para os pacientes. O gel amorfo a base de carbopol apresenta boa aplicabilidade em tratamentos tópicos e auxilia no resfriamento das feridas, a fim de minimizar a extensão dos danos e reduzir a dor (MADAGHIELE et al., 2014). Ensaio de citotoxicidade *in vitro* realizados por Besson (2014) mostraram que o gel base de carbopol 940 e o gel base com HPβCD não apresentaram efeito citotóxico sobre eritrócitos.

Tendo em vista os resultados satisfatórios na cicatrização de feridas utilizando EB de *P. pluviosa* (BUENO et al., 2016), foi utilizado um sistema de libertação do EB por meio da complexação com HPβCD. A formação de complexos de inclusão com fármacos está entre as alternativas mais vantajosas e eficientes quando se busca melhoria nas propriedades de dissolução e biodisponibilidade dos mesmos (LYRA et al., 2010).

O EB de *P. pluviosa* cedido pelo laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito ficou armazenado em freezer e foi determinado o teor de polifenóis totais como método de controle de qualidade. Foi constatado que o teor se manteve durante esse período, apresentando valor de 26,36%±0,87 (média ± desvio padrão). Os valores de EB aproximam-se com o encontrado e padronizado por Bueno et al. (2012; 2016), que apresentou 22,7% em PT.

Para calcular a proporção a ser incorporada no gel foi realizada a determinação do teor de PT do complexo EB-HPβCD, a fim de padronizar a concentração utilizada por Bueno et al. (2016). O teor de PT encontrado para o complexo foi 16,21%±0,53 (média±desvio

padrão). Esse teor foi corrigido para o preparo da formulação, considerando o teor de metabólitos de interesse mencionado pelo mesmo autor.

Foram notadas reações de desconforto nos animais após a aplicação do gel (tratado ou controle), provavelmente pela sensação de resfriamento provocada na ferida, devido a grande quantidade de água presente e pela ação adstringente do EB. Ausência de exsudato inflamatório e edema também foram notados e formação e presença de crosta foi observada em todas as feridas, podendo ser resultante da presença de taninos, que precipitam as proteínas dos tecidos lesados, formando um revestimento protetor que favorece a sua reparação, diminuindo a permeabilidade e exsudação da ferida (MONTEIRO; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2005).

No acompanhamento macroscópico, o tratamento com gel EB-HP β CD e gel base, foi notado o fechamento da ferida, sem o desenvolvimento de borda necrótica ou secreções purulentas que podem caracterizar infecção. Besson (2014) utilizou insulina complexada com HP β CD para tratamento de feridas e observou essas mesmas características durante a avaliação. O acompanhamento macroscópico da evolução da medida da circunferência ou da área da lesão cutânea é o parâmetro muito empregado na prática clínica, por ser de baixo custo, fácil manuseio e aplicabilidade clínica (FERREIRA et al., 2008).

A Figura 32 mostra a sequência da restauração da pele em função do tempo de tratamento com gel EB-HP β CD (ferida esquerda) e controle negativo com gel base (ferida direita).

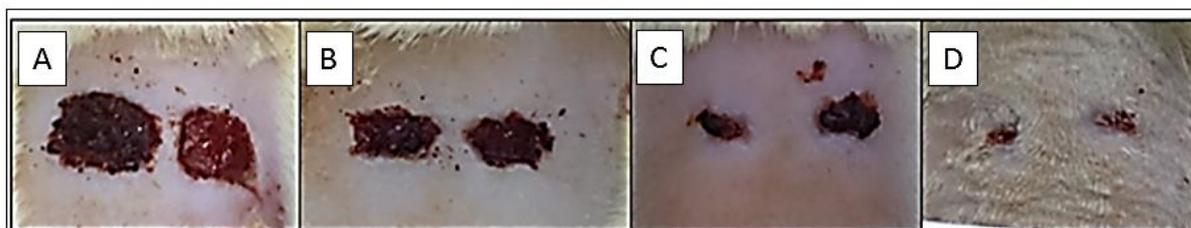


Figura 32. Fotografia da região dorsal do animal após 4 (A), 7 (B), 10 (C) e 14 (D) dias de tratamento com gel EB-HP β CD (esquerda) e gel base (direita). (Fotos: Ana Carolina Guidi, 2016).

O decalque para cálculo da área das feridas foi feito no dia da confecção das mesmas (dia zero) e no final de cada período de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias). A medida da área das feridas e o percentual de contração, referentes ao tratamento com gel EB-HP β CD estão apresentadas nas Figuras 33 e 34, respectivamente. Não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre as medidas das feridas tratadas e controle.

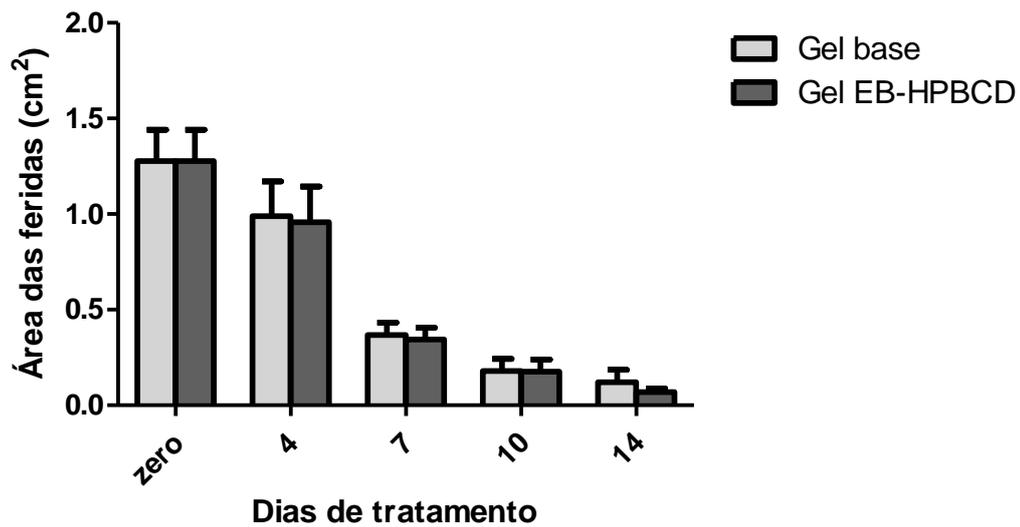


Figura 33. Valores médios da área das feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com gel EB-HPβCD e gel base após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média±desvio padrão.

Apesar das marcações serem feitas com um molde de 1 cm² para a confecção das feridas, elas tendem a sofrer uma distensão após o corte e a retirada do fragmento de pele devido a distensão provocada pela incisão transversal às linhas de Langer (COELHO et al., 1999), resultando em uma área maior, mostrada como dia zero no gráfico (Figura 33).

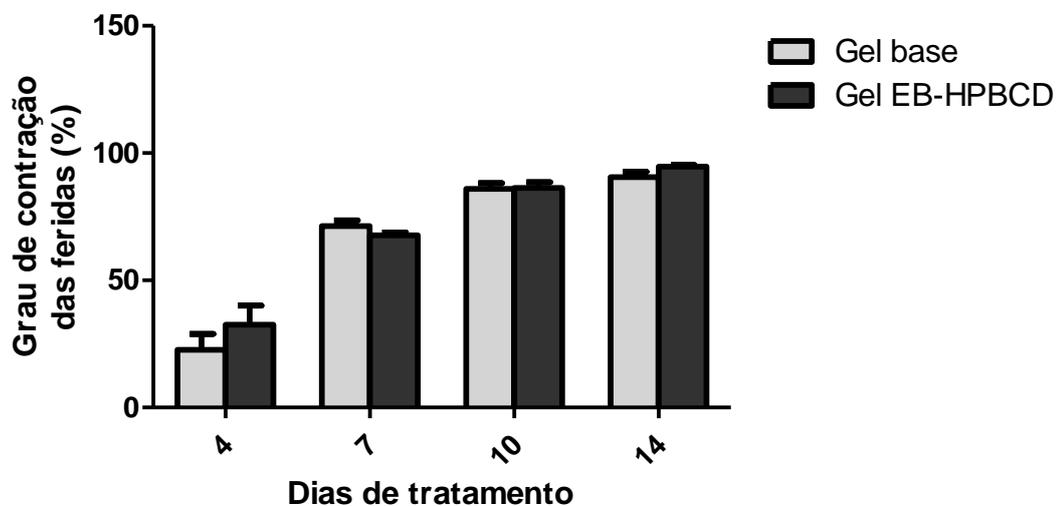


Figura 34. Percentual de contração de feridas excisionais em ratos Wistar tratadas com gel EB-HPβCD e gel base após 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Os resultados foram expressos como média±desvio padrão.

Foi possível demonstrar o decréscimo da área e a contração das feridas de forma progressiva com o passar dos dias e de maneira similar entre a ferida tratado e o controle, mostrando que não houve agravos que prejudicassem a cicatrização.

Para a avaliação da cicatrização de feridas, adotou-se o modelo de duas feridas paralelas no dorso de ratos, na altura das patas dianteiras. Essa região é escolhida, por ser uma região relativamente protegida de contaminação, pelo menor contato com fezes e com a saliva do animal. Além do que a região dorsal é escolhida por ser de menor alcance e as condições da gaiola em que o animal permanece no biotério são escolhidas de modo que evitem atrito e contaminações nas lesões. Por atingir toda a espessura da pele, essa ferida é considerada um tipo de lesão cutânea total e mimetiza uma lesão cutânea grave em que a cicatrização espontânea é sempre lenta, dessa forma, a ferida tem estímulo máximo das respostas fisiológicas, inclusive com a contração da cicatriz e epitelização central (FERREIRA et al., 2008). A área e aspecto das feridas podem ser influenciados por agressão causada pelo próprio animal, causada pelo ato de coçar a ferida e na tentativa de limpar o tratamento aplicado.

A contração da ferida é uma etapa importante do fechamento da lesão cutânea. Se essa contração for pequena, retarda o fechamento da ferida, permitindo sangramentos e infecções. O fechamento definitivo de uma ferida se deve principalmente à formação do tecido de granulação e à reepitelização (FERREIRA et al., 2008). A contração da ferida pode ser influenciada pela concentração de taninos presente na formulação. Eles promovem a cicatrização de feridas por meio de vários mecanismos celulares, principalmente devido às propriedades adstringentes (RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

As fases do processo de cicatrização e fechamento das feridas devem ocorrer a partir de uma sequência e tempo de duração. O tempo dessas fases pode ser aumentado quando se tem uma cicatrização de feridas deficiente ou uma falha, gerando feridas crônicas com atraso em uma das fases do processo cicatricial (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A cicatrização da ferida caracteriza-se, entre outros fatores, pela hemostasia, reepitelização e remodelação da matriz extracelular. A epitelização, que é o processo de renovação epitelial após a lesão, envolve a proliferação e migração das células epiteliais para o centro da ferida (RAVICHANDIRAN; MANIVANNAN, 2015).

No tratamento realizado com gel EB-HP β CD e gel base, aos 4 e 7 dias de tratamento, a área reepitelizada se manteve pequena ou inexistente, não apresentando diferença significativa no comprimento do epitélio recém-formado entre tratada e o controle (Figura 35).

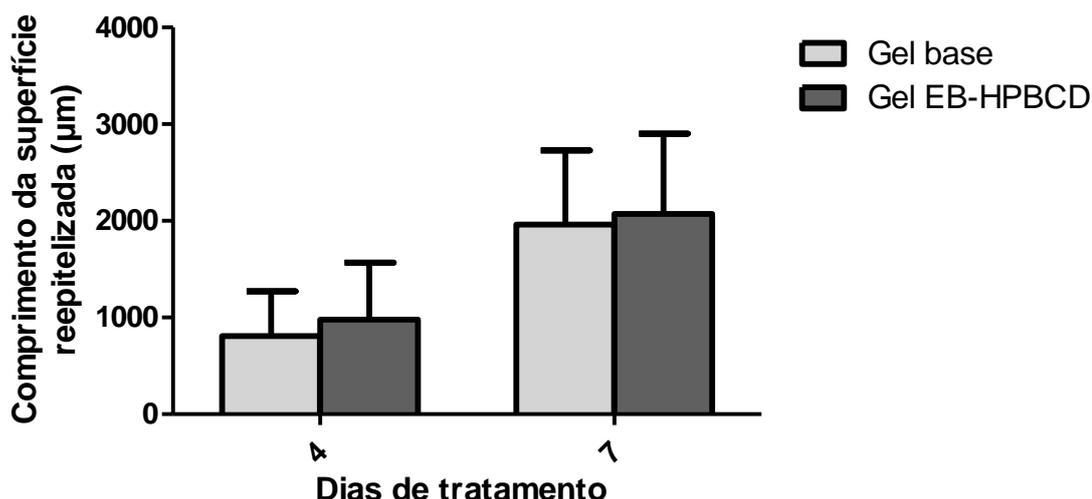


Figura 35. Gráfico representativo da média±desvio padrão da medida do comprimento da língua de reepitelização (em µm), aos 4 e 7 dias de tratamento de feridas, com gel EB-HPβCD e gel base (n=5).

No trabalho realizado por Bueno et al. (2016), em que se utilizou formulação em gel com EB de *P. pluviosa*, a medida do comprimento da área reepitelizada aos 4 dias de tratamento com o gel contendo EB apresentaram-se maior do que as tratadas com gel base. Nesse mesmo trabalho, as feridas em geral se apresentaram completamente reepitelizadas no 10º dia com aumento da espessura da epiderme neoformada.

Nos animais tratados com gel EB-HPβCD e gel base, notou-se uma diferença expressiva entre os grupos aos 10 e 14 dias quanto à reepitelização. Nas feridas que receberam tratamento com gel EB-HPβCD, a maioria estava reepitelizada após 10 e 14 dias de tratamento (60 e 80% do grupo, para 10 e 14 dias respectivamente). As feridas referentes ao controle negativo gel base, com 10 e 14 dias não tinham completado a reepitelização (80% dos grupos).

Em estudo de cicatrização realizado por Sehn et al. (2009), analisando os mesmos períodos de tratamento, também foi observado que as feridas não apresentaram fechamento completo do epitélio. As feridas apresentavam duas margens e uma restauração quase completa ocorreu após 14 dias da lesão.

A proliferação celular na epiderme neoformada foi avaliada pela contagem das células epiteliais bloqueadas em metáfase, na camada basal e supra-basal. A Figura 36 mostra o gráfico da proliferação celular no epitélio após tratamento com gel EB-HPβCD. O tratamento com gel EB-HPβCD não influenciou a proliferação celular dos queratinócitos. Nenhuma diferença foi encontrada entre as feridas tratadas até o 10º dia, comparadas com o controle negativo gel base. Em 14 dias, observou-se um aumento na proliferação celular, porém não foi superior ao controle negativo.

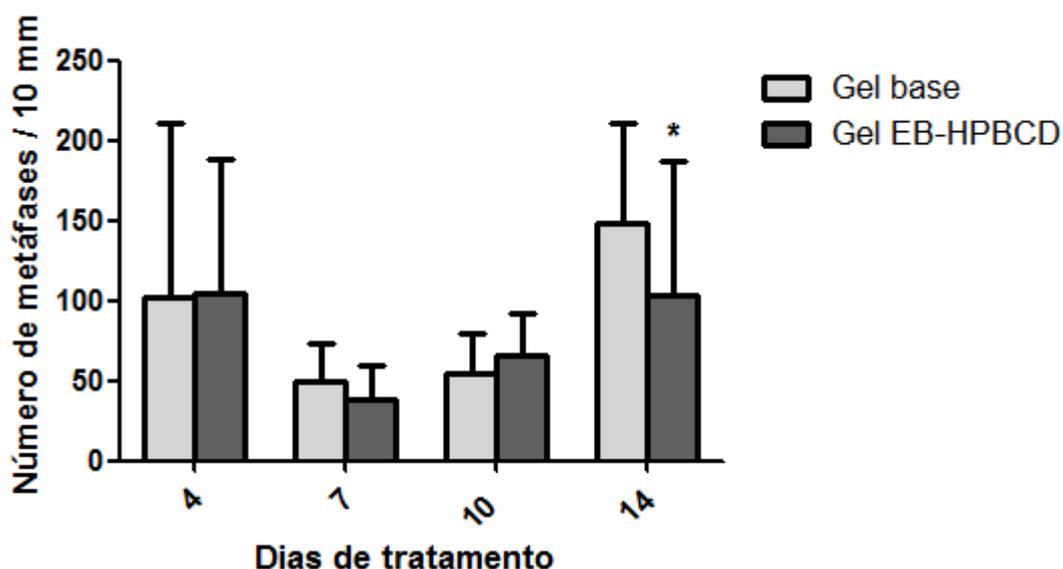


Figura 36. Gráfico representativo da média±desvio padrão do número de metáfases bloqueadas na epiderme neoformada de feridas excisionais no dorso de ratos, tratadas por 4, 7, 10 e 14 dias com gel EB-HPβCD e gel base (n=5). Análise estatística realizada por teste *t* com *(P<0,05).

A proliferação celular é um fenômeno chave no processo de reepitelização durante a cicatrização de feridas. Após a lesão, os queratinócitos das margens da ferida se multiplicam rapidamente formando um epitélio denso. Essas células, em seguida, migram para o leito da ferida, restaurando a função de barreira da epiderme (KRISHNASWAMY; KORRAPATI, 2014). A contagem das células em cortes histológicos foi possível devido a aplicação do sulfato de vincristina, um quimioterápico que interrompe a mitose na fase de metáfase (FARO et al., 2008).

A técnica de PicroSírius é baseada na birrefringência natural que o colágeno possui e permite a diferenciação dos tipos de colágeno quando visualizado por microscopia de polarização. O cálculo do índice de maturação do colágeno (Tabelas 6 e 7) evidenciou o predomínio de colágeno tipo I ou III na derme das feridas.

Tabela 6. Índice de maturação do colágeno das feridas tratadas com Gel EB-HPβCD

	Colágeno tipo I (média)	Colágeno tipo III (média)	ImaC*
4 dias	5,478	0,129	42,465
7 dias	5,684	0,582	9,766
10 dias	8,008	0,483	16,580
14 dias	8,684	0,848	10,241

*ImaC: razão entre tipo I e tipo III.

Tabela 7. Índice de maturação do colágeno das feridas que receberam controle negativo Gel base

	Colágeno tipo I (média)	Colágeno tipo III (média)	ImaC*
4 dias	5,87	0,173	33,931
7 dias	5,581	0,264	21,140
10 dias	8,545	0,429	19,918
14 dias	9,67	0,792	12,209

*ImaC: razão entre tipo I e tipo III.

Na derme, as fibras colágenas começam a se formar no tecido de granulação de forma desorganizada, com presença do colágeno tipo III no início da cicatrização, sendo posteriormente degradado e substituído pelo colágeno tipo I, mais denso e organizado (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

Assim como no estudo realizado por Pinto et al. (2015) utilizando *Stryphnodendron adstringens*, as feridas apresentaram maior quantidade de fibras de colágeno do tipo I do que o tipo III, havendo amadurecimento das fibras colágenas tipo III em tipo I em todos os períodos de tratamento, permitindo a formação de um tecido epitelial com um aspecto organizado. A Figura 37 e 38 mostram a presença do colágeno tipo III e tipo I, respectivamente.

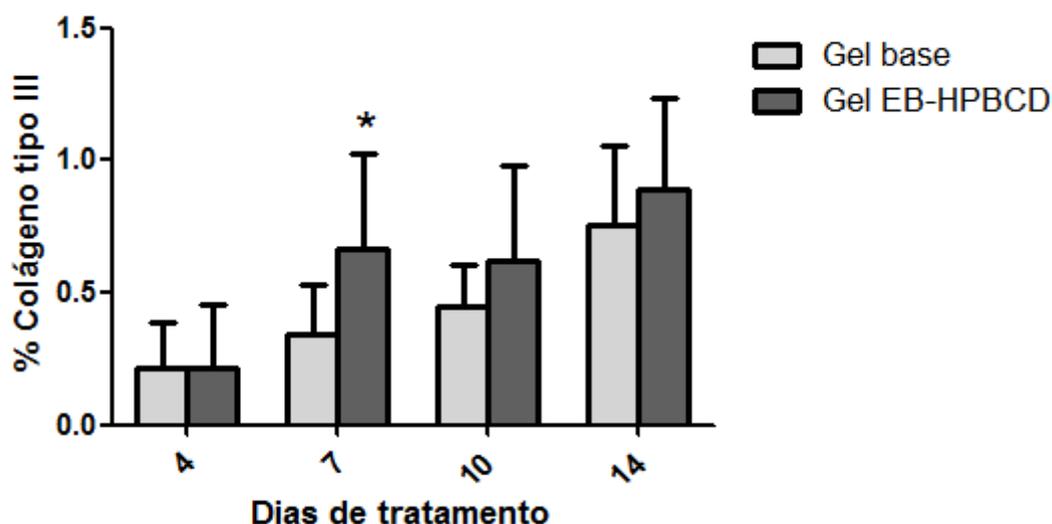


Figura 37. Gráfico representativo da média±desvio padrão da porcentagem de colágeno tipo III após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel EB-HP β CD e gel base. Análise estatística realizada por teste t com *($p < 0,05$).

Aos 7 dias (Figura 37), a porcentagem de fibras tipo III estava maior ($p > 0,05$) nas feridas que receberam o tratamento com gel EB-HP β CD quando comparadas ao Gel base.

Nos demais dias de tratamento não foi observada diferença significativa entre a quantidade de fibras colágenas.

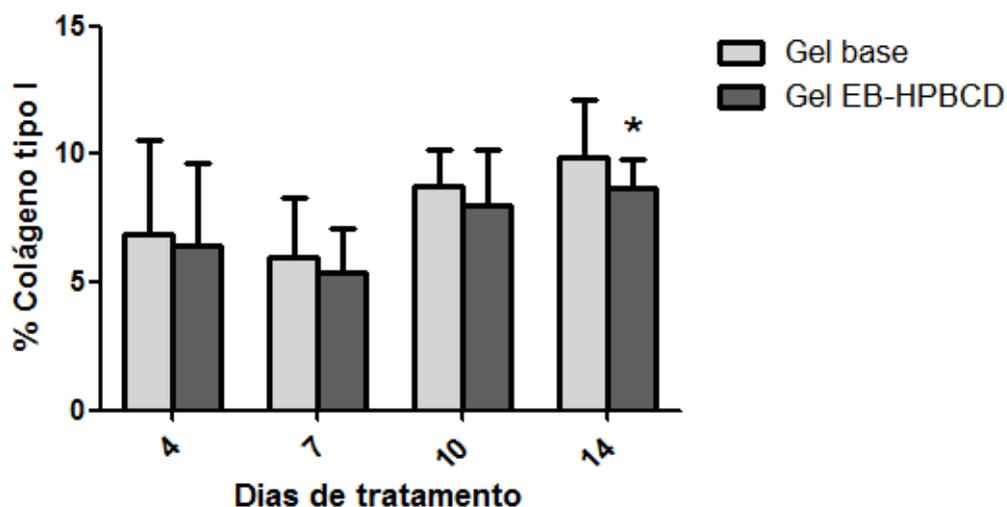


Figura 38. Gráfico representativo da média±desvio padrão da porcentagem de colágeno tipo I após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel EB-HPβCD e gel base. Análise estatística realizada por teste t com *($p < 0,05$).

Na Figura 38, é possível observar que o gel EB-HPβCD não estimulou a maturação das fibras colágenas, comparado ao gel base, em nenhum período de tratamento e uma menor formação foi observada aos 14 dias de tratamento. A maturação das fibras colágenas pode interferir a resistência da matriz extracelular.

As formulações utilizadas para tratamento de feridas devem ter uma permeabilidade mínima à corrente sanguínea, realizando os seus efeitos nas camadas da pele (PINTO et al., 2015). Para verificar a região espectral de absorção, o complexo EB-HPβCD, o gel com EB-HPβCD, o gel base e a HPβCD foram avaliados previamente, apresentados na Figura 39. As bandas presentes no espectro servem como indicadores na demonstração da penetração ou não nas feridas.

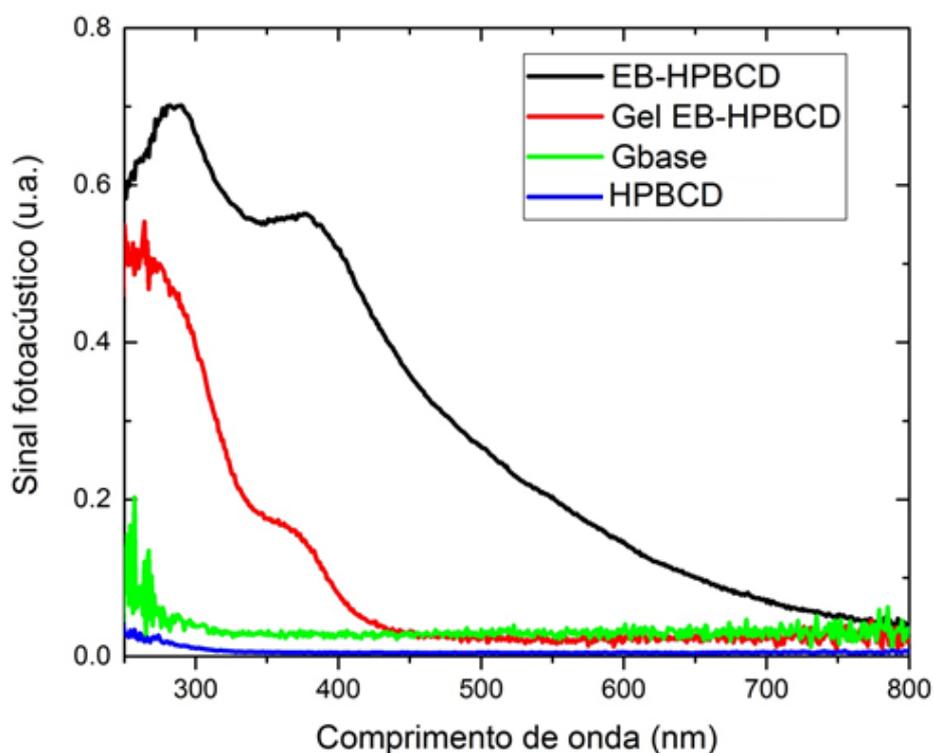


Figura 39. Espectro de absorção óptica do complexo EB-HP β CD, gel com EB-HP β CD, gel base e HP β CD, realizado por espectroscopia fotoacústica.

Na Figura 39 também pode se observar a banda do complexo EB-HP β CD presente na região de 350-400 nm. A região da banda é semelhante à apresentada na Figura 25 (Capítulo 1) como sendo a provável banda do EB, apresentando alguns sinais alterados devido à complexação. Assim como o gel base, a HP β CD em pó não apresentou leitura no espectro fotoacústico.

A técnica PAS permitiu avaliar a disseminação e distribuição do EB aplicado topicamente. O perfil de permeação cutânea foi obtido subtraindo o espectro de absorção obtido na derme do controle negativo a partir do espectro obtido para a derme tratada com gel EB-HP β CD, oferecendo o perfil de absorção resultante apenas para o EB. No tratamento com gel (Figura 40), apesar de discretas, é possível observar as bandas de absorção em 4, 7 e 14 dias de tratamento, sugerindo que atingiu a derme.

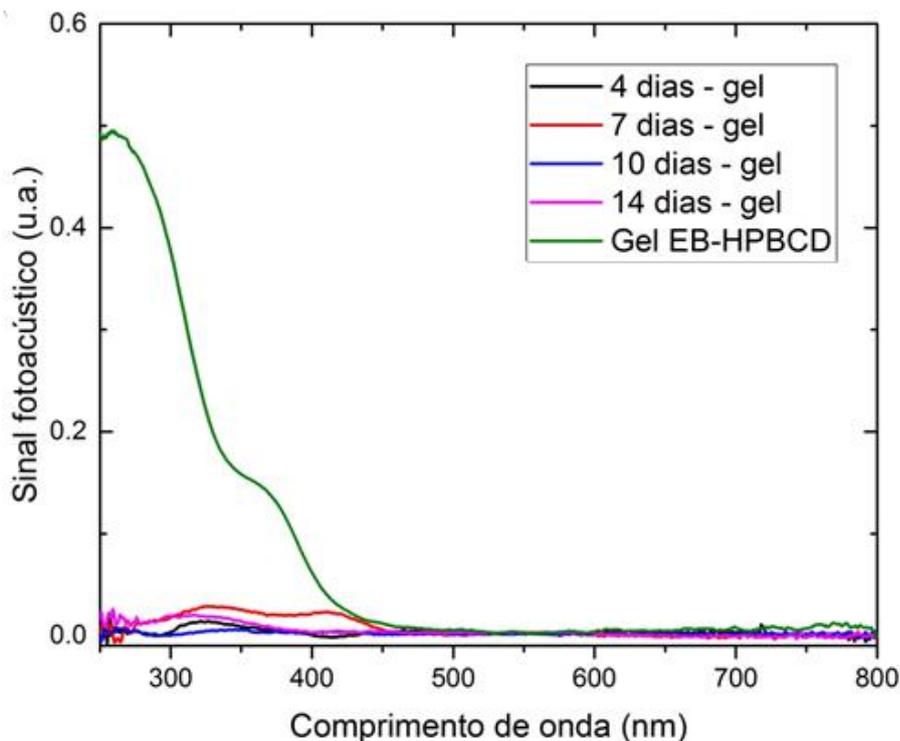


Figura 40. Diferença dos espectros de absorção do complexo EB-HP β CD, gel com EB-HP β CD, gel base e HP β CD, aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, realizado por espectroscopia fotoacústica (n=3).

Aos 10 dias a análise não mostrou a presença do EB na derme. Essa característica pode estar relacionada ao restabelecimento parcial da barreira epitelial, caracterizada pela reepitelização e queratinização da epiderme e diminuir a taxa de permeação dos fármacos (BESSION, 2014). Mesmo com a ferida completamente reepitelizada, ocorreu permeação do EB em 14 dias, que pode estar relacionado à remodelação do tecido vascular (SEHN et al., 2009).

A técnica de permeação cutânea por meio da absorção óptica em espectrofotômetro fotoacústico (PAS) permite determinar a permeação da droga presente no gel nas várias fases da cicatrização (SEHN et al., 2009). Berbicz et al. (2011) utilizaram espectroscopia fotoacústica UV-vis (PAS) para analisar a penetração *ex vivo* percutânea de benzofenona-3 complexada com CD em formulações de protetor solar.

4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se considerar que os ensaios de caracterização do complexo mostraram que a ciclodextrina foi capaz de interagir com o EB de *P. pluviosa*. Nos testes de cicatrização utilizando gel com o complexo EB-HP β CD não foi demonstrado benefícios quanto ao uso, comparado ao controle negativo gel base.

CONCLUSÃO

Até o momento, poucos estudos foram realizados envolvendo as atividades farmacológicas de *P. pluviosa* e maioria deles está relacionado às cascas da planta.

A presença do EB de *P. pluviosa* alterou as características físicas e mecânicas na formação de filmes poliméricos, diminuindo sua resistência e permeabilidade e aumentando sua capacidade de absorver água. Uma ação sinérgica na atividade cicatrizante e antibacteriana contra o *S. aureus* foi encontrada no filme polimérico contendo EB, sugerindo benefícios para tratamento de feridas.

O EB foi incorporado em HP β CD como alternativa para melhorar sua liberação e contribuir na cicatrização de feridas. A complexação do EB com HP β CD foi confirmada, sugerindo a formação de complexos de inclusão com partes mais apolares do EB. No tratamento com gel EB-HP β CD, houve permeação atingindo a derme, porém não foi demonstrado benefício na atividade cicatrizante comparado ao controle negativo gel base.

REFERÊNCIAS

- AGYARE, C.; DWOBENG, A. S.; AGYEPONG, N.; BOAKYE, Y.D.; MENSAH, K.B.; AYANDE, P.G.; ADARKWA-YIADOM M. Antimicrobial, antioxidant, and wound healing properties of *Kigelia africana* (Lam.) Beneth. and *Strophanthus hispidus* DC. **Advances In Pharmacological Sciences**, v. 2013, 2013.
- ALLEN Jr, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 716 p.
- ALMEIDA, J. F. S. L. **Preparação e Caracterização de Hidrogéis para Aplicações Biomédicas**. 2010. Tese (Doutorado) - Engenharia Química, especialidade Processos Químicos. Universidade de Coimbra Faculdade de Ciências e Tecnologia Departamento de Engenharia Química, 2010.
- AMNUAIKIT, C.; IKEUCHI, I.; OGAWARA, K.I.; HIGAKI, K.; KIMURA, T. Skin permeation of propranolol from polymeric film containing terpene enhancers for transdermal use. **International Journal of Pharmaceutics**, v.289, n.1-2, p.167-178, 2005.
- 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**, v.4, p. 90-94, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 66, 2007.
- AUDI, E.A.; TOLEDO, C.E.M.; SANTOS, F.S.; BELLANDA, P.R.; ALVES-DO-PRADO, W.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V.; SAKURAFUI, C.M.; BERSANI-AMADO, C.A.; MELLO, J.C.P. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, p. 328-333, 2004
- BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, v. 61, p.204-207, 1995.
- BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNÓZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, C.; GINSBURG, H. 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.
- 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.
- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.14, p.101–114, 2001.
- BERNARDES, L. S. C.; LANG, K. L.; PETROVICK, P. R.; SCHENKEL, E. P. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, v.1, p. 107-128.

BESSON, J. C. F. **Insulina complexada com ciclodextrinas modula a reepitelização e neovascularização de feridas cutâneas em ratos**. 2014. 51 f. Dissertação (mestrado) – Pós-graduação em Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

Britannica Academic. Fabaceae. Disponível em <<http://academic.eb.com/levels/collegiate/article/Fabaceae/105203>>, acesso em 13 de julho de 2017.

BRUN, F. G. K. **Avaliação do potencial de estoque de carbono por Sibipiruna (*Poincianella pluviosa* var. *peltophoroides* (Benth.) L.P. Queiroz) na arborização viária de Maringá - PR**. 2012. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Recursos Florestais, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

BUENO, F. G. ***Poincianella pluviosa*: estudo da viabilidade celular e proliferação de fibroblastos e queratinócitos *in vitro*, e avaliação da atividade cicatrizante em ratos diabéticos e normoglicêmicos**. 2014. 102 f. Tese (Doutorado) - Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2014.

BUENO, F. G.; MOREIRA, E. A.; MORAIS, G. R.; PACHECO, I. A.; BAESSO, M. L.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Enhanced cutaneous wound healing in vivo by standardized crude extract of *Poincianella pluviosa*. **Plos One**, v.11, p.1-13, 2016.

BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; LEITE MELLO, E. V. S.; 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.

BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; MACHARETH, M. A. D.; LOPES, G. C. L.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Development of a UV/VIS spectrophotometric method for analysis of total polyphenols from *Caesalpinia peltophoroides* Benth. **Química Nova**, v.35, p.822-826, 2012.

CAGRI, A.; USTUNOL, Z.; RYSER, E. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. **Journal Of Food Science**, v. 66, n. 6, p.865-870, 2001.

CARVALHO, F.C.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M.P.D. Plataformas bio (muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 24, p.203-213, 2014.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, p.520-535, 2007.

CHAKRABARTI, S.; BISWAS, T. K.; SEAL, T.; ROKEYA, B.; ALI, L.; KHAN, A. K. A.; NAHAR, N.; MOSIHUZZAMAN, N.; 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 Complementary and Alternative Medicine**, v.11, p.1-10, 2011.

CHOPDA, M.Z.; MAHAJAN, R.T. Wound healing plants of Jalgaon district of Maharashtra State, India. **Ethnobotanical Leaflets**, v.13, p.1-32, 2009.

COELHO, M. C. O. C. CARRAZONI, P. G.; MONTEIRO, V. L. C.; MELO, F.A.D.; MOTA, R. A.; TENÓRIO FILHO, F. Biopolímero produzido a partir da cana-de-açúcar para cicatrização cutânea. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, supl.1, p.11-13, 2002.

COELHO, M. C. O.; REZENDE, C. M. F.; TENORIO, A. P. M. Contração de feridas após cobertura com substitutos temporários de pele. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 297-303, 1999.

CORREA-NETO, M. P.; CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; MATIAS, J. E. F. Efeito da suplementação dietética de arginina na cicatrização das anastomoses colônicas em ratos. **ABCD, Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 7-14, 2009.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. 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. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.91-98, 2001.

DE PAULA, D.; OLIVEIRA, D. C. R.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancing effect of modified beta-cyclodextrins on in vitro skin permeation of estradiol. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, p.111-120, 2007.

DESHMANE, S.; CHANNAWAR, M.; CHANDEWAR, A.; JOSHI, U.; BIYANI, K. Chitosan based sustained release mucoadhesive buccal patches containing verapamil HCL. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.1, p.216-229, 2009.

DIAS, A. M. A.; REY-RICO, A.; OLIVEIRA, R. A.; MARCENEIRO, S.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; JUNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucatá (*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 diterpenoides from *Caesalpinia benthamiana*. **Phytochemistry**, v.68, p.1436-1441, 2007.

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.1-8, 2008.

FEBRAFAR, Federação Brasileira das Redes Associativistas e Independentes de Farmácias. Disponível em: < <http://febrafar.com.br/febrafar-fitomedicamentos-farmacias/>>. Acesso em 15 de set. de 2017.

FERREIRA, A. S.; BARBIERI, C. H.; MAZZER, N.; CAMPOS, A. D.; MENDONÇA, A. C. Mensuração de área de cicatrização por planimetria após aplicação do ultrassom de baixa intensidade em pele de rato. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v.12, p.351-358, 2008.

Flora do Brasil 2020 em construção. *Fabaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB109778>>. Acesso em: 10 Mai. 2017.

FLORES, Y.; VILA, J.; ALMANZA, G.R. Secondary metabolites from *Caesalpinia pluviosa*. **Revista Boliviana de Química**, v.23, p.1-10, 2006.

GAGNON, E.; LEWIS, G.P.; SOLANGE SOTUYO, J.; HUGHES, C.E. A molecular phylogeny of *Caesalpinia* sensu lato: Increased sampling reveals new insights and more genera than expected. **South African Journal Of Botany**, v. 89, p.111-127, 2013.

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.

GELATTI, L. C. et al. Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 4, p. 458-460, 2009.

GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A. Physical properties of edible modified starch/carboxymethyl cellulose films. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p.697-702, 2010.

HADDAD, M. C. L.; BRUSCHI, L. C.; MARTINS, E. A. P. Influência do açúcar no processo de cicatrização de incisões cirúrgicas infectadas. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.8, n.1, p.57-65, 2000.

HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E., KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 51, p. 29-31, 1989.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.

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.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p.18-23, 2012.

HSU, C.; TSAI, F.; TSAI, Y. Inhibitory effect of *Angelica sinensis* extract in the presence of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p.115-122, 2014.

HSU, C.; YU, S. C.; TSAI, Y. Enhancement of rhubarb extract solubility and bioactivity by 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 2, p.1422-1429, 2013.

HSU, F.; HUANG, W. J.; LEE, M. H.; LU, H. J.; HOU, W. C.; LIN, M. H. 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.

ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; REGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina**, v.89, p.125-131, 2010.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**: texto e atlas, 12^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.

KALAUNI, S.K.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A. H.; LINN, T. Z.; KADOTA, S. Cassane- and norcassane-typediterpenes of *Caesalpinia crista* from Myanmar. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1859-1863, 2004.

KANIG, J.L.; GOODMAN, H. Evaluative procedures for film-forming materials used in pharmaceutical applications. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.51, n.1, p.77-83, 1962.

KATO, C. G.; SA-NAKANISHI, A. B.; GUIDI, A. C.; MELLO, J. C. P.; PERALTA, R. M. Efeitos inibitórios in vitro e in vivo do extrato bruto da casca de Sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) rico em tanino hidrolisável na atividade da amilase pancreática. In: 6^o COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2016, Cascavel. **Anais do 6^o COSIMP**, v. 6, 2016b.

KATO, C. G.; GUIDI, A. C.; BUENO, F. G. ; MELLO, J. C. P.; PERALTA, R. M. Efeito inibitório das frações aquosa e acetato de etila da casca de sibipiruna (*Poincianella pluviosa*) na atividade da α -amilase pancreática. In: 6^o COSIMP - Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 2016, Cascavel. **Anais do 6^o COSIMP**, v. 6, 2016a.

KAYANO, A. C.; LOPES, S. C. P.; BUENO, F. G.; CABRAL, E. C.; SOUZA-NEIRAS, W. C.; YAMAUCHI, L. M.; FOGGIO, M. A.; EBERLIN, M. N.; MELLO, J. C. P.; COSTA, F. T. M. *In vitro* and *in vivo* assessment of the anti-malarial activity of *Caesalpinia pluviosa*. **Malaria Journal**, v.10, p.112, 2011.

KIM, K.; YU, H.; JEONG, S.; CHA, J.; KIM, S.; YOU, Y. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.81-87, 2004.

KIM, K.; YU, H.; JEONG, S.; CHA, J.; KIM, S.; YOU, Y. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.81-87, 2004.

KREIS, W.; MUNKERT, J.; PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundário. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: do Produto Natural ao Medicamento. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, v.1, p. 147-166.

KRISHNASWAMY, V.R.; KORRAPATI, P.S. Role of Dermatopontin in re-epithelialization: Implications on keratinocyte migration and proliferation. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, 9, 2014.

LOPES, D. T. **Preparação e caracterização de filmes poliméricos mucodesivos com potencial de uso para o tratamento da mucosite oral aguda induzida por quimioterapia e radioterapia**. 2013. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2013.

LOPES, G. C.; SANCHES A. C. C.; NAKAMURA, C. V.; 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.

LOWY, F.D. Staphylococcus aureus Infections. **New England Journal Of Medicine**, v. 339, n. 8, p.520-532, 1998.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, p.117-124, 2010.

MADAGHIELE, M; DIMITRI, C.; SANNINO, A.; AMBROSIO, L. Polymeric hydrogels for burn wound care: advanced skin wound dressings and regenerative templates. **Burns & Trauma**, v. 2, n. 4, p.153-161, 2014.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.393-410, 2003a.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.78, p.525-542, 2003b.

MANGOLIM, C. S.; MORIWAKI, C.; NOGUEIRA, A. C.; SATO, F.; BAESSO, M. L.; MEDINA NETO, A.; MATIOLI, G. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. **Food Chemistry**, v.153, p.361-370, 2014.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v.38, n.1, p.33-54, 2002.

MARTUCCI, J. F.; GENDE, L.B.; NEIRA, L.M.; RUSECKAITE, R.A. Oregano and lavender essential oils as antioxidant and antimicrobial additives of biogenic gelatin films. **Industrial Crops and Products**, v. 71, p.205-213, 2015.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, v.1, p. 235-248.

MELO, J. O.; PEDROCHI, F.; BAESSO, M. L.; HERNANDES, L.; TRUITI, M. C. T.; BARONI, S.; BERSANI, C. A. Evidence of deep percutaneous penetration associated with anti-inflammatory activity of topically applied *Helicteres gardneriana* extract: a photoacoustic spectroscopy study. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p.331-336, 2010.

MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, p.257-262, 2009.

MOHAN, P.R.K.; SREELAKSHMI, G.; MURALEEDHARAN, C.V.; JOSEPH, R. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 62, p.77-84, 2012.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v.28, p.892-896, 2005.

MORIWAKI, C.; MAZZER, C.; PAZZETTO, R.; MATIOLI, G. Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferase para produção de ciclodextrina. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p.2360-2368, 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia medica**. 7. Ed. Rio de Janeiro, ELSEVIER, 2014.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NESSEEM, D.I.; EID, S.F.; EL-HOUSENY, S.S. Development of novel transdermal self-adhesive films for tenoxicam, an anti-inflammatory drug. **Life Science**, v.89, n 13-14, p.430-438, 2011.

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.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D. C.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, vol. 6, p. 70-83, 2009.

OVALLE, W. K.; NAHIRNEY, P. C. **NETTER - Bases da Histologia**. 1ª edição, Elsevier. 2008.

PEDROCHI, F. **Estudo de sistemas biológicos “in vitro” e “in vivo” utilizando a espectroscopia fotoacústica**. 2004. 96 f. Dissertação (mestrado) – Pós-graduação em Física, Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

PERERA, L. M. S.; PILOTO, J.; CANELSOTA, D.; PELZER, L.; MANCEBO, B. Further pharmacological evidence supporting the development of an antiulcerogenic drug based on *Hizophora mangle* l. aqueous extract. HPLC method proposed for determining a chemical marker. **Open Access Library Journal**, v.03, p.1-16, 2016.

PINTO, S.; BUENO, F. G.; PANIZZON, G. P.; MORAIS, G.; DOS SANTOS, P. V.; BAESSO M. L.; LEITE-MELLO, E. V.; MELLO, J. C. *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 81, n. 12/13, p.1090-1096, 2015.

QUEIROZ, L.P. New combinations in *Libidibia* (DC.) Schltdl. and *Poincianella* Britton & Rose (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Neodiversity**, v. 5, n. 1, p.11-12, 2010.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.2, p. 9-16, 2009.

RAVICHANDIRAN, V.; MANIVANNAN, S. Wound healing potential of transdermal patches containing bioactive fraction from the bark of *Ficus racemosa*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.7, p.326-332. 2015.

ROCHA, J. C. B.; PEDROCHI, F.; HERNANDES, L.; MELLO, J. C. P.; BAESSO, M. L. *Ex vivo* evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v.587, p.132-136, 2007.

RODRIGO, G. C.; ALMANZA, G. R.; AKESSON, B.; ÅKESSON, B.; DUAN, R. D. Antiproliferative activity of extracts of some Bolivian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.4, p.2204-2210, 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.

SALTÃO, R.; VEIGA, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Coimbra, v.37, p.1-18, 2001.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L.A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAYANJALI, S.; GHANBARZADEH, B.; GHIASSIFAR, S. Evaluation of antimicrobial and physical properties of edible film based on carboxymethyl cellulose containing potassium sorbate on some mycotoxigenic *Aspergillus* species in fresh pistachios. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 44, n. 4, p.1133-1138, maio 2011.

SEHN, E. **Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos**. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-graduação em Física, Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SEHN, E.; HERNADES, I.; 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, n. 1, p.115-120, 2009.

SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; MEHTA, P.; VYAS, S. P. Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.125, p.252-256, 2009.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007.

SOUZA, T.M.; SEVERI, J.A.; SILVA, V.Y.A.; SANTOS, E.; PIETRO, R.C.L.R. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n.2, p.221-226, 2007.

TOLEDO, L. A. S.; BAVATO, M. I.; ROSSETO, H. C.; CORTESI, R.; BRUSCHI, M. L. Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 847-859, 2015.

TOLEDO, L. A. S.; ROSSETO, H. C.; RAVANI, L.; CORTESI, R.; BRUSCHI, M. L. Waste material of propolis as a film forming agent intended to modify the metronidazole release: preparation and characterization. **Current Drug Delivery**, v. 13, n. 7, p.1152-1164, 2016.

TOZZI, A.M.G.A. Caesalpinioideae. In: Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 8, p. 22-83, 2016.

TSALA, D. E. JOSEPH, M. N.; HEROYINE, L. T.; SOLOMON, H. In vivo wound healing effect of water extract of *Stereospermum kunthianum* stem-bark. **Journal of Medicinal Herbs and Ethnomedicine**, v. 2, n. 1, p.1-6, 2016.

VALENTINI, S. R.; NOGUEIRA, A. C.; FENELON, V. C.; SATO, F.; MEDINA, A. N.; SANTANA, R. G.; BAESSO, M. L.; MATIOLI, G. Insulin complexation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: Spectroscopic evaluation of molecular inclusion and use of the complex in gel for healing of pressure ulcers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.490, p.229-239, 2015.

VENTURINI, C. G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, W. G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v.31, p.360-368, 2008.

YOUNG, B.; LOWE J. S.; STEVENS, A.; HEATH, J. W. **Wheater: histologia funcional – texto e atlas em cores**. 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier – Churchill Livingstone. 2007.

YUAN, G.; LV, H.; YANG, B.; CHEN, X.; SUN, H. Physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan films containing carvacrol and pomegranate peel extract. **Molecules**, v. 20, n. 6, p.11034-11045, 2015.

ZANIN, J. L. B.; MASSONI, A. M.; SANTOS, A. M. H.; FREITAS, A. G. C.; NIERO, B. E. L. O.; SCHEFER, C. R. R.; LAGO, B. J. H. G.; IONTAE, D. M.; SOARES, M. G. Caesalpinioflavone, a new cytotoxic biflavonoid isolated from *Caesalpinia pluviosa* var. *peltophoroides*. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v. 26, p.804-809, 2015.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química Nova**, v.33, p.1421-1428, 2010.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado CEUA-UEM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de metodologia em eletroforese capilar para quantificação in vivo da proteína VEGF em feridas tratadas com Poincianella pluviosa e avaliação da atividade cicatrizante com aplicação de ciclodextrina", protocolado sob o CEUA nº 9861231115, sob a responsabilidade de **João Carlos Palazzo de Mello e equipe; Aline Cavalcante Lenartowicz ; Ana Carolina Guidi; Eneri Vieira de Souza Leite Mello; Gustavo Cesar Abreu Soares; João Carlos Palazzo de Mello** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 04/12/2015.

We certify that the proposal "Methodology development in capillary electrophoresis for VEGF protein in vivo quantification in wounds treated with Poincianella pluviosa and evaluation of the healing activity with cyclodextrin application", utilizing 56 Heterogenics rats (56 males), protocol number CEUA 9861231115, under the responsibility of **João Carlos Palazzo de Mello and team; Aline Cavalcante Lenartowicz ; Ana Carolina Guidi; Eneri Vieira de Souza Leite Mello; Gustavo Cesar Abreu Soares; João Carlos Palazzo de Mello** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 12/04/2015.

Vigência da Proposta: de 01/2016 a 06/2017

Área: Ciências Farmacêuticas

Procedência: Biotério Central da UEM

Espécie: Ratos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 60 a 60 dias

N: 56

Linhagem: Wistar

Peso: 250 a 250 g

Resumo: Feridas representam impacto econômico sobre a saúde, sendo comum a aplicação tópica de preparações à base de plantas. Poincianella pluviosa vem sendo estudada e já apresenta ação comprovada para tratamento de disenteria, malária e cicatrização de feridas. Sistemas carreadores de fármacos, como as ciclodextrinas (CD), melhoram a absorção e eficácia de fármacos. Sua estrutura permite formar complexos com moléculas, alterando características físico-químicas e biodisponibilidade. Também é importante elucidar os mecanismos pelos quais os fármacos exercem sua ação. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é uma proteína expressa durante a cicatrização, envolvida na angiogênese. Para a avaliação de proteínas, métodos eletroforéticos podem ser aplicados. O método clássico apresenta limitações e sua substituição por novas metodologias são estudadas. O objetivo do trabalho é desenvolver uma metodologia analítica em eletroforese capilar (EC), para quantificar VEGF e avaliar o processo de cicatrização de feridas tratadas com extrato bruto (EB) de P. pluviosa complexado com ciclodextrina (EB+CD), comparando com resultados de estudos anteriores. Para avaliar VEGF por EC, serão utilizados 24 ratos Wistar, divididos em grupos de acordo com o período de tratamento (4, 7, 10 e 14 dias). Serão feitas duas feridas no dorso, uma será tratada com gel contendo EB ou EB+CD e a outra com gel base. Após os períodos de tratamento, os fragmentos de pele serão processados para extração das proteínas. Serão determinadas as condições para quantificação de VEGF e o método será otimizado e validado. Para avaliar a cicatrização com EB+CD, 32 animais (grupos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento) serão tratados com gel contendo EB+CD e gel base. Após o tratamento, os fragmentos de pele serão removidos para análise de permeação cutânea e análise histológica (re-epitelização, número de metáfases e quantificação das fibras colágenas). Os resultados serão avaliados por análise estatística. Espera-se comprovar a ação do complexo com ciclodextrina, contribuindo para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas e o desenvolvimento de metodologia adequada em EC com resultados confiáveis e reprodutíveis, contribuindo para a elucidação de mecanismo de ação de fármacos.

Maringá, 06 de março de 2016



Comissão de Ética no Uso de Animais

da *Universidade Estadual de Maringá*

Profa. Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá

ANEXO B – Parecer consubstanciado CEUA-UEM



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

Maringá, 06 de junho de 2016
CEUA N 9861231115

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: João Carlos Palazzo De Mello
Área: Ciências Farmacêuticas
João Carlos Palazzo De Mello (orientador)

Título do projeto: "Desenvolvimento de metodologia em eletroforese capilar para quantificação in vivo da proteína VEGF em feridas tratadas com Poincianella pluviosa e avaliação da atividade cicatrizante com aplicação de ciclodextrina".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UEM

Resumo apresentado pelo pesquisador: "A Poincianella pluviosa possui ação comprovada para tratamento de disenteria, malária e cicatrização de feridas. O objetivo do trabalho é avaliar o processo de cicatrização de feridas cutâneas tratadas com filmes poliméricos contendo extrato bruto (EB) de P. pluviosa. Para isso, serão utilizados 32 ratos, divididos em 4 grupos de 8 animais, sendo que 5 serão para análise histológica e 3 serão para análise da permeação cutânea em espectroscopia fotoacústica (PAS). A metodologia para confecção das feridas, tratamento e análise será igual à descrita no projeto inicial. Serão feitas duas feridas no dorso dos animais, uma delas será tratada com filme polimérico contendo EB e a outra com filme sem extrato (controle). Os animais receberão tratamento tópico diário durante 4, 7, 10 e 14 dias. Os filmes poliméricos serão preparados a partir de um gel de carboximetilcelulose 2% e incorporado 1% de EB de P. pluviosa. Esta mistura será colocada em um molde de espessura fixa, e levada à estufa (36o C) por 24h. Após a secagem, os filmes serão cortados em tamanho que corresponda à área da ferida. Após o tratamento, os animais serão eutanasiados seguindo o protocolo já descrito e os fragmentos de pele serão removidos para as análises. Os dados serão apresentados como média \pm desvio padrão, utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas serão determinadas pelo teste de Tukey, para resultados paramétricos e Mann-Whitney, para resultados não paramétricos, considerando $p < 0,05$ como critério de significância. Espera-se comprovar a ação do filme polimérico contendo extrato P. pluviosa, comparando com o tratamento já realizado com o gel contendo o mesmo extrato. O filme pode apresentar maior aderência à pele, facilitando a liberação do extrato e reduzindo o tempo de cicatrização, e assim, contribuindo para o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas como alternativa de tratamento e conforto para o paciente.".

Comentário da CEUA: "A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEM), na sua reunião de 02/06/2016, APROVOU os procedimentos éticos apresentados neste Protocolo, visto que a metodologia proposta é compatível com a legislação pertinente à ética no uso de animais na experimentação, na forma da Lei no 11.794/08, Decreto 6.899/09, Resolução Normativa nº 01/2010 [] CONCEA e complementares, Lei Estadual no 14.037/03, Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos [] DBCA (portaria nº 596 [] CONCEA - de 25/junho/2013, disponível no endereço <http://www.ppg.uem.br/index.php/etica-biosseguranca/ceua>) e Resolução UEM nº 004/2016-CEP, vez que não se constata óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos experimentais nos moldes propostos pelo(a) pesquisador(a).".

Prof. Dra. Vilma Aparecida Ferreira de Godoi
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Maringá