



**LEILA SERVAT MEDINA**

***Arrabidaea chica* Verlot: Formulações de  
liberação sustentada para aplicação em  
úlceras de mucosa e pele**

**Piracicaba**

**2014**



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

**Leila Servat Medina**

***Arrabidaea chica* Verlot: Formulações de liberação  
sustentada para aplicação em úlceras de mucosa e pele**

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

Orientadora: Profa. Dra. Mary Ann Foglio.

Co-Orientadores: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Prof. Dr. Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pela aluna Leila Servat Medina e orientada pela Profa. Dra. Mary Ann Foglio

**Piracicaba**

**2014**

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

Se69a Servat-Medina, Leila, 1982-  
*Arrabidaea chica* Verlot : formulações de liberação sustentada para aplicação em úlceras de mucosa e pele / Leila Servat Medina. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Mary Ann Foglio.  
Coorientador: João Ernesto de Carvalho e Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. *Arrabidaea chica*. 2. Nanopartículas. 3. Hidrogel. 4. Cicatrização de feridas. I. Foglio, Mary Ann. II. Carvalho, João Ernesto de. III. Rodrigues, Rodney Alexandre Ferreira. IV. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. V. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** *Arrabidaea chica* Verlot : controled release fomulations with applications for ulcer lesions

**Palavras-chave em inglês:**

*Arrabidaea chica*

Nanopaticles

Hydrogel

Wound healing

**Área de concentração:** Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica

**Titulação:** Doutora em Odontologia

**Banca examinadora:**

Mary Ann Foglio [Orientador]

Angela Regina Araujo

Maria Helena Sarragiotto

Fernando Antonio Cabral

Patrícia Corrêa Dias

**Data de defesa:** 28-02-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Odontologia

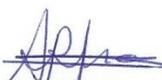


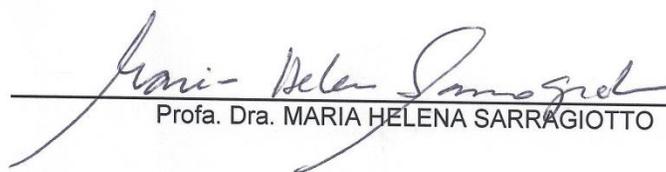
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 28 de Fevereiro de 2014, considerou a candidata LEILA SERVAT MEDINA aprovada.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. MARY ANN FOGLIO

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. ANGELA REGINA ARAUJO

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. MARIA HELENA SARRAGIOTTO

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. FERNANDO ANTONIO CABRAL

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. PATRÍCIA CORRÊA DIAS

## RESUMO

A espécie *Arrabidaea chica*, conhecida como crajiru, faz parte da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Estudos desenvolvidos no CPQBA-UNICAMP comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* possui ação cicatrizante, antiulcerogênica e antioxidante. Este trabalho teve como objetivo delinear e avaliar sistemas farmacêuticos contendo o extrato padronizado de *A. chica*, para o tratamento de lesões de pele e mucosa. Foram obtidas nanopartículas de quitosana pelo método de reticulação. Dentre os parâmetros avaliados estipulou-se como melhores condições para produção de nanopartículas o emprego do tripolifosfato como reticulante nas proporções de 1:5 (massa) e 1:10 (volume) em relação a quitosana. Para as aplicações tópicas, as nanopartículas de *A. chica* foram veiculadas em esponjas, filmes absorvíveis de álcool polivinílico ou hidrogéis de ácido hialurônico. Estudos *in vitro* utilizando fibroblastos humanos demonstraram a atividade das nanopartículas de *A. chica* na proliferação e migração celular. Estudos *in vivo* empregando ratos e hamsters forneceram parâmetros para padronização de modelos de mucosite gastrointestinal e oral, respectivamente. A atividade das nanopartículas em úlceras de mucosa foi evidenciada nos modelos de úlcera gástrica induzidas por etanol ou indometacina, com redução das lesões ulcerativas de 76% e 58%, respectivamente, quando comparadas ao grupo controle negativo. O efeito cicatrizante de filmes absorvíveis ou hidrogéis incorporados com as nanopartículas de *A. chica* foram avaliados em modelo de úlcera dérmica em ratos. A contração da área da ferida chegou a 79% nos animais tratados com os filmes carregados com 0,5 mg de nanopartículas e 85% de contração nos animais que receberam hidrogéis contendo 1,5 mg de nanopartículas. Os resultados demonstraram que a produção de nanopartículas de *A. chica* e dos sistemas de transporte foi viável, caracterizando-se como uma alternativa válida para a veiculação do extrato de *A. chica*, além de propiciar a redução da dose necessária para a atividade.

**Palavras chave:** *Arrabidaea chica*. Nanopartículas. Hidrogel. Cicatrização.

## ABSTRACT

*Arrabidaea chica*, known as crajiru, is part of the national Unified Health System from Brazil (SUS) list of medicinal plants of interest. Studies conducted at CPQBA-UNICAMP showed that the species demonstrated wound healing, antiulcerogenic and antioxidant properties. This study aimed the evaluation of pharmaceutical systems employing standardized extract for treatment of skin and mucosal wounds. Chitosan nanoparticles were obtained using the crosslink method. The protocol that showed best conditions to produce nanoparticles, among those tested, used tripolyphosphate as a cross-linker, in 1:5 (mass) and 1:10 (volume) proportions compared to chitosan. For topical applications, *A. chica* nanoparticles were incorporated into sponges, polyvinyl alcohol absorbable films or hyaluronic acid hydrogels. *In vitro* studies with human fibroblasts showed the activity of *A. chica* nanoparticles in cell proliferation and migration. *In vivo* studies with rats and hamsters provided the standardization parameters for gastrointestinal and mucositis models respectively. *A. chica* nanoparticles demonstrated inhibition of mucosal ulcerations of gastric ulcer induced by ethanol or indomethacin models, improving ulcerative wound healing by 76% and by 58% respectively, in comparison to negative control groups. Those same samples incorporated into absorbable films or hydrogels were evaluated on wound healing activity using a rat dermal ulcer model. Animals treated with loaded films with 0.5 mg of nanoparticles achieved 79% in wound area contraction, whereas animals receiving hydrogels containing 1.5 mg of nanoparticles achieved 85%. These results showed that the production of *A. chica* nanoparticles and transport systems were practicable, demonstrating to be a valid alternative for incorporation of *A. chica* extracts, allowing decrease of the required dose to achieve the desired effect.

Key words: *Arrabidaea chica*. Nanoparticles. Hydrogel. Wound healing.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	xv
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	xvii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	3
2.1 <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot .....	3
2.2 Biomateriais e agentes de entrecruzamento.....	8
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	17
3.1 Proposição Geral .....	17
3.2 Proposições Específicas.....	17
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
4.1 Estudo Fitoquímico .....	19
4.1.1 Obtenção do material vegetal.....	19
4.1.2 Secagem e moagem do material vegetal.....	19
4.1.3 Preparo dos Extratos Vegetais .....	20
4.1.4 Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	22
4.1.4.1 Condições cromatográficas .....	22
4.1.5 Isolamento do padrão carajurina .....	23
4.2 Estudo tecnológico.....	24
4.2.1 Nanopartículas de quitosana e encapsulamento do extrato de <i>A.</i> <i>chica</i> .....	24
4.2.2 Esponjas.....	25
4.2.3 Filmes absorvíveis .....	25
4.2.4 Hidrogel .....	25
4.2.5 Caracterização das formulações .....	26

4.2.5.1 Dispersão de luz dinâmica - <i>Nanosizer</i> .....	26
4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	27
4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	27
4.2.5.4 Microscopia por força atômica (MFA).....	27
4.2.5.5 Estudo de hidratação dos filmes.....	27
4.3 Estudo farmacológico – ensaios <i>in vitro</i> .....	28
4.3.1 Testes de viabilidade celular.....	28
4.3.2 Ensaio Migração Celular .....	29
4.4 Estudo farmacológico – ensaios <i>in vivo</i> .....	30
4.4.1 Mucosite gastrointestinal .....	31
4.4.1.1 Modelo experimental.....	31
4.4.1.2 Grupos experimentais (8 animais cada).....	31
4.4.1.3 Parâmetros avaliados para o estudo da prevenção da mucosite gastrointestinal induzida por 5-fluorouracil.....	31
4.4.2 Mucosite oral.....	32
4.4.2.1 Modelo experimental.....	32
4.4.2.2 Grupos experimentais (10 animais cada):.....	34
4.4.2.3 Parâmetros avaliados para o estudo do efeito na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil.....	34
4.4.3 Úlcera Induzida por etanol/HCL.....	36
4.4.4 Úlcera induzida por indometacina .....	37
4.4.5 Atividade cicatrizante em úlceras de pele .....	38
4.5 Análise estatística .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
5.1 Etapa fitoquímica .....	41
5.1.1 Produção dos extratos padronizados .....	41

5.1.2	Processo de secagem em <i>Spray Dryer</i> .....	42
5.1.3	Monitoramento químico.....	43
5.2	Etapa tecnológica .....	45
5.2.1	Partículas de quitosana.....	45
5.2.1.1	Partículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (TPP) .....	45
5.2.2	Obtenção de nanopartículas com extrato de <i>A. chica</i> .....	46
5.2.3	Partículas de quitosana reticuladas com genipina .....	48
5.3	Sistemas de veiculação .....	49
5.3.1	Esponjas.....	49
5.3.2	Filmes de álcool polivinílico (PVA).....	49
5.3.3	Hidrogel .....	51
5.4	Etapa farmacológica - Ensaios de atividade <i>in vitro</i> .....	53
5.4.1	Testes de viabilidade celular.....	53
5.4.2	Testes de viabilidade celular - incubação das amostras.....	57
5.4.3	Ensaio de migração celular - cicatrização <i>in vitro</i> .....	57
5.5	Etapa farmacológica - Ensaios de atividade <i>in vivo</i> .....	62
5.5.1	Mucosite gastrointestinal .....	62
5.5.2	Mucosite Oral .....	67
5.5.3	Úlcera gástrica .....	71
5.5.3.1	Úlcera induzida por etanol .....	71
5.5.3.2	Úlcera induzida por indometacina .....	73
5.5.4	Avaliação da atividade em úlceras de pele .....	73
5.5.4.1	Atividade do filme de álcool polivinílico (PVA) .....	74
5.5.4.2	Atividade do hidrogel de ácido hialurônico .....	75
<b>6</b>	<b>DISCUSSÕES</b> .....	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>99</b>

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	101
<b>APÊNDICE 1</b> .....	121
<b>APÊNDICE 2</b> .....	122
<b>APÊNDICE 3</b> .....	123

**Dedico esta tese ao meu marido Giulio, aos meus pais  
Ivani e Marino, e ao meu irmão Evandro.**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora e amiga Mary Ann, por todos os ensinamentos, oportunidades, afeto e principalmente por acreditar nas minhas escolhas e me permitir voar...

Ao meu co-orientador Rodney, pela amizade, paciência e por estar sempre disposto para ajudar...

Ao meu co-orientador João Ernesto pela amizade e oportunidade de colaboração...

Ao programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) – Unicamp

Ao Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - Unicamp, pelo suporte para a realização do trabalho...

À FAPESP pelo financiamento da bolsa de doutorado, bolsa de estágio em pesquisa no exterior e auxílio à pesquisa...

À CNPq e CAPES pelos financiamentos e bolsas concedidas...

A todos funcionários, alunos e estagiários do CPQBA em especial, Rogério, Fabricio, Vanessa, Ícaro, Natasha, Felipe, Veronica, Katyri, Leila 2, Lais, Natália, Amanda, Johnny e Karina da divisão de Química de produtos naturais e Leilane, Giovanna L., Giovanna F., Gabi, Rafael e Ana Possenti da Farmacologia, por toda ajuda, companheirismo e amizade...

Às indispensáveis Nubia e Ilza, queridas colaboradoras de trabalho e amigas pra toda vida, obrigada pela cumplicidade e afeto... e a Rosanna, minha nova amiga de infância, pelo apoio dentro e fora do laboratório...

Às super chicas Michelle, Patrícia e Viviane, parceiras mais que especiais, obrigada pelo trabalho em equipe, pelas conquistas e especialmente pela amizade...

Aos queridos Karin, Sirlene, Marianinha, Lucas e Jéssica pela ajuda fundamental nos ensaios farmacológicos e a Ana Lúcia por sempre estar disposta a ensinar...

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), pela parceria de colaboração...

Ao professor Julio San Román pela oportunidade, acolhimento e carinho que me recebeu e por ter colaborado para a realização de um sonho pessoal e profissional...

Aos meus professores Felisa e Alvaro, por todos os ensinamentos, pela ajuda imprescindível, pela paciência e pelos laços de amizade eterna...

A querida amiga Raquel, por todo carinho e por estar sempre presente e disposta a ajudar e a Laura Gómez, a primeira professora, pelo acolhimento e carinho...

Aos queridos amigos Paco, Laura Llopis, Constancio, Fabiola (hermanita), Patricia, Marta, Luis Rojo, Luis Rodríguez, Noemi, Angélica, Vanessa e todos companheiros do ICTP-CSIC pelo carinho que me receberam em Madrid...

Aos queridos amigos e colaboradores do ICTP-CSIC Mar Fernandez, Rosana, Blanca Velazquez e David...

À Melchora e Raquel Jarabo pelo carinho e acolhimento em suas casas...

À Fernanda, minha amiga Espanha-Brasil, pela sempre boa companhia e pelas viagens (por só me levar a lugares lindos)...

A toda equipe do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, em especial a Profa. Dra. Renata Leitão, pela oportunidade e ensinamentos e a querida Cíntia por toda ajuda e colaboração...

À Cristiane Marinho pelo acolhimento ao me recebeu em sua casa durante o estágio em Fortaleza...

À equipe da Faculdade de Engenharia Química - Unicamp, em especial a Profa. Dra. Maria Helena pela colaboração e às amigas Carolina Casagrande, Renata Miliani e Carol Camerin...

Ao meu eterno amor Giulio, pelo apoio e incentivo nas minhas escolhas (mesmo que fosse pra ficar longe), pela confiança, por acreditar no nosso amor e por ser meu companheiro de todas as horas...

Aos meus pais e ídolos Ivani e Marino, pelos ensinamentos de vida, por acreditarem nos meus sonhos e sempre me incentivarem a voar mais longe e a vô Carmelina, por seu carinho e orações...

A meu querido irmão Evandro e sua linda família que amo tanto: Ceres, Vandinho, Gabriel, Frank e Melyssa, pela paciência e amor que me receberam em casa, pelo apoio incondicional e por sempre estarem presentes...

A toda família Wiziack e Medina (agora minha família também), em especial a meus sogros tia Ana e tio Zé e meus cunhas Fabiana e Thiago, pelo carinho e amizade...

Aos meus amigos que mesmo de longe seguem participando intensamente da minha vida Vivi, Lidi, Évelin e Iza...

A todos meus amigos e familiares, de longe ou de perto, que acreditam e torcem por mim...

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza tem sido fonte de agentes terapêuticos por milênios, e continuará fornecendo novas pistas estruturais para o desenvolvimento de novos medicamentos, muitos deles de origem vegetal (Cragg & Newman, 2013).

O Brasil é um país com grande biodiversidade, há muito a ser desenvolvido para o aproveitamento de suas plantas medicinais para que se tornem futuros fitoterápicos (Brasil, 2006). Muitas das espécies presentes na Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rennisus) ainda necessitam de estudos complementares para validação de sua eficácia e segurança, já que se tratam muitas vezes de plantas nativas ou exóticas adaptadas, com uso popular bastante estabelecido. Dentre as principais espécies citadas no Rennisus encontra-se a *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl.) Verlot (Brasil, 2009).

A literatura descreve benefícios de medicamentos fitoterápicos que não são observados nos produtos isolados da própria espécie vegetal ou nos produtos sintéticos. Acredita-se que as vantagens encontradas por medicamentos fitoterápicos sejam decorrentes de interações sinérgicas que enaltecem os seus efeitos farmacológicos com baixos efeitos colaterais (Heinrich *et al.*, 2007). Exemplo disso foi o estudo descrito por Wagner (1999), que demonstrou que extratos padronizados de *Ginkgo biloba* em doses de 120 mg, contendo de 6 a 7 mg dos gincolídeos A, B e C apresentavam efeitos iguais à administração da mistura dos três componentes isolados, numa dose de 120 mg. Acredita-se que esses resultados foram consequência dos flavonoides presentes no extrato padronizado, que favoreceram a absorção dos componentes ativos. Portanto, apesar da descoberta dos compostos responsáveis pela atividade, a mistura ainda pode propiciar melhores resultados (Heinrich *et al.*, 2007).

A pesquisa de produtos naturais, seja como extratos padronizados ou como compostos puros, tem como um de seus objetivos a investigação científica

para a obtenção de produtos mais eficazes e com menos toxicidade. Importante ressaltar que os produtos fitoterápicos não estão livres de efeitos colaterais, como por exemplo, a hepatotoxicidade relatada em triagens clínicas após consumo de Kava-Kava (*Piper methysticum*), ou problemas cardiovasculares após o uso de efedra (*Ephedra sinica*) (Sahoo *et al.*, 2010). A produção de fito-formulações com nanopartículas trata-se de uma ferramenta útil para diminuição da toxicidade, seja por diminuir a dosagem necessária ou pelo direcionamento ao sítio específico de ação (Saraf, 2010). O sucesso do estudo envolvendo produtos naturais depende de colaborações multidisciplinares (Cragg & Newman, 2013). O emprego de biomateriais contribui para a produção de fito-formulações mais compatíveis ao organismo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

O gênero *Arrabidaea* (Bignoniaceae), ocorre na América tropical, desde o sul do México até o Brasil central (Lorenzi & Matos, 2002). Este gênero é fonte de antocianinas, flavonoides e taninos (Harborne, 1967; Takemura *et al.*, 1995; Zorn *et al.*, 2001; Alcerito *et al.*, 2002; Devia *et al.*, 2002; Pauletti *et al.*, 2003). Pauletti *et al.* (2003) descobriram novas glicosilxantonas isoladas do caule de *A. samydoides*, que apresentaram propriedades antioxidantes. Alcerito *et al.* (2002) isolaram quatro flavonoides com atividade antifúngica das folhas de *A. brachypoda*. As espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular para assepsia de feridas e tratamento de desordens intestinais (Corrêa, 1926).

A espécie *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (Figura 1), conhecida popularmente como pariri (no Pará), crajiru (no Amazonas), puca-panga, coapiranga, chica ou cipó-cruz, é encontrada em quase todo o Brasil e é muito comum na Floresta Amazônica (Von-Poser, 2000).



**Figura 1:** Folhas de *Arrabidaea chica*. Fonte: Campo experimental CPQBA/UNICAMP, Monteiro, K.M.

No nordeste do Brasil, a *A. chica* é usada em tatuagens pelos índios devido aos pigmentos carajurina e carajurona (Corrêa, 1926; Chapman *et al.*, 1927; Zorn *et al.*, 2001). As folhas submetidas à fermentação fornecem material

corante vermelho-escuro ou vermelho-tijolo. Algumas tribos preparam uma infusão das folhas para o tratamento de conjuntivite aguda, e uma pasta, na forma de cataplasma, contra ataque de insetos. Na medicina popular, são atribuídos à espécie *A. chica* propriedades terapêuticas para enfermidades da pele (psoríase, feridas, úlceras), contra cólica intestinal, diarreia com sangue, piodermite, corrimento vaginal, anemia e contra câncer de boca, de útero e leucemia (Kalil Filho *et al.*, 2000; Lorenzi & Matos, 2002; Magalhães *et al.*, 2009).

O conteúdo mineral de três diferentes variedades de *A. chica* provenientes da Amazônia foi avaliado por Magalhães *et al.* (2009), que observaram a presença dos elementos cobre, ferro, manganês e zinco, sugerindo a possibilidade de uso como suplemento nutricional, principalmente de manganês (Magalhães *et al.*, 2009).

Estudos preliminares desenvolvidos por nosso grupo de pesquisas comprovaram que o extrato bruto de *A. chica* possui atividade cicatrizante e antiulcerogênica (Jorge 2008; Jorge *et al.*, 2010). O extrato bruto de *A. chica* seco por atomização favoreceu a cicatrização de tendões calcâneos em modelo animal (Aro *et al.*, 2013). Verificou-se também a atividade do extrato preparado por extração enzimática sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas (Taffarello *et al.*, 2013), bem como a manutenção da atividade cicatrizante do extrato bruto de *A. chica* quando incorporado à bases semissólidas (Sousa, 2013).

Há ainda relatos de potenciais propriedades terapêuticas da espécie, que incluem eficácia anti-inflamatória (Oliveira *et al.*, 2009), antibacteriana e antifúngica (Barata, 2006; Hofling *et al.*, 2010), antitumoral em tumor sólido de Ehrlich (Ribeiro *et al.*, 2012); eficácia contra dermatófitos de *Trypanosoma cruzi* (*Trichophyton mentagrophytes*) (Barbosa *et al.*, 2008), além de atividade diurética de frações obtidas do extrato de *A. chica* (Amaral *et al.*, 2012). Mafioleti *et al.* (2013) reportaram inibição do crescimento de *Helicobacter pylori* e *Enterococcus faecalis* promovida pelo extrato hidroalcoólico de *A. chica*.

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

Dos Santos *et al.* (2013), estudaram o potencial mutagênico genotóxico e antigenotóxico da fração clorofórmica do extrato das folhas de *A. chica*, onde estavam presentes metabólitos bioativos. Os estudos envolveram avaliações *in vitro*, com o teste da Salmonella, e *in vivo*, o teste do micronúcleo feito a partir da medula óssea de ratos. Eles verificaram que a fração não apresentou qualquer potencial mutagênico ou genotóxico, inferindo que o extrato de *A. chica* é geneticamente seguro.

O extrato de *A. chica* demonstrou atividade antioxidante superior ao comparado com os metabólitos testados separadamente, sugerindo que a atividade é atribuída à presença da mistura dos compostos no extrato. Essa característica sugere que produtos antioxidantes contendo o extrato de *A. chica* possam ser desenvolvidos para o uso na indústria cosmética (Siraichi *et al.*, 2013b).

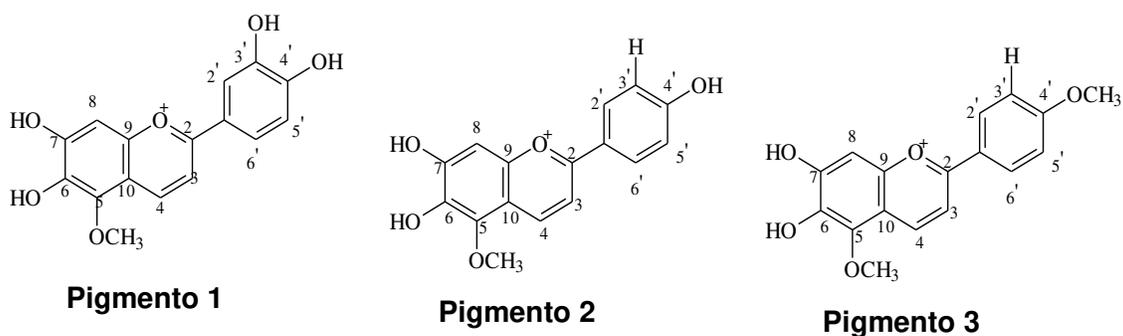
Formulações cosméticas ou farmacêuticas relatam aplicação de preparações com *A. chica* para aumentar a tonicidade da pele inibindo a formação de rugas, além da proteção a danos induzidos por radiação UV (Pauly, 2001). Formulações semissólidas produzidas com o extrato de *A. chica* demonstraram redução de úlceras cutâneas, avaliadas em modelos experimentais de cicatrização *in vivo* (Sousa, 2013). Também é relatado o emprego de *A. chica* juntamente com extratos de outras plantas para o tratamento ou prevenção de desordens de

hipopigmentação, tais como vitiligo, estrias e cicatrizes brancas (Bourgeteau & Nding, 2010).

A descoberta da estrutura e síntese de antocianinas teve lugar durante os primeiros anos do século 20. No entanto, em 1664 Robert Boyle já havia notado curiosidades a respeito das propriedades desses compostos, que o levaram a apresentar um relatório sobre as mudanças de cor que ocorriam quando extratos de flores eram tratados com ácidos e bases. O termo antocianina é creditado a um farmacêutico alemão Ludwig Clamor Marquart, que cunhou este nome em 1835, usando as palavras gregas para flor *άνθος* (*anthos*) e azul *κυανός* (*kyanos*). A investigação sobre as antocianinas e compostos relacionados amadureceu enormemente nos últimos 20 anos, com linhas de pesquisas sobre caracterização, aplicação como corantes, otimização de processos e desenvolvimento de pesquisas clínicas sobre o impacto destes compostos para a saúde humana (Pina *et al.*, 2012).

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

As 3-deoxiantocianidinas presentes na espécie *A. chica* são 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilio (pigmento **1**); 6,7,3'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilio (carajurona) (pigmento **2**), que foram isoladas das partes aéreas da espécie juntamente com a já descrita 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio (carajurina – pigmento **3**) (Figura 2) (Zorn *et al.*, 2001; Devia *et al.*, 2002).



**Figura 2:** estruturas químicas de agliconas isoladas das folhas de *A. chica*: (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxi-flavilium (Pigmento 1); 6,7,4'-trihidroxi-5-dimetoxiflavilium (Pigmento 2); 6,7-di-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavilium (carajurina) (Pigmento 3).

Em termos de atividade biológica, as antocianinas provavelmente não atuem de forma independente. Alguns trabalhos sugerem que a atividade é potencializada quando administrada em misturas, onde antocianinas e outros componentes flavonoides ou antocianinas e outros não flavonoides, interagem juntos para poder prover a potência total (Lila, 2004).

Estudos apontam o alto poder antioxidante das antocianinas para combater doenças metabólicas e suas complicações (Kong *et al.* 2003; Tsuda *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Harris *et al.*, 2007; Zafra-Stone *et al.*, 2007). O poder antioxidante de antocianinas isoladas de Mirtilo (*Vaccinium corymbosum*) bem como a estabilidade frente a condições adversas de pH, temperatura, luz, além do contato com diferentes aditivos, foi demonstrada por Wang *et al.*(2010).

Estresse térmico, alterações de pH, presença de oxigênio e tempo de estocagem tem sido reportados como fatores que aceleram a degradação das antocianinas (Lee & Cho, 2012; Frank *et al.*, 2012a). A influência da pressão e da temperatura na estabilidade de antocianinas foi avaliada durante um processo de emulsificação. Observou-se que o estresse mecânico, mesmo empregando altas pressões, não causa degradação das moléculas e que a degradação de antocianinas em processos de emulsificação está relacionada a altas temperaturas (Frank *et al.*, 2012a).

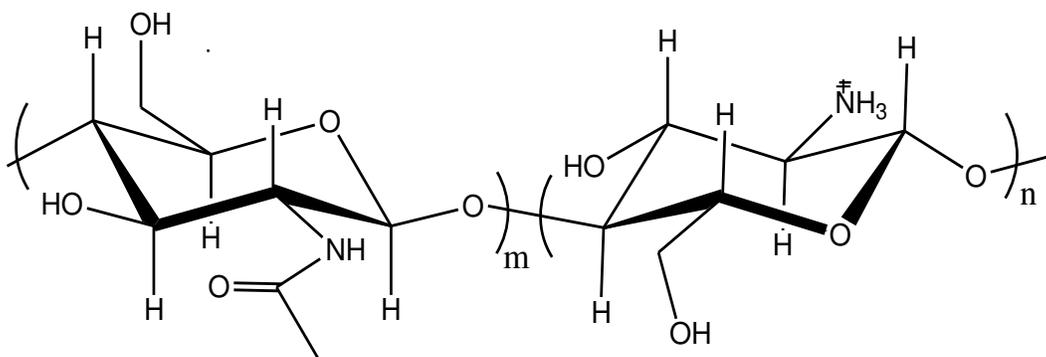
## 2.2 Biomateriais e agentes de entrecruzamento

O estudo de biomateriais e sistemas utilizados em medicina regenerativa com aplicações tais como enxertos, *stents* vasculares ou transportadores para a liberação controlada de fármacos, são importantes para garantia de produtos fisiologicamente eficazes e mecanicamente funcionais. Este estudo requer a investigação e caracterização tanto da estrutura do biomaterial como de suas propriedades mecânicas, definindo parâmetros que permitem avaliar suas interações com o sistema biológico e analisar o seu comportamento após a aplicação (Hutmacher *et al.*, 2004).

Os requisitos a serem cumpridos por um biomaterial para aplicação em medicina regenerativa são: 1) ser biocompatível; 2) ser quimicamente estável e biodegradável, ao menos para o tempo de uso programado; 3) ter resistência e propriedades mecânicas adequadas; 4) apresentar um desenho apropriado, tamanho e forma para a aplicação e 5) ter um processo de fabricação reproduzível.

A quitina é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos e é o polímero mais abundante na natureza depois da celulose. Apesar disso a quitina não se acumula no meio ambiente porque as bactérias saprófitas podem catabolizá-la (Argüelles *et al.*, 2004; Burton & Zaccone, 2007). A quitosana é um biopolímero obtido da desacetilação da quitina, podendo ser transformada facilmente em membranas, fibras, hidrogéis, micro ou nanopartículas (Argüelles *et al.*, 2004; Pedro *et al.*, 2009).

A quitosana (Figura 3) é um polissacarídeo altamente básico que apresenta em sua estrutura grupos aminos livres reativos quimicamente, que podem ser derivatizados ou ionizados. A ionização do grupo amina provoca a solubilidade do polímero em meios aquosos ligeiramente ácidos, facilitando a sua manipulação. Assim como muitos polissacarídeos, apresenta também grupos OH reativos, que também podem ser derivatizados (Argüelles *et al.*, 2004).



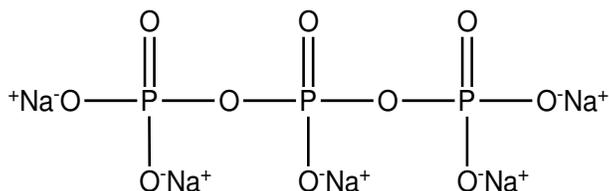
**Figura 3:** estrutura molecular da quitosana.

No campo dos biomateriais trata-se de um polímero muito interessante devido, principalmente, ao seu caráter biocompatível e a sua baixa toxicidade. Além disso, é biodegradável, o que constitui um requisito necessário para numerosas aplicações biomédicas (Argüelles *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012).

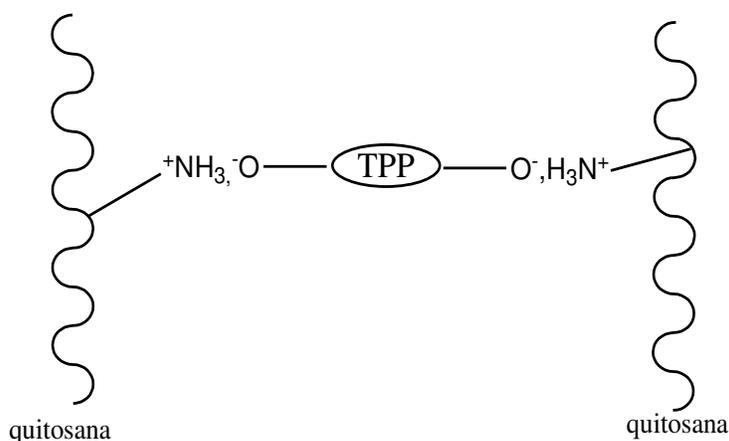
A aplicação da quitosana na encapsulação de fármacos para sistemas de liberação data da década de noventa, e constitui um campo de pesquisa promissor. Dentre as técnicas mais utilizadas para obtenção das partículas está a reticulação iônica, onde as cargas positivas da quitosana interagem com as cargas negativas do agente reticulante, promovendo uma interação eletrostática. Esse processo visa principalmente reduzir a sua solubilidade no meio ao qual estão expostas. O agente de reticulação ou entrecruzante, *crosslinking*, interage com a quitosana reduzindo os poros da sua matriz. Em consequência, as partículas tornam-se mais rígidas, com menor capacidade de intumescimento, e prolongam o tempo de liberação do bioativo encapsulado (Silva, 2006; Nasti *et al.*, 2009).

Entre os agentes de reticulação mais empregados está o tripolifosfato de sódio (TPP) (Figura 4), que é atóxico e promove a reticulação iônica da quitosana (Figura 5) em condições relativamente fáceis e com baixo custo de processo. Ao contrário da maioria dos agentes reticulantes, ele não apresenta graves restrições no manuseio e armazenamento (Gan *et al.*, 2005; Fàbregas *et al.*, 2013). As partículas são formadas pela adição de uma solução à outra, sob

agitação magnética ou mecânica (Shu & Zhu, 2000). O bioativo pode ser adicionado à solução de quitosana (Janes *et al.*, 2001; Shu & Zhu, 2000), ou à solução de TPP (Vila *et al.*, 2002).



**Figura 4:** estrutura molecular do tripolifosfato de sódio (TPP)



**Figura 5:** representação da reticulação da quitosana com o tripolifosfato de sódio.

A aplicação de quitosana para tratamento de feridas e queimaduras é favorecida por sua capacidade hemostática e seu efeito de aceleração no reparo de feridas com melhor efeito estático final. A facilidade de adesão da quitosana, assim como seu caráter antifúngico, bacteriostático e sua permeabilidade ao oxigênio são propriedades muito atrativas para uso tópico. Além disso, a quitosana possui também atividade antiácida e antiulcerativa, o que evita ou diminui a irritação de fármacos no estômago. Outra característica importante é a mucoadesividade. Com exceção do esôfago, o trato gastrointestinal (TGI),

incluindo estômago, esta recoberto por uma camada continua de um gel mucoso insolúvel. Este gel contém fundamentalmente glicoproteínas e, devido ao seu conteúdo de resíduos de ácido N-acetilmuramínico (ácido siálico), possui uma forte carga negativa. Essa camada é considerada como um possível sítio para bioadesão de fármacos. Por se um polissacarídeo catiônico, a quitosana é capaz de interagir com os resíduos do ácido siálico da mucina. A bioadesividade pode ser empregada para aumentar o tempo de residência do fármaco no TGI e conseguir uma liberação mais prolongada do mesmo no epitélio do trato digestivo. As formulações bioadesivas têm sido utilizadas para a administração de fármacos ao TGI, como à via bucal, e também vias nasal, ocular e vaginal (Argüelles *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011).

A vasta utilização da quitosana gera uma preocupação quanto ao potencial alergênico. Pequenos fragmentos de proteína residual em produtos com quitina ou quitosana podem atuar como antígeno e causar risco potencial a consumidores alérgicos a crustáceos. Isso implica na importância da purificação da quitosana comercial antes da aplicação em indústrias, como a de alimentos (Nguyen, 2012). A quitosana uma vez purificada pode ser considerada como um não derivado de crustáceo, porque os processos de isolamento removem proteínas e outros contaminantes de tal forma que permitem que sejam classificadas como produtos químicos, independentemente da sua origem (Muzzarelli, 2011).

Um estudo piloto da utilização da bandagem de quitosana HemCon® em indivíduos com histórico de alergia a derivados de frutos do mar demonstrou que nenhum participante teve reação adversa como eritema, urticária ou edema, mesmo após 24 h da aplicação (Waibel *et al.*, 2011).

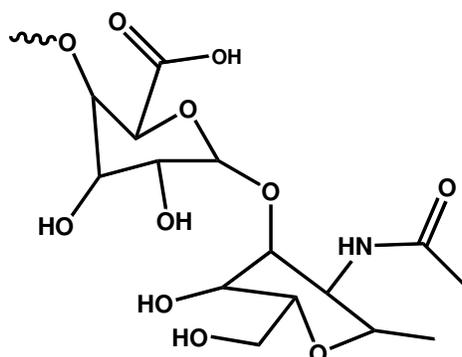
Há ainda relatos do emprego da quitosana na imunização. Segundo Bae *et al.*, (2013) a administração oral de quitina e quitosana inibe respostas alérgicas a amendoim. Roy *et al.* (1999) reportaram que o uso de nanopartículas de quitosana carreando o gene para o alérgeno do amendoim como vacina oral

modificou o sistema imunológico de ratos e protegeu contra a hipersensibilidade induzida pelo alérgeno. Segundo Chen *et al.*, (2008) a quitosana WSC, um tipo de quitosana solúvel em água, pode contribuir como uma nova modalidade terapêutica para a asma alérgica por ser um forte imunomodulador da ativação de macrófagos atenuando processos inflamatórios da asma.

Os hidrogéis (HG) são materiais poliméricos entrecruzados, de origem natural ou sintética, em forma de rede tridimensional que quando entram em contato com água se intumescem e formam compostos elásticos, flexíveis e que mantêm se forma significativa sua estrutura sem se dissolver (Van Vlierberghe *et al.*, 2011). Possuem múltiplas aplicações no campo de biomateriais, entre elas a utilização no desenvolvimento de sistemas para a regeneração do tecido, devido sua elevada biocompatibilidade e seu uso frequente como transportadores de fármacos (Hennink *et al.*, 2002; Hoare & Kohane, 2008).

Estes géis podem ser classificados em vários tipos, dependendo da natureza das interações que constituem a rede. Os géis físicos possuem uma rede tridimensional formada por uniões iônicas ou do tipo Van der Waals, dando lugar a redes reversíveis (Jeong *et al.*, 2002), ou seja, uma vez formados (ocorrida a transição sólido-gel) podem sofrer a transição inversa (gel-sólido) sem se degradar. Os géis químicos são formados por ligações covalentes que originam uma rede irreversível, onde é necessária sua degradação para voltar ao estado inicial sólido. Os hidrogéis que apresentam ambos tipos de entrecruzamento, físico e químico, formam redes semi-interpenetradas. Este tipo de rede possui a capacidade de sofrer deformações temporais quando se aplica um esforço externo de intensidade limitada. A deformação desaparece quando o esforço cessa, e o hidrogel recupera parcialmente sua estrutura inicial, enquanto outra parte do esforço aplicado se dissipa em forma de calor. Este comportamento se denomina viscoelástico sendo característico dos polímeros. Avaliações das propriedades viscoelásticas podem ser feitas por reologia, a partir de ensaios dinâmicos de esforço-deformação (Vanderhooft *et al.*, 2009).

O ácido hialurônico (AH) (Figura 6) é um polímero linear e aniônico constituído por sequências dissacarídeas de ácido glicurônico e N-Acetyl-glicosamina (Collins & Birkinshaw, 2008). É encontrado em quantidades variadas em todos os tecidos de animais adultos, em frutas (caju) e em bactérias (gram negativas); é o mais simples glicosaminoglicano (GAG), sendo o único não sulfatado presente na matriz extracelular de vertebrados (Peattie *et al.*, 2004). É especialmente prevalente durante a cicatrização de feridas e no fluido sinovial das articulações (Drury & Mooney, 2003). Nos tecidos conectivos, forma um suporte por ligar outros GAGs e proteoglicanos, que são mantidos através de interações específicas AH-proteína (Peattie *et al.*, 2004). Possui diversas funções estruturais e fisiológicas nos tecidos, como as interações celulares, interações com os fatores de crescimento, regulação da pressão osmótica e lubrificação tissular, o que contribui para manter a integridade homeostática e estrutural dos tecidos (Yoo *et al.*, 2005).

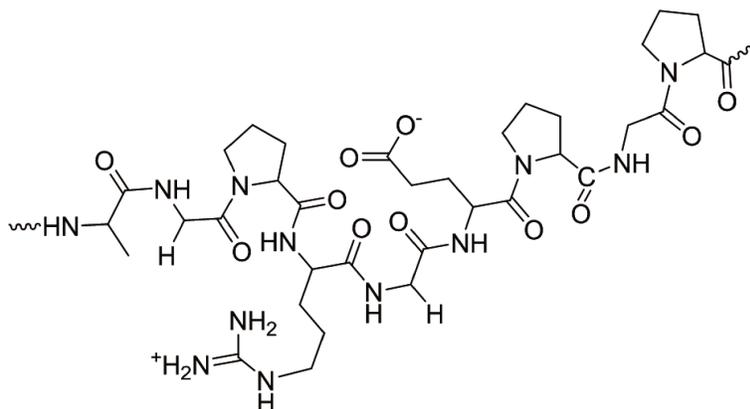


**Figura 6:** estrutura química do ácido hialurônico

Em meio aquoso se produzem pontes de hidrogênio o que permite manter a rigidez e reter água (Collins & Birkinshaw, 2008). O AH pode ser modificado quimicamente por ligações covalentes cruzadas tornando-o menos solúvel (Segura *et al.*, 2005).

A gelatina é uma proteína complexa, obtida a partir da degradação térmica ou enzimática do colágeno. Trata-se de um polímero com excelente bioafinidade, que possui vasta utilização em aplicações farmacêuticas (Pal *et al.*,

2007). Em sua estrutura química (Figura 7), a presença de resíduos de lisina ou glutamina com grupos amino livres pode servir como pontos de entrecruzamento. O entrecruzamento físico ou químico da gelatina melhora sua estabilidade (Peng *et al.*, 2008).

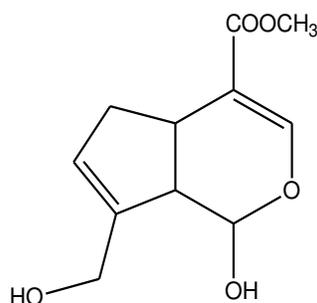


**Figura 7:** estrutura molecular da gelatina.

O entrecruzamento físico, que pode ser produzido por radiação UV ou desidratação, apresenta como inconveniente a dificuldade de controle da densidade de entrecruzamento da matriz polimérica (Zandi *et al.*, 2007). O entrecruzamento químico, por sua vez, permite controlar de maneira fácil e eficaz esta densidade de entrecruzamento em função da concentração do agente entrecruzante, obtendo uma matriz com ligações covalentes, que propiciam maior estabilidade mecânica (Vanderhooft *et al.*, 2009). O entrecruzante químico convencional utilizado é o glutaraldeído (Matsuda *et al.*, 1999; Ai *et al.*, 2002), no entanto, estudos tem demonstrado sua alta toxicidade (Gough *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2011), por isso a importância da busca por entrecruzantes mais compatíveis.

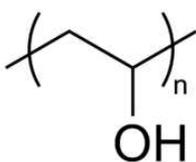
A genipina (Figura 8) é obtida via hidrólise enzimática do geniposídeo, que é isolado dos frutos da *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*, espécies encontradas na América tropical. Na medicina chinesa frutos de *Gardenia jasminoides* são utilizados como anti-inflamatório, diurético, homeostático, entre

outros (Butler *et al.*, 2003). Genipina trata-se de uma promissora alternativa aos agentes entrecruzantes convencionais, devido sua biocompatibilidade e baixa toxicidade (Bigi *et al.*, 2002; Nickerson *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2011).



**Figura 8:** estrutura molecular da genipina.

O álcool polivinílico (PVA) (Figura 9) é um polímero sintético, hidrofílico, biodegradável e que apresenta boa capacidade de formação de filmes (Faria *et al.*, 2012). Por suas excelentes propriedades, o PVA tem sido utilizado em um grande número de aplicações industriais, como em processamento de papel e fibras, como estabilizante de emulsão, além do emprego como carreador de medicamentos, devido às suas propriedades de degradabilidade e por ser biocompatível e não tóxico (Aranha & Lucas, 2001), tem sido aprovado para utilização em vários dispositivos médicos, como lentes de contato e órgãos artificiais (Peppas & Simmons, 2004).



**Figura 9:** estrutura molecular do álcool polivinílico (PVA).

Nishikawa *et al.*(2007) destacam o amplo emprego de PVA em produtos cosméticos como em máscaras faciais *peel-off*, que se baseiam em resinas vinílicas formadoras de filme. Segundo Faria *et al.*, (2012) a introdução de PVA à

matriz de amido, mesmo em baixas concentrações, levou à formação de filmes com melhores propriedades mecânicas.

### **3 PROPOSIÇÃO**

#### **3.1 Proposição Geral**

Delinear, caracterizar e avaliar a atividade no tratamento de lesões de pele e mucosa de nanopartículas, filmes absorvíveis e hidrogéis contendo extrato hidroalcoólico de *Arrabidaea chica*.

#### **3.2 Proposições Específicas**

- ❖ Produzir nanopartículas de quitosana para o encapsulamento do extrato padronizado de *A. chica*;
- ❖ Produzir esponjas, filmes absorvíveis e hidrogéis com as nanopartículas de *A. chica*;
- ❖ Caracterizar os sistemas produzidos;
- ❖ Avaliar a atividade na migração e proliferação de fibroblastos em testes *in vitro* e a atividade cicatrizante em úlceras de pele e mucosa em modelos animais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Estudo Fitoquímico**

Os procedimentos e análises do estudo fitoquímico foram realizados na Divisão de Química de Produtos Naturais do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mary Ann Foglio.

#### **4.1.1 Obtenção do material vegetal**

Foram coletadas folhas de *A. chica* (Humb & Bonpl) Verlot, disponíveis no Banco de Germoplasma, (acesso 06), do CPQBA-UNICAMP, localizado no município de Paulínia (22° 45' 00" Sul e 47° 10' 21" Oeste). A coleta foi realizada no mês de abril de 2010. Folhas das partes inferior, média e superior foram coletadas, procurando-se obter uma amostra representativa das diferentes partes da planta. O material vegetal (exsicata 1865) foi identificado e classificado pela Dr<sup>a</sup>. Glyn Mara Figueira, curadora da coleção de plantas medicinais e aromáticas (CPMA) do CPQBA-Unicamp. O uso de material vegetal possui autorização de acesso dentro do processo número 010150/2012-9 emitido pelo CGEN (Conselho de Gestão do Patrimônio Genético) – IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis).

#### **4.1.2 Secagem e moagem do material vegetal**

As folhas coletadas foram secas em estufa ventilada (marca Fabbe), à 40°C durante 48 horas, e moídas em moinho tipo martelo (marca Stephen, modelo UM 40) com peneira de 40 mesh. O material seco e moído foi embalado (Figura 10) para o armazenamento. Empregou-se uma embalagem composta por um filme interno de polipropileno revestido por uma camada de alumínio opaco, com a finalidade de proteger as folhas de agentes externos como luz, oxigênio e

umidade. O processo de embalagem foi realizado no Instituto de Tecnologia em Alimentos (ITAL) Campinas.



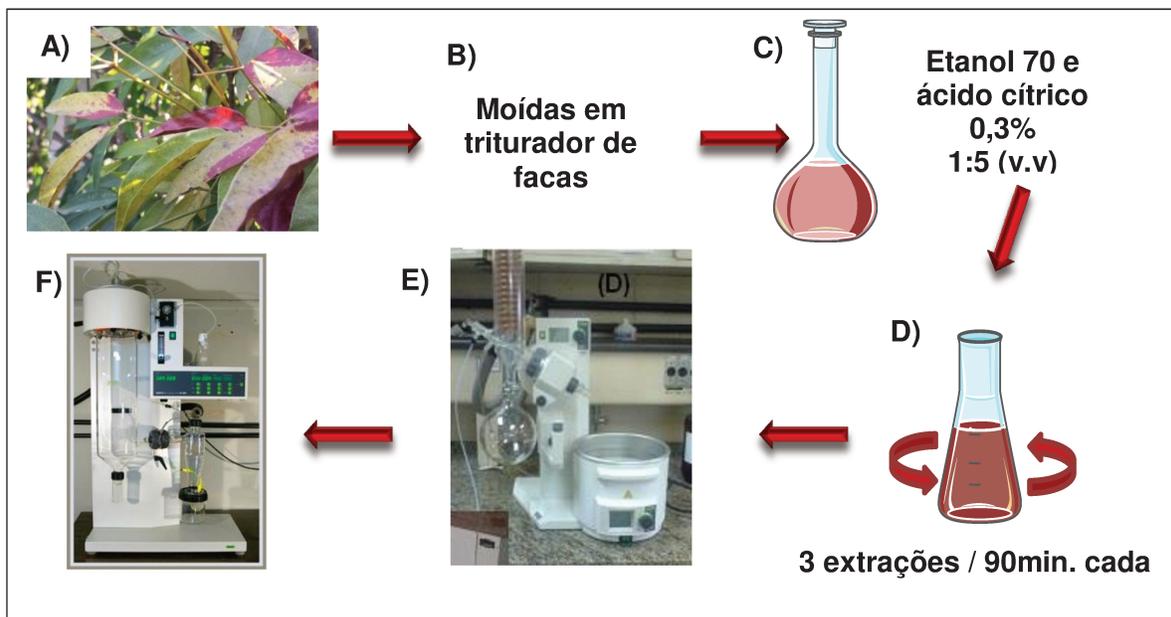
**Figura 10:** embalagem com folhas de *A.chica* secas e moídas, empregando-se sistema de empacotamento à vácuo.

#### **4.1.3 Preparo dos Extratos Vegetais**

A metodologia do processo de extração seguiu o protocolo descrito por Oliveira (2001). Um esquema representativo do preparo dos extratos vegetais está ilustrado na Figura 11.

Para o processo extrativo por maceração dinâmica, adicionaram-se às folhas moídas o solvente extrator, que consistiu de uma mistura de etanol 70% e ácido cítrico 0,3% na proporção de 1 parte de planta para 5 partes de solvente (p/v). Foram realizadas três extrações de 90 minutos cada, em agitador oscilatório (escala laboratorial) ou coluna de aço inox (escala piloto). Os extratos foram filtrados e o solvente eliminado, sob vácuo, em evaporadores rotativos Buchi (modelo R-215). A neutralização foi realizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  até pH 6-6,5. Para secagem, empregou-se o atomizador *spray dryer* Buchi B-290, nas condições operacionais descritas na Tabela 1.

Todo processo de extração foi realizado sob proteção da luz, devido à fotossensibilidade da amostra.



**Figura 11:** Esquema representativo do preparo do extrato vegetal. A) folhas secas de *A. chica*; B) moagem com gelo seco; C) solvente extrator: etanol + ácido cítrico 0,3%, 1:5 (v.v); D) maceração dinâmica em agitador oscilatório; E) rotaevaporador Buchi RE 215 para eliminação do solvente a vácuo; F) *spray dryer* Buchi B-290 para secagem do extrato.

**Tabela 1:** condições operacionais do *spray dryer* para secagem do extrato vegetal.

**Condições operacionais**

Temperatura de entrada (°C)	100
Temperatura de saída (°C)	55
Nozzle cleaner	5
Aspirador (%)	90
Pressão de N <sub>2</sub> (bar)	0,9
Vazão de N <sub>2</sub> (L.min <sup>-1</sup> )	473
Vazão de bomba (%; mL.min <sup>-1</sup> )	25; 7,5
Volume de solução (mL)	1000
Sólidos totais (%)	1,71
<i>Inert loop</i> : (°C)	0 a 10

#### 4.1.4 Análise Qualitativa e Quantitativa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises cromatográficas foram realizadas pela Msc. Ilza Maria de Oliveira Sousa da Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA-UNICAMP, como parte do projeto financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número 2011/09127-8.

As amostras foram dissolvidas em solvente apropriado, grau CLAE, e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com detector de arranjo de diodos (UV), nas condições baseadas em Devia *et al.* (2002).

##### 4.1.4.1 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas por CLAE (Shimadzu) acoplada a detector de UV com arranjo de diodos (Shimadzu). As condições cromatográficas e gradiente de fase móvel utilizado estão descritas nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2-** condições cromatográficas utilizadas para análise das antocianinas presentes na *A. chica*.

Equipamentos e acessórios	Especificação
Bomba Shimadzu	LC 10atm
Coluna	C18 Gemine- Phenomenex 5µm 110A° (250mm x 4,6 mm x 5µm)
Volume de injeção	20µL
Vazão	1 mL/min
Detector Shimadzu	UV-DAD
Fase móvel	H <sub>2</sub> O/ Metanol (gradiente)
Comprimento de onda	470nm
Forno CTO-10ASVP	35°C
Software	Class VP -5
Injetor automático	Injetor automático sil-20AT HT

**Tabela 3:** programa de gradiente fase móvel para análises por CLAE-DAD

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

#### 4.1.5 Isolamento do padrão carajurina

A carajurina foi isolada do extrato bruto de *A. chica* utilizando cromatografia em coluna aberta e como adsorvente metil celulose cristalina (marca Merck), usando como eluente hexano, diclorometano, metanol e metanol acidificado com 0,02% de ácido trifluoroacético (TFA) (Tabela 4).

As frações coletadas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada, utilizando cromatofolha de alumínio com sílica gel 60 F<sub>245</sub> (Merck 10005554), e como fase móvel para eluição a mistura butanol: água: ácido acético na proporção 4:5:1.

**Tabela 4:** gradientes utilizados como fase móvel para purificação de carajurina

Solvente	Volume (mL)
Hexano	100
Hexano/ diclorometano 1/1	100
Diclorometano	100
Diclorometano/Metanol 1/1	100
Metanol	100
Metanol/ H <sub>2</sub> O Acidificado com TFA 0,02% 90/10	100

## **4.2 Estudo tecnológico**

O delineamento e caracterização das partículas e sistemas de transporte foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), durante estágio de pesquisa no exterior realizado em Madrid-Espanha, sob supervisão do Dr. Julio San Román. (Auxílio FAPESP de bolsa de estágio em pesquisa no exterior – BEPE- processo 2012/ 12890-8).

### **4.2.1 Nanopartículas de quitosana e encapsulamento do extrato de *A. chica***

As nanopartículas foram preparadas pela técnica de reticulação, que compreende a formação de partículas pela adição de uma solução à outra sob agitação (Shu & Zhu, 2000). Os reticulantes foram adicionados à solução de quitosana por gotejamento. Foram avaliadas proporções de massa e volume entre os polímeros e os métodos de agitação magnética, mecânica (Ultra-turrax<sup>®</sup>) e ultrassom de sonda. Os entrecruzantes utilizados para reticulação do cloridrato de quitosana (Protosan<sup>®</sup>Novamatrix) foram tripolifosfato de sódio (TPP) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) ou genipina (Challenge Bioproducts<sup>®</sup>).

Para produção das nanopartículas de *A. chica*, o extrato foi adicionado à solução de entrecruzante em proporções de 10, 15 ou 25% em relação à massa de quitosana. O extrato de *A. chica* não encapsulado foi removido através de diálise por 24 horas em solução tampão fosfato, empregando membranas de poros de 3500 Da. Para os cálculos de eficiência de encapsulação, a medida da absorvância a 485 nm do líquido dialisado foi plotada em curva de calibração do extrato de *A. chica*.

#### **4.2.2 Esponjas**

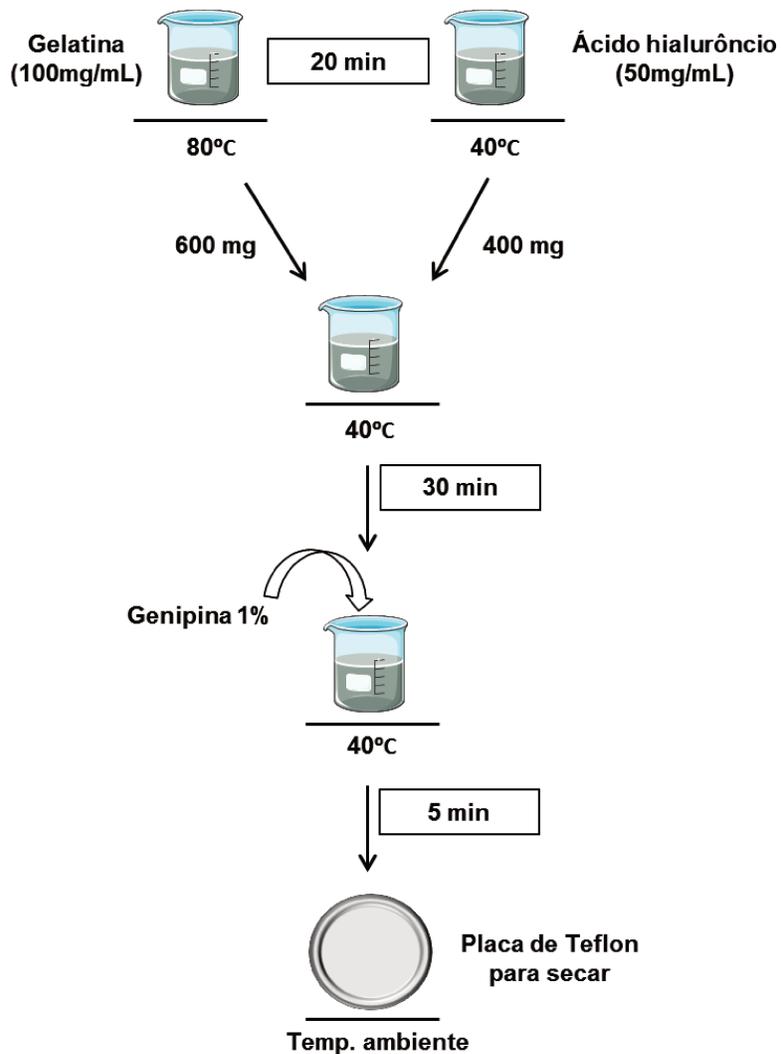
As esponjas foram preparadas através de liofilização da solução de nanopartículas (Peniche *et al.*, 2007). As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 48 horas.

#### **4.2.3 Filmes absorvíveis**

Foi preparada solução de álcool polivinílico (PVA) a 3% por dispersão do polímero em água destilada, mantida sob agitação com aquecimento a 100°C durante 48 horas. A mistura foi filtrada em funil de placa porosa e depositada em moldes de teflon para evaporação da água a temperatura ambiente e consequente formação dos filmes. As nanopartículas de *A. chica* foram adicionadas à solução de PVA (antes da formação do filme).

#### **4.2.4 Hidrogel**

O hidrogel foi formado a partir da mistura de uma solução aquosa de gelatina (100 mg/mL), preparada a 80° C, e ácido hialurônico (50 mg/mL), preparada a 40° C, na proporção de 6:4, seguida da adição do entrecruzante genipina (após 30 min.) nas proporções compreendidas entre 0,5 e 5% (em relação à mistura polimérica) (Figura 12) (Ortega, 2013). Foram utilizados gelatina da marca Sigma® “porcine skin” tipo A e ácido hialurônico marca Bioiberica® - grau oral. Depois de seco, o filme ou xerogel (hidrogel seco) foi lavado três vezes com água destilada para retirada de resíduos dos componentes que não reagiram. As nanopartículas em suspensão aquosa foram incorporadas ao hidrogel após o processo de lavagem.



**Figura 12:** esquema ilustrativo do processo de obtenção do hidrogel de ácido hialurônico e gelatina entrecruzado com genipina.

## 4.2.5 Caracterização das formulações

### 4.2.5.1 Dispersão de luz dinâmica - *Nanosizer*

O tamanho e o potencial zeta das partículas foram avaliados utilizando a técnica de dispersão de luz dinâmica (DLS) com o equipamento Zeta sizer, modelo Nano ZS (Malvern Instruments, UK).

#### **4.2.5.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

A morfologia das nanopartículas foi analisada por MEV utilizando o equipamento Philips XL 30 ESEM a uma voltage de 3 kV. As amostras foram depositadas em um disco de vidro de 13 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Após evaporação do solvente a temperatura ambiente, a amostra foi metalizada com recobrimento de cromo.

#### **4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A morfologia das nanopartículas foi analisada por MET utilizando o equipamento Philips XL 30 ESEM a uma voltage de 30 kV. Para o preparo das amostras, as mesmas foram depositadas em um disco de cobre e recobertas com Formvar/Carbon.

#### **4.2.5.4 Microscopia por força atômica (MFA)**

A morfologia da superfície dos filmes foi avaliada por MFA utilizando o equipamento Veeco, do tipo Multi Mode SPM com controlador Nanoscope IVa. As medidas foram feitas no modo *tapping*. Pontos de frequência de ressonância de ~300 kHz e constante de elasticidade de ~40 N/m.

#### **4.2.5.5 Estudo de hidratação dos filmes**

A determinação do grau de hidratação foi realizada em distintos meios tamponados (pH 2, 7.4 ou 10). Discos de filme (hidrogel seco) de 10 a 30 mg foram submergidos em recipientes com 10 mL do tampão correspondente em banho a 37°C. Em tempos determinados (0-200 minutos) os discos foram pesados e a hidratação foi calculada a partir do ganho de peso empregando a fórmula:

$$\% H_e = [(W_e - W_o) / W_o] \times 100$$

Onde:

$H_e$  = grau de hidratação,

$W_e$  = peso do filme hidratado,

$W_o$  = peso inicial do filme.

### 4.3 Estudo farmacológico – ensaios *in vitro*

Os estudos para avaliação da atividade *in vitro* foram realizados no Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) sob supervisão do Dr. Julio San Román.

#### 4.3.1 Testes de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo método MTT (3-(dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) (Mosmann, 1983). O ensaio foi realizado empregando fibroblastos humanos comerciais de origem dermal (procedência: INNOPROT – Espanha) segundo o protocolo:

*Primeiro dia:*

- Inoculação de 100  $\mu$ L de suspensão celular ( $d= 8.10^4$  cels/mL) em placas de 96 compartimentos em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), deixando uma coluna livre, para servir de branco.
- Incubação durante 24 horas a 37°C.

*Segundo dia:*

- Eliminação do meio da placa ao completar 24 horas. Adição de 100 $\mu$ L de meio DMEM com SFB 1%.
- Aplicação das amostras em diferentes concentrações.
- Incubação das placas por 24, 48 ou 72h (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>).

*Terceiro, quarto ou quinto dia:*

- Preparação da dissolução de MTT em tampão fosfato-salino - PBS (50 mg de MTT em 10 mL de PBS) seguida de diluição a 10% com meio fresco.
- Eliminação do meio da placa para adição de 100  $\mu$ L da solução de MTT em cada compartimento.
- Incubação durante 3 ou 4 horas a 37°C.

- Retirada do meio para acréscimo de 100  $\mu$ L/compartimento de dimetilsulfóxido (DMSO).
- Leitura da absorbância a 570 nm.

A partir dos valores de absorbância observados, foi calculada a porcentagem de crescimento celular para cada uma das concentrações testadas, a partir da fórmula:

$$\text{Crescimento Celular (\%)} = 100 \times [(DO_A - DO_B) / (DO_C)]$$

Onde:

$DO_A$  = Densidade óptica da amostra

$DO_B$  = Densidade óptica do branco (meio sem células)

$DO_C$  = Densidade óptica do controle

#### 4.3.2 Ensaio Migração Celular

O ensaio de migração celular foi padronizado de acordo com Liang *et al.*, (2007). Os fibroblastos humanos foram inoculados em placas de seis compartimentos (meio de cultura DMEM/SFB 1%) e mantidos por 24h em estufa a 37°C, contendo 5% CO<sub>2</sub>. Após incubação foi criada uma ferida na porção central e estendida por todo o diâmetro do poço, com auxílio de uma ponta de micropipeta estéril. Esse procedimento permitiu romper e remover o material celular e extracelular. Todo o meio foi então aspirado e as placas lavadas com PBS (duas vezes) para a adição das amostras e controles. Na sequência as placas foram incubadas (37°C, atmosfera úmida, 5% de CO<sub>2</sub>).

A capacidade de migração celular foi avaliada observando a área da ferida após 6, 9, 12 e 24 horas, utilizando microscópio de fase invertida Nikon Eclipse TE 2000-S, equipado com câmera fotográfica. O tamanho da ferida foi mensurado utilizando *software* do equipamento e a porcentagem de redução foi calculada empregando a fórmula:

**%redução ferida = (100. área Tx/área T0) - 100**

Onde:

Tx= área da ferida em determinado tempo após aplicação da amostra.

T0= área no momento da aplicação da amostra.

#### **4.4 Estudo farmacológico – ensaios *in vivo***

Os ratos foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) - UNICAMP e mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $20\pm 2^{\circ}$  C) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados ratos *Wistar* machos (200-300 g), aclimatados às condições do laboratório por sete dias. Os trabalhos desenvolvidos com animais de laboratório no CPQBA- UNICAMP foram monitorados pela veterinária Msc. Karin Maia Monteiro e supervisionado pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, da Divisão de Farmacologia & Toxicologia do CPQBA-UNICAMP.

Os hamsters machos *Golden sirian (Mesocricetus auratus)*, com massa corpórea entre 150 a 200 gramas, foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos a temperatura de  $25^{\circ}$  C e ciclos claro-escuro de 12 horas. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*, sendo a alimentação balanceada à base de sementes e cereais, como aveia, milho, semente de girassol e abóbora. Os trabalhos desenvolvidos com hamsters foram supervisionados pela Profa. Dra. Renata Carvalho Leitão do Departamento de Farmacologia e Fisiologia da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Os protocolos foram elaborados em concordância com os Princípios Éticos utilizados na Experimentação Animal, adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de laboratório (SBCAL). Esses protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (Protocolo número 1900-1) (Apêndice 1).

#### **4.4.1 Mucosite gastrointestinal**

##### **4.4.1.1 Modelo experimental**

A mucosite gastrointestinal foi induzida com o quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU) (90 mg/Kg) pela via intraperitoneal (i.p.) nos dias 8, 9 e 13 do ensaio. Os animais foram tratados pela via oral (v.o.) diariamente com as amostras ou solução salina NaCl 0,9% (controle negativo), com início do tratamento 7 dias antes do início da administração de 5-FU. No décimo sexto dia os animais foram submetidos à eutanásia para avaliação da mucosa gastrointestinal.

##### **4.4.1.2 Grupos experimentais (8 animais cada)**

- Grupos Amostra: tratados diariamente por via oral com extrato de *A. chica* nas doses de 100, 300 ou 1000 mg/Kg, além de 5-FU via i.p. no oitavo, nono e décimo terceiro dia do ensaio. Nos dias da administração do 5-FU, o tratamento foi realizado uma hora antes da injeção do quimioterápico.
- Grupo Controle: os animais receberam diariamente solução salina 0,9% v.o. e 5-FU via i.p. no oitavo, nono e décimo terceiro dia.
- Grupo Satélite: os animais não foram submetidos a nenhum tratamento.

##### **4.4.1.3 Parâmetros avaliados para o estudo da prevenção da mucosite gastrointestinal induzida por 5-fluorouracil**

O peso dos animais e a quantidade de ração consumida foram avaliados no primeiro e último dias do experimento e nos dias de administração do quimioterápico. Foram realizadas coletas de sangue no início e final do experimento (dias 2 e 15) para monitoramento de eritrócitos, leucócitos e plaquetas.

Na avaliação clínica foram monitorados a presença de piloereção, aparência da mucosa oral e o estado geral dos animais (capacidade de resposta, letargia). A presença de diarreia foi descrita conforme o grau de intensidade, sendo classificada em cruzes: diarreia leve (+); diarreia moderada (++); diarreia intensa (+++).

Após eutanásia foi avaliada a aparência do trato gastrointestinal e os pesos de fígado, baço, coração, rins, adrenais, ovários, útero e pulmões foram aferidos para avaliação do peso relativo (peso do órgão em relação ao peso do animal).

#### **4.4.2 Mucosite oral**

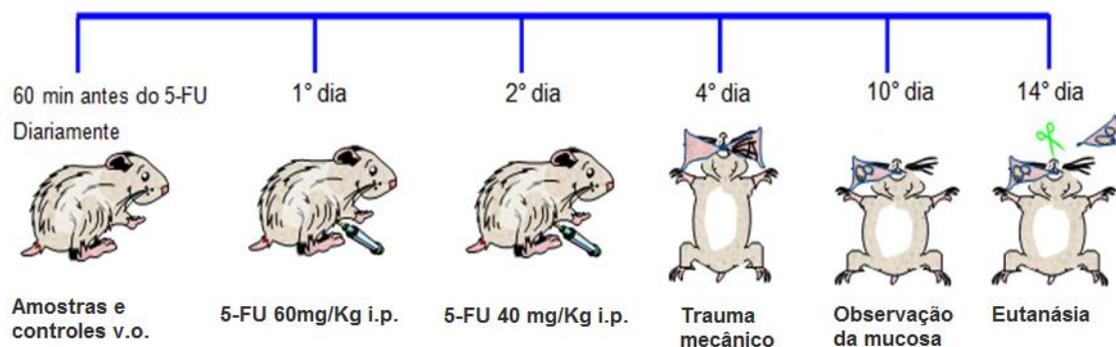
##### **4.4.2.1 Modelo experimental**

Empregou-se o modelo de mucosite oral experimental, desenvolvido por Sonis *et al.* (1990), adaptado no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina – UFC (Lima *et al.*, 2005; Leitão *et al.*, 2007). A mucosite oral foi induzida em hamsters pela administração de 5-fluorouracil (5-FU) no 1º e 2º dia do experimento (60 e 40 mg/kg, i.p., respectivamente). No 4º dia, após anestesia com tribromoetanol 2,5% (1 mL/0,1 Kg; i.p.), as mucosas jugais dos animais foram expostas (Figura 13) e escoriadas mecanicamente, com o auxílio de uma agulha com ponta romba, conferindo um trauma mecânico (TM). As ranhuras foram distribuídas em número de três no sentido horizontal e duas nas extremidades verticais, em ambas as faces das mucosas.



**Figura 13:** fotografia da mucosa jugal de hamster exposta para realização da escoriação mecânica.

No 10º dia os animais foram anestesiados para avaliação da mucosa. Os animais foram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica, no 14º dia do modelo experimental (Figura 14).



**Figura 14:** esquema ilustrativo do protocolo experimental de mucosite oral induzida por 5-FU em hamsters. Os animais foram tratados diariamente com salina ou extrato de *A. chica* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg. Nos dias 1 e 2 receberam doses de 60 e 40 mg/kg de 5-FU, respectivamente. No 4º dia foram feitas escoriações nas mucosas jugais direitas dos animais. Os animais foram eutanasiados no 14º dia do ensaio para retirada da mucosa jugal (adaptado de Medeiros, 2010).

#### 4.4.2.2 Grupos experimentais (10 animais cada):

- Grupos Amostra: tratados diariamente por via oral (v.o) com extrato de *A. chica* nas doses de 250, 500 ou 1000 mg/Kg, além de 5-FU via i.p. no primeiro e segundo dia. Nos dias da administração do 5-FU, o tratamento foi realizado uma hora antes da injeção do quimioterápico.
- Grupo Controle: receberam diariamente solução salina 0,9% v.o. e 5-FU via i.p. no primeiro e segundo dia.
- Grupo Trauma Mecânico (TM): tratados diariamente com solução salina 0,9% v.o. e no primeiro e segundo dia do experimento pela via i.p. (em substituição ao 5-FU).

#### 4.4.2.3 Parâmetros avaliados para o estudo do efeito na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil

##### A- Análise macroscópica das mucosas jugais

Os animais foram eutanasiados no 14º dia do ensaio e suas mucosas jugais foram expostas para a análise macroscópica. Os parâmetros avaliados foram presença e intensidade de eritema, hiperemia, hemorragia, úlceras e abscessos, classificados conforme escores padronizados por Sonis *et al.* (2000):

- *Score 0:* mucosa completamente saudável. Sem erosão ou vasodilatação.
- *Score 1:* presença de eritema, mas sem evidência de erosão da mucosa.
- *Score 2:* eritema severo, vasodilatação e erosão superficial.
- *Score 3:* formação de úlceras em uma ou mais faces, mas não afetando mais de 25% da área de superfície da bolsa. Severo eritema e vasodilatação.
- *Score 4:* formação cumulativa de úlceras de cerca de 50% da área de superfície da bolsa.

- *Score 5*: ulceração completa da mucosa da bolsa. Impossibilidade de exposição da mucosa.

### **B- Análise histopatológica das mucosas jugais**

As mucosas jugais removidas após eutanásia foram fixadas em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas, seguido de inclusão em parafina, preparo das lâminas a partir de cortes seriados de 4  $\mu$ m de espessura, e finalmente as lâminas foram coradas pelo método hematoxilina-eosina. As análises foram realizadas em microscópio óptico (x 40), avaliando-se aspectos inflamatórios como presença e intensidade do infiltrado celular, dilatação e ingurgitamento vascular, hemorragia, edema, úlceras e abscessos, classificados de acordo com escores padronizados (Leitão *et al.*, 2007; Lima *et al.*, 2005):

- *Score 0*: epitélio e tecido conjuntivo sem vasodilatação; infiltrado celular ausente ou discreto; ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Score 1*: ingurgitamento vascular discreto; áreas de re-epitelização; infiltrado celular discreto, com maior número de leucócitos mononucleares, ausência de hemorragia, de edema, de úlceras e abscessos.
- *Score 2*: ingurgitamento vascular moderado; degeneração hidrópica epitelial (vacuolização); infiltrado celular moderado, com predomínio de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema e de eventuais úlceras pequenas; ausência de abscessos.
- *Score 3*: ingurgitamento vascular acentuado; vasodilatação acentuada; infiltrado celular acentuado, com maior número de leucócitos polimorfonucleares; presença de áreas hemorrágicas, de edema, de abscessos e úlceras extensas.

### **C- Avaliação de peso e sobrevida**

Para avaliar a variação do peso dos animais durante o experimento, o peso inicial (do primeiro dia) de cada grupo foi considerado 100%. O percentual de peso corporal foi calculado a partir da fórmula:

$$\%P = P_x \cdot 100 / P_{\text{basal}}$$

Onde:

%P= Percentual de peso corporal;

P<sub>x</sub>= Peso dos animais nos diferentes dias (g);

P<sub>basal</sub>= Peso basal (g) dos animais no primeiro dia do experimento.

A sobrevida corresponde à porcentagem dos animais vivos durante o período experimental. Diariamente registrou-se a mortalidade para avaliar a taxa de sobrevida de cada grupo, onde a quantidade inicial de animais foi considerada 100%.

#### **4.4.3 Úlcera Induzida por etanol/HCL**

Após um período de 12 horas de jejum com acesso livre à água, grupos de 6 ratos, pesando em média 250 g, foram tratados por via oral (v.o.) com solução salina 0,9% (10 mL/kg; controle negativo), carbenoxolona (200 mg/kg; controle positivo), nanopartículas de *Arrabidaea chica* (30, 100 ou 300mg/kg) ou nanopartículas vazias (300 mg/kg). Após 60 minutos do tratamento, foi administrado 1 mL de etanol 60%/HCl 150mM (v.o.). Os animais foram submetidos à eutanásia uma hora depois, por deslocamento cervical. Os estômagos foram retirados, abertos ao longo da maior curvatura e lavados em solução salina 0,9% para posterior contagem e avaliação das lesões ulcerativas. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado, para cada animal, por meio da somatória dos parâmetros descritos na Tabela 5 (Monteiro, 2006; Donatini *et al.* 2009).

**Tabela 5:** parâmetros para avaliação das lesões ulcerativas no estômago.

<b>Parâmetro</b>	<b>Pontuação</b>
Perda de pregas da mucosa	1 ponto
Descoloração da mucosa	1 ponto
Edema	1 ponto
Hemorragias	1 ponto
Petéquias ( $\leq 10$ )	2 pontos
Petéquias ( $> 10$ )	3 pontos
Úlceras até um milímetro	*n x 2 pontos
Úlceras maiores que um milímetro	*n x 3 pontos
Úlceras perfuradas	*n x 4 pontos

\*n refere-se ao número de lesões observadas.

A porcentagem de redução do ILU dos grupos em relação ao controle salina foi calculada empregando a fórmula:

$$\text{Redução (\%)} = 100 \times [(\text{ILU salina} - \text{ILU grupo}) / \text{ILU salina}]$$

#### 4.4.4 Úlcera induzida por indometacina

Após um período de 12 horas de jejum com acesso livre à água, grupos de 6 ratos, pesando em média 250 g, foram tratados por via oral (v.o.) com solução salina 0,9% (10 mL/kg; controle negativo), Ranitidina (50 mg/kg; controle positivo) ou nanopartículas de *Arrabidaea chica* (200 mg/kg). Após 60 minutos do tratamento, todos os animais recebem, por via subcutânea, o agente ulcerogênico (Indometacina, 40 mg/Kg). Após 6 horas da administração do agente lesivo (indometacina), os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os estômagos foram lavados e abertos ao longo da maior curvatura, desprezando o conteúdo gástrico. O índice de lesões ulcerativas (ILU) foi calculado por meio da somatória dos parâmetros descritos na Tabela 5.

#### 4.4.5 Atividade cicatrizante em úlceras de pele

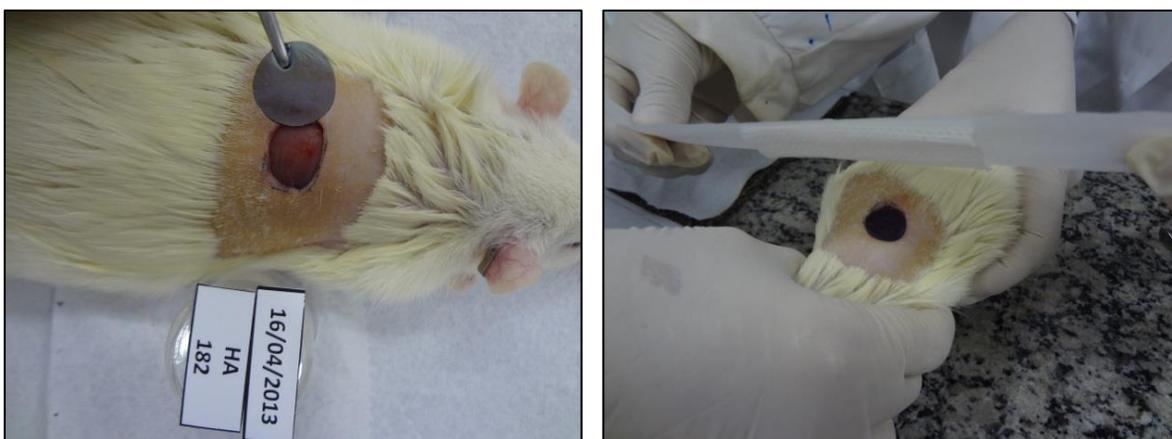
##### A- Modelo experimental

Foram utilizados ratos *Wistar* pesando em média 250 g. Após a anestesia por tiopental (50 mg/Kg; i.p.), o dorso dos animais foi tricotomizado e desinfetado com etanol 70%. Úlceras cutâneas medindo em média 2,25 cm<sup>2</sup> foram produzidas e tratadas pela via tópica diariamente com as amostras ou controles, durante 10 dias (Jorge *et al.* 2010). Os filmes de PVA foram aplicados na ferida (Figura 15) juntamente com 200 µL de solução salina 0,9%.



**Figura 15:** foto ilustrativa da aplicação do filme de PVA no teste de cicatrização cutânea (dia 1).

O hidrogel (xerogel hidratado com solução salina) foi aplicado na ferida juntamente com curativos não aderentes (gaze e fita microporosa) para garantir a fixação da amostra (Figura 16).



**Figura 16:** fotos ilustrativas da aplicação do hidrogel no teste de cicatrização cutânea.

Para o cálculo da porcentagem de redução (contração) da área inicial da lesão, as úlceras cutâneas de cada animal foram fotografadas diariamente, onde a distância entre a lente da máquina e os animais foi pré-estabelecida e mantida constante com o auxílio de um tripé durante todo experimento.

O tamanho da área da úlcera foi calculado a partir da análise das imagens com auxílio do programa ImageJ (Figura 17). No 11º dia os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento da anestesia. O tecido da região da lesão de cada animal foi retirado para análise histopatológica.



**Figura 17:** foto ilustrativa da medição da área da ferida com auxílio do programa ImageJ.

## **B- Grupos experimentais (6 animais cada)**

- Grupos Amostra: tratados diariamente por via tópica com filmes de PVA ou hidrogel carregados com 0,5; 1 ou 1,5 mg de nanopartículas de *A. chica*.
- Grupo Controle Positivo: tratados diariamente por via tópica com 200 µL de Alantoína 10 mg/mL.
- Grupo Controle Veículo: receberam diariamente filmes de PVA ou hidrogel sem nanopartículas.
- Grupo Controle Salina: receberam diariamente 200 µL de solução NaCl 0,9%.

### **4.5 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), considerando-se como nível crítico  $p < 0,05$  para que fosse considerada diferença significativa entre os grupos controle e tratados, seguida do Teste de Tukey.

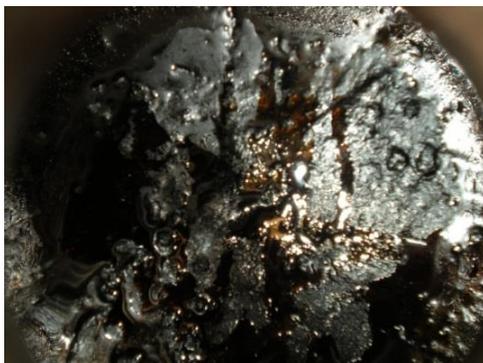
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Etapa fitoquímica

#### 5.1.1 Produção dos extratos padronizados

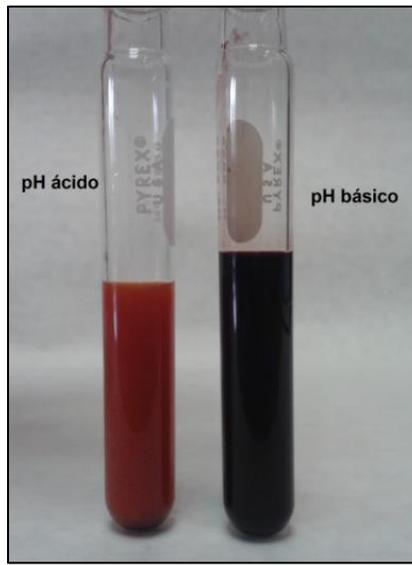
Os processos extrativos realizados em escala piloto (a partir de 1 Kg de planta seca) ou laboratorial (até 500 g de planta seca) resultaram em amostras com perfil semelhante, com rendimento de 15,7% na escala laboratorial contra 18,5% na escala piloto.

A neutralização do extrato (pH 7,0 - 7,2), realizada antes da secagem, resultou na formação de um material polimerizado com aspecto pastoso e coloração escura, pouco solúvel em água ou álcool (Figura 19).

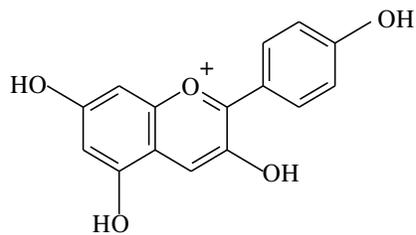


**Figura 19:** foto ilustrativa do aspecto do produto em decomposição do extrato de *A. chica* em pH > 7,0.

Valores básicos de pH resultaram na degradação das antocianinas afetando a coloração do extrato, que se tornou escurecido. Em meio ácido o extrato apresentou coloração vermelha, típica da presença das antocianinas (Figura 20). Como a estabilidade da estrutura da antocianina (Figura 21) é favorecida em meios ácidos, estipulou-se neutralizar o extrato de *A. chica* a valores de pH de até 6,0-6,5 para evitar perdas.



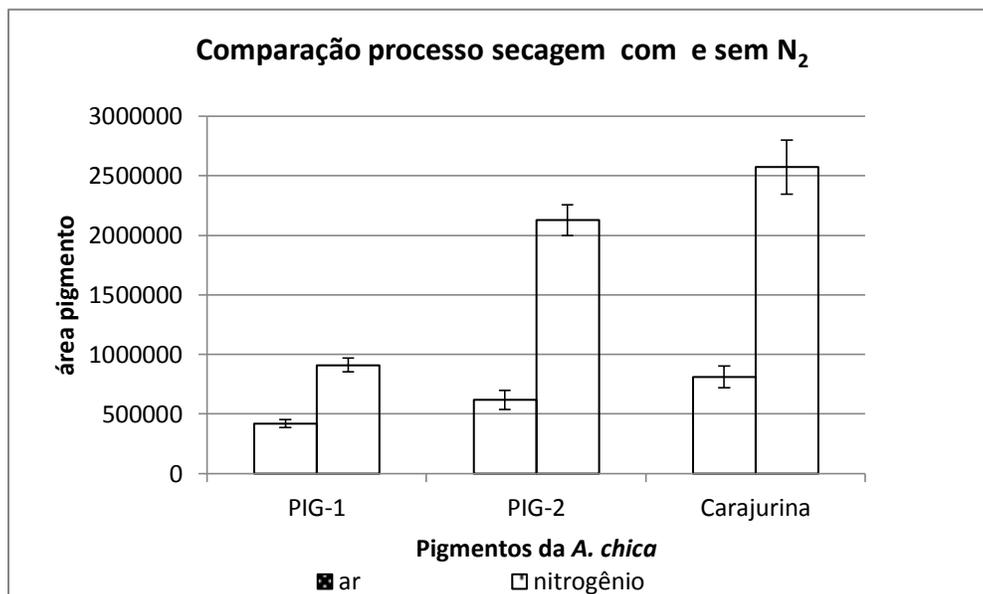
**Figura 20:** foto ilustrativa da comparação do aspecto do extrato de *A. chica* em meio ácido (coloração vermelha) ou básico (escurecido).



**Figura 21:** estrutura química da antocianidina evidenciando o cátion flavílio, cuja estabilidade é favorecida em meios ácidos.

### 5.1.2 Processo de secagem em *Spray Dryer*

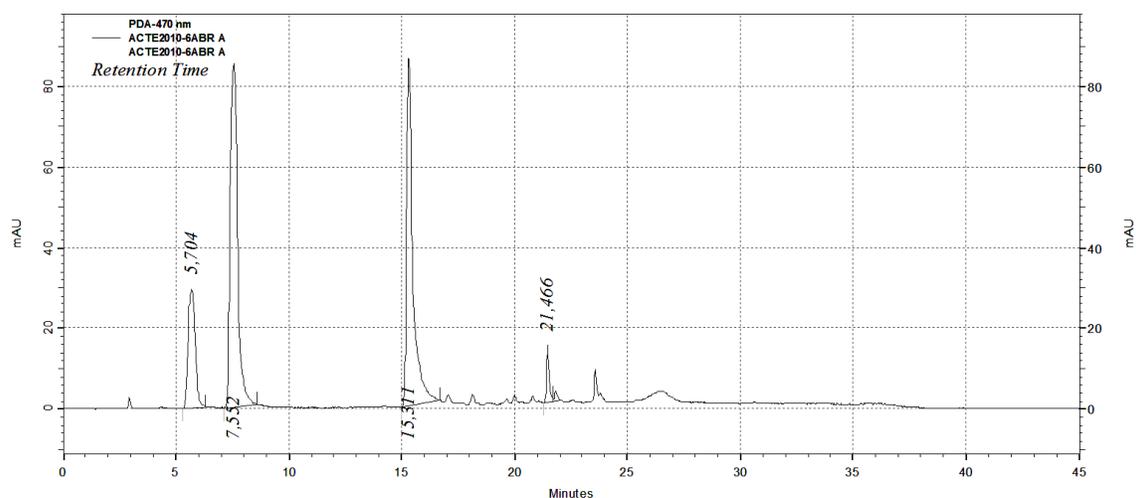
No processo de secagem do extrato por *spray drying* ao se comparar a secagem em ambiente inerte (nitrogênio) ou em atmosfera normal (oxigênio), observou-se que as amostras processadas em nitrogênio apresentaram maiores concentrações dos três pigmentos analisados. A concentração do pigmento carajurina foi 70% maior na amostra processada em nitrogênio quando comparada às amostras processadas em oxigênio (através de análises realizadas em CLAE-DAD) (Figura 22).



**Figura 22:** comparação da área dos pigmentos do extrato proveniente dos processamentos de secagem por *spray drying* com ou sem nitrogênio.

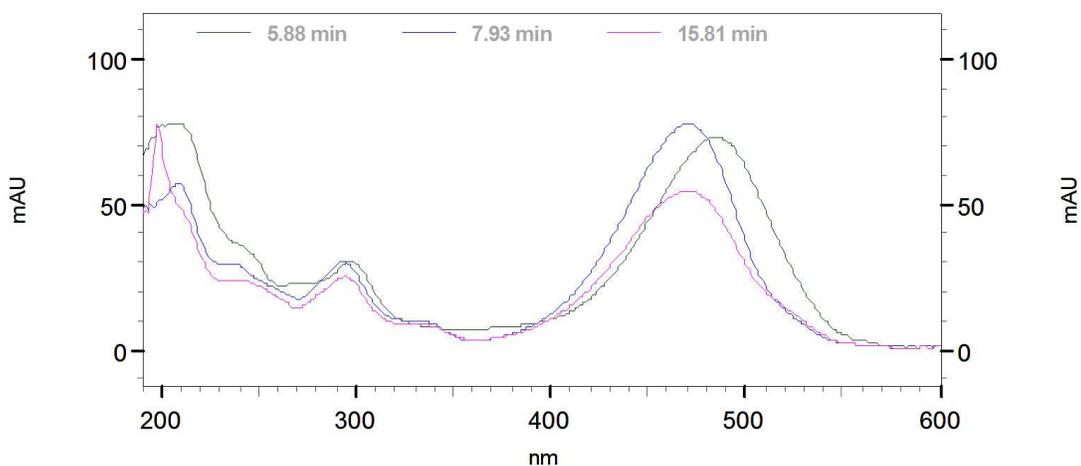
### 5.1.3 Monitoramento químico

O monitoramento químico dos extratos foi realizado por CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD). Previamente à análise, eliminaram-se as clorofilas e graxas utilizando cartucho C-18. Nas condições de análise, as três deoxiantocianidinas foram observadas respectivamente nos tempo de retenção TR=5,8min (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio), TR=7,9min (6,7,4'-trihidoxi-5-metoxiflavilio) e TR=15,8min (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina) detectados no UV/Vis a 470 nm (Figuras 23 e 24).



**Figura 23:** cromatograma do extrato bruto de *A.chica*, cromatógrafo *Shimadzu*, coluna *C18 Gemini*,  $\lambda=470\text{nm}$ , fluxo  $1\text{ mL/min}$ , forno  $35^\circ\text{C}$  e *Software Class VP-5*, (TR=5,8min) (6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio) (TR=7,9min) (6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilio) e (TR=15,8) (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavilio carajurina).

#### Overlaid Spectra

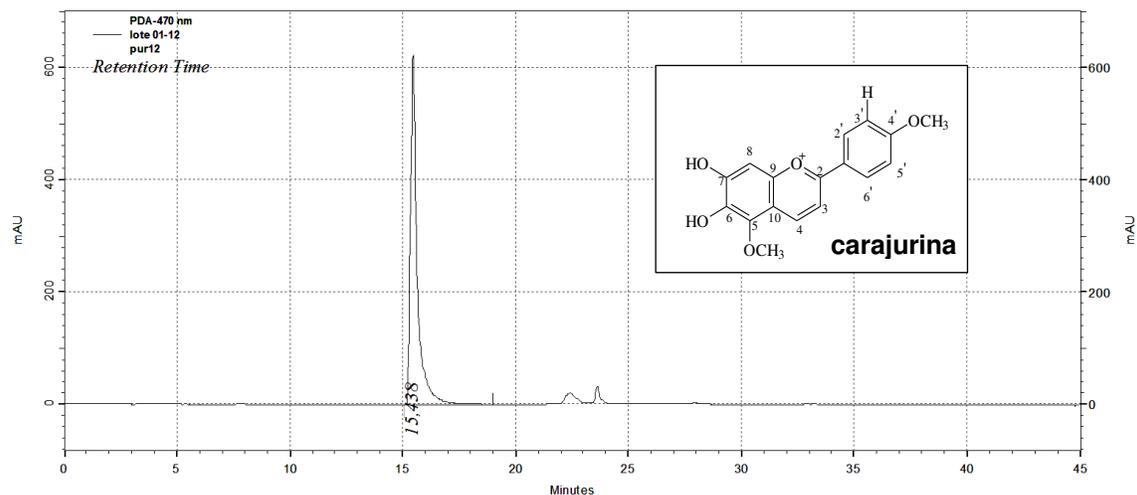


**Figura 24:** espectro (200 a 600nm) observado para as 3 deoxiantocianidinas presentes na *A.chica* ( 6,7,3',4'-tetrahidroxi-5-metoxiflavilio(5,88min), 6,7-trihidroxi-5-metoxiflavilio (7,9 min) e carajurina (15,8min.).

A carajurina, um dos pigmentos de interesse, foi utilizada como marcador para o controle de qualidade das amostras. A carajurina foi isolada por cromatografia em coluna aberta, usando como fase estacionária metil celulose

microcristalina (adsorvente) e como fase móvel gradientes de solventes com polaridade crescentes.

As frações enriquecidas com carajurina foram agrupadas e repurificadas até atingir 92% de grau de pureza, conferido por CLAE (Figura 25).



**Figura 25:** cromatograma obtido em cromatógrafo *Shimadzu*, coluna *C18 Gemini*,  $\lambda=470\text{nm}$ , fluxo  $1\text{ mL/min}$ , forno  $35^\circ\text{C}$  e *Software Class VP -5*, ( $\text{TR}=15,4$ ) (6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxiflavílio carajurina).

## 5.2 Etapa tecnológica

### 5.2.1 Partículas de quitosana

Na produção de partículas de quitosana por reticulação foram avaliados parâmetros como o agente reticulante adicionado, proporções de massa e volume entre os polímeros, além do método e velocidade de agitação. Esses parâmetros foram monitorados visando identificar as melhores condições para obtenção de nanopartículas.

#### 5.2.1.1 Partículas de quitosana reticuladas com tripolifosfato (TPP)

O reticulante TPP foi adicionado à solução de quitosana por gotejamento, empregando agitação constante. Utilizou-se uma solução de quitosana a  $1\text{ mg/mL}$ .

### **A) Influência da proporção de massa (TPP/quitosana; m/m)**

Foram avaliadas distintas proporções de massa do reticulante TPP em relação à quitosana, desde 0,1 até 25% (m/m). As menores proporções avaliadas (0,1-1%) resultaram em amostras instáveis, com formação de precipitados. De 5 a 25% obtiveram-se partículas com tamanho médio variando de 390 a 530 nm e potencial zeta entre +45 e +54 mV. Os melhores resultados para as proporções de massa entre os polímeros foi de 10 a 20% de TPP em relação à quitosana.

### **B) Influência da proporção de volume (TPP/quitosana; v/v)**

Mantendo fixa a proporção de massa analisou-se a influência do volume de entrecruzante adicionado. A proporção de volume inicialmente utilizada foi de 1:1 (v/v). Na tentativa de diminuir o tamanho das partículas, avaliaram-se distintas proporções de volume entre os polímeros utilizados (1:1 a 1:10), com melhores resultados para a proporção de 1:10.

### **C) Influência do método e velocidade de agitação**

Foram avaliados os métodos de agitação magnética, mecânica e ultrassom de sonda. Os três métodos propiciaram a formação de partículas, porém a agitação mecânica empregando Ultra-turrax® demonstrou-se mais prática e com melhores resultados quanto ao tamanho de partículas. Referente à velocidade de agitação observou-se que a faixa compreendida entre 3200 e 7500 rotações por minuto (rpm) produziu melhor efeito para obtenção das partículas.

## **5.2.2 Obtenção de nanopartículas com extrato de *A. chica***

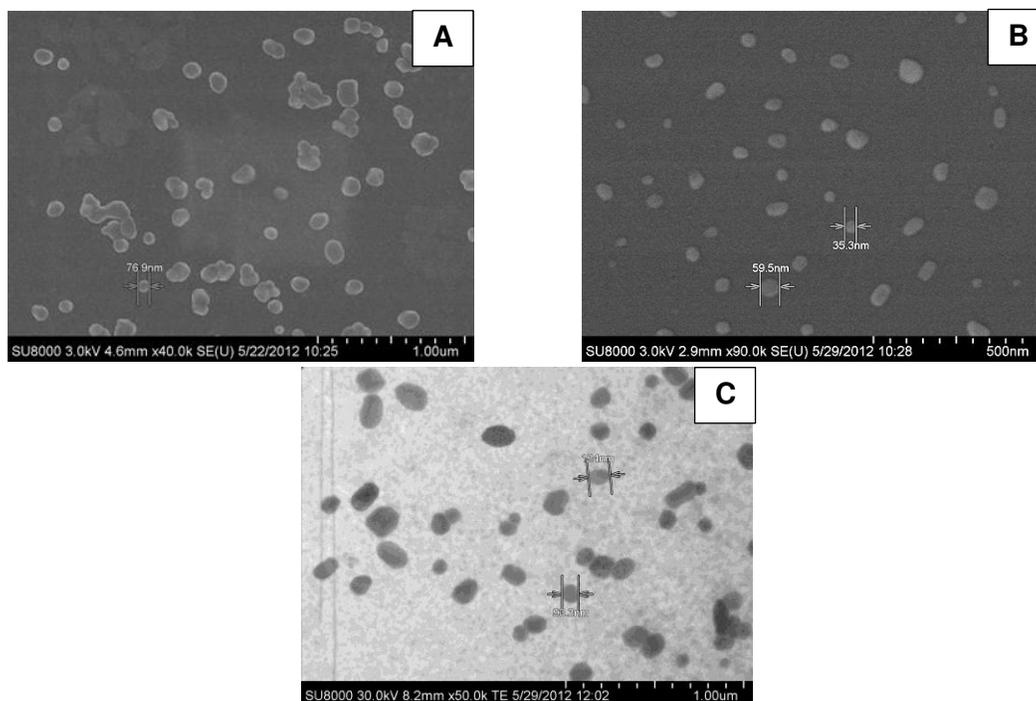
O extrato de *A. chica* foi adicionado à solução de TPP em concentrações de 10 a 25% (proporção em relação à quitosana, m/m). Observou-se que quanto maior a quantidade de extrato adicionada menor o tamanho da partícula (tamanho avaliado por dispersão de luz dinâmica - *Malvern Instruments*) (Tabela 1).

**Tabela 1:** tamanho, polidispersidade e potencial zeta das partículas com diferentes proporções de extrato, avaliadas por dispersão de luz dinâmica (Malvern Instruments).

Proporção de <i>A. chica</i> / quitosana	Tamanho (nm)	Polidispersidade	Potencial Zeta (mV)
Sem <i>A. chica</i>	150	0.18	+ 45.0
10 %	153	0.24	+ 32.7
15 %	125	0.26	+ 32.1
25 %	90	0.3	+ 32.9

Determinadas as condições de encapsulamento, a escala de produção foi aumentada (passando de um volume de 10 pra 100 mL) e com isso obteve-se um tamanho de partícula menor (cerca de 60nm), com um índice de polidispersidade de 0,5 e potencial zeta de +34 mV.

Para caracterização das nanopartículas além das medidas de tamanho e potencial zeta, avaliaram-se também a morfologia através das microscopias de varredura e transmissão. O tamanho nanométrico das partículas foi comprovado pelas imagens de MEV e MET (Figura 26), que demonstram a morfologia esférica dessas partículas.



**Figura 26:** imagens das nanopartículas de quitosana, obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura (a;b) e microscopia eletrônica de transmissão (c).

A eficiência de encapsulação da *A. chica*, calculada a partir do extrato não incorporado as partículas e removido por diálise, foi de 84%.

### 5.2.3 Partículas de quitosana reticuladas com genipina

Neste trabalho a genipina foi avaliada isoladamente ou em mistura com TPP. As partículas obtidas utilizando somente genipina apresentaram tamanho em torno de 1  $\mu\text{m}$  e alta polidispersidade. Empregando a mistura entre genipina/TPP 1:1 (m/m) foram obtidos melhores resultados, com a formação de partículas com tamanho médio de 330 nm e potencial zeta de +58 mV.

A adição do extrato de *A. chica* à mistura de reticulantes produziu partículas com tamanho de 126 nm e potencial zeta de +48 mV.

Na comparação entre os tamanhos de partículas formadas com as diferentes opções de agentes de reticulação, observou-se que entre as opções avaliadas o melhor processo para produção das nanopartículas de quitosana foi empregando TPP como entrecruzante (Tabela 2).

**Tabela 2:** tamanho das partículas formadas com diferentes entrecruzantes, avaliadas por dispersão de luz dinâmica (Malvern Instruments).

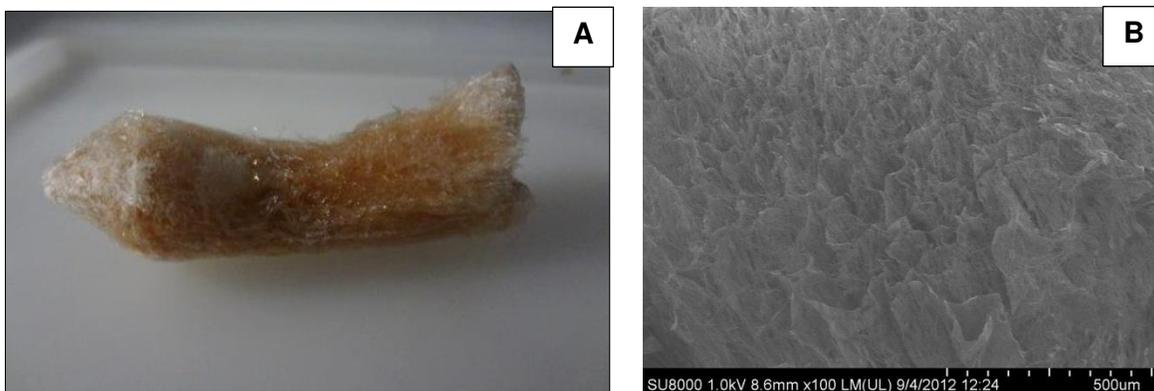
Entrecruzante	Tamanho (nm)	
	Sem extrato de <i>A. chica</i>	Com extrato de <i>A. chica</i>
TPP	150	90
TPP + Genipina	330	126
Genipina	>500	>1000

As nanopartículas utilizadas nos ensaios farmacológicos foram produzidas nas condições: a) Concentração de TPP 20% (m/m) em relação à quitosana; b) Volume TPP/quitosana (1:10; v/v); c) Agitação mecânica 3600 rpm para preparações com menores volumes (até 50 mL) e 7200 rpm para volumes maiores (100 mL). As nanopartículas de *A. chica* foram produzidas com 25% de extrato em relação à quitosana (m/m).

## 5.3 Sistemas de veiculação

### 5.3.1 Esponjas

A liofilização da solução de nanopartículas resultou num produto esponjoso (Figura 27a). A imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (Figura 27b) demonstrou a estrutura porosa da esponja.



**Figura 27:** foto (A) e microscopia eletrônica de varredura (B) da esponja produzida pela liofilização das nanopartículas de quitosana.

### 5.3.2 Filmes de álcool polivinílico (PVA)

A solução aquosa de PVA a 3% foi preparada sob agitação e aquecimento constantes (100° C). A mistura foi filtrada para garantir a ausência de resíduos de PVA.

Para obtenção do filme com a espessura desejada, avaliou-se o volume de solução adicionado ao molde de teflon. Para um molde com diâmetro de 10 cm o volume escolhido foi de 12 mL, que resultou em filmes com espessura de 20-30 µm.

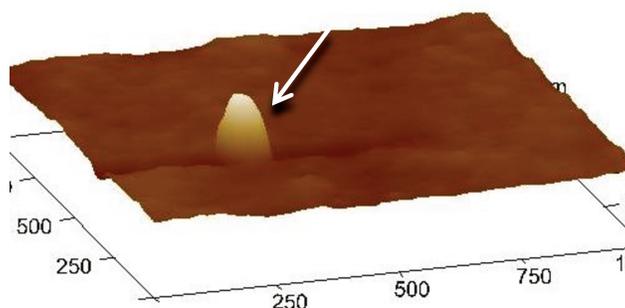
Para incorporação das nanopartículas de *A. chica*, diferentes quantidades destas (0,1-10 mg) foram misturadas com a solução de PVA empregando ultrassom de sonda por aproximadamente um minuto (Figura 28).



**Figura 28:** foto de filme absorvível de PVA carregado com nanopartículas de *A. chica* em molde de 10 cm de diâmetro.

Para os testes de atividade cicatrizante *in vivo* o tamanho do filme foi adaptado para facilitar a aplicação no modelo de cicatrização cutânea em ratos. Foram utilizados moldes de 1 cm de diâmetro que comportaram 500  $\mu\text{L}$  de solução de PVA juntamente com 0,5; 1 ou 1,5 mg de nanopartículas.

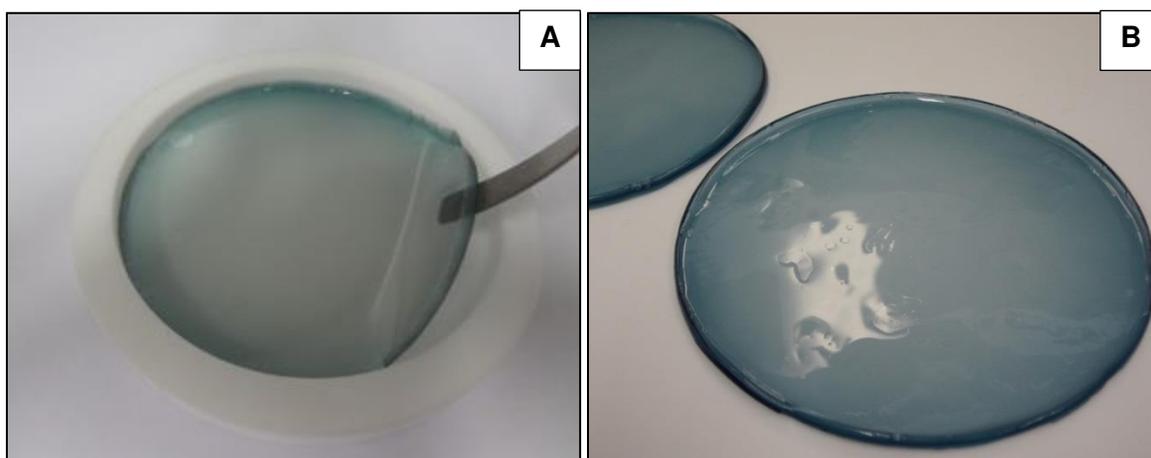
A morfologia da superfície do filme de PVA foi observada utilizando microscopia de força atômica. A porção elevada na imagem (indicada com a seta) refere-se a uma nanopartícula inserida no filme (Figura 29).



**Figura 29:** imagem de filme absorvível de PVA carregado com nanopartículas de *A. chica* observada por microscopia de força atômica.

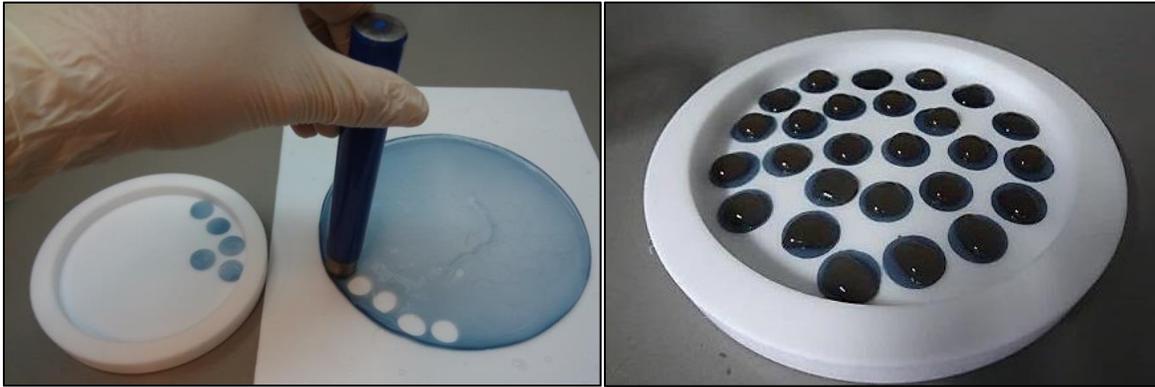
### 5.3.3 Hidrogel

Inicialmente prepararam-se as soluções de gelatina (100 mg/mL) e ácido hialurônico (50 mg/mL). O hidrogel foi obtido a partir da mistura destas soluções numa proporção de seis partes de gelatina para quatro partes de ácido hialurônico, seguida da adição do entrecruzante genipina, em proporções compreendidas entre 0,5 e 5% (em relação à mistura polimérica). Depois de secos (Figura 30a), os filmes (xerogéis) foram lavados com água destilada para retirar resíduos dos componentes que não reagiram. Na Figura 30b está ilustrado o hidrogel intumescido depois da lavagem.



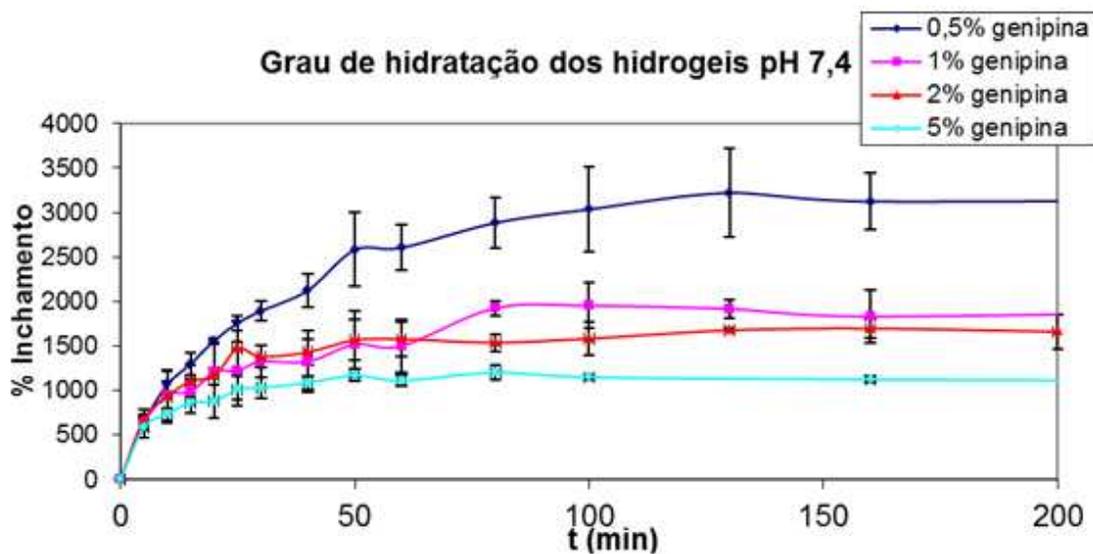
**Figura 30:** foto ilustrativa de xerogel no molde de teflon (A) e hidrogel intumescido após lavagem (B).

A incorporação das nanopartículas foi realizada na superfície do hidrogel após o processo de lavagem. Assim como realizado para o filme de PVA, o tamanho do hidrogel foi adaptado para aplicação no modelo animal, por isso o hidrogel foi cortado em discos de 1 cm de diâmetro com auxílio de um troquel (Figura 31).



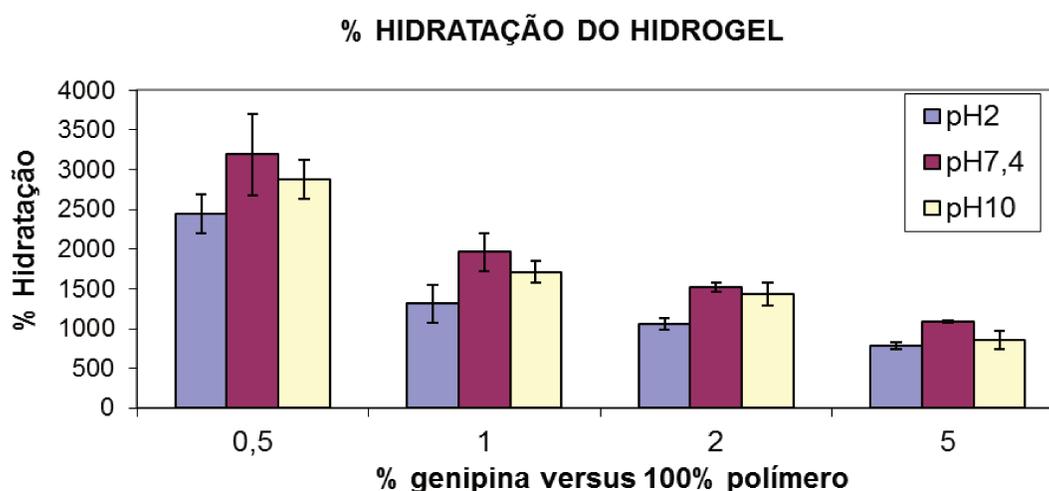
**Figura 31:** foto ilustrativa do corte do hidrogel para adição das nanopartículas na sua superfície.

Observou-se que a capacidade de absorção de água dos hidrogéis a pH 7,4 diminui conforme o aumento da quantidade incorporada de genipina (Figura 32). Em todos os sistemas observou-se um grau máximo de hidratação ou grau de hidratação em equilíbrio (Ortega, 2013).



**Figura 32:** perfil de hidratação dos hidrogéis formados por gelatina:ácido hialurônico (60:40) entrecruzados com distintas concentrações de genipina em PBS (pH = 7.4).

O grau de hidratação em equilíbrio alcançado a valores de pH de 2; 7,4 ou 10 para os hidrogéis entrecruzados com distintas concentrações de genipina, demonstrou uma maior tendência de retenção de água a pH 7.4 (Figura 33) (Ortega, 2013).



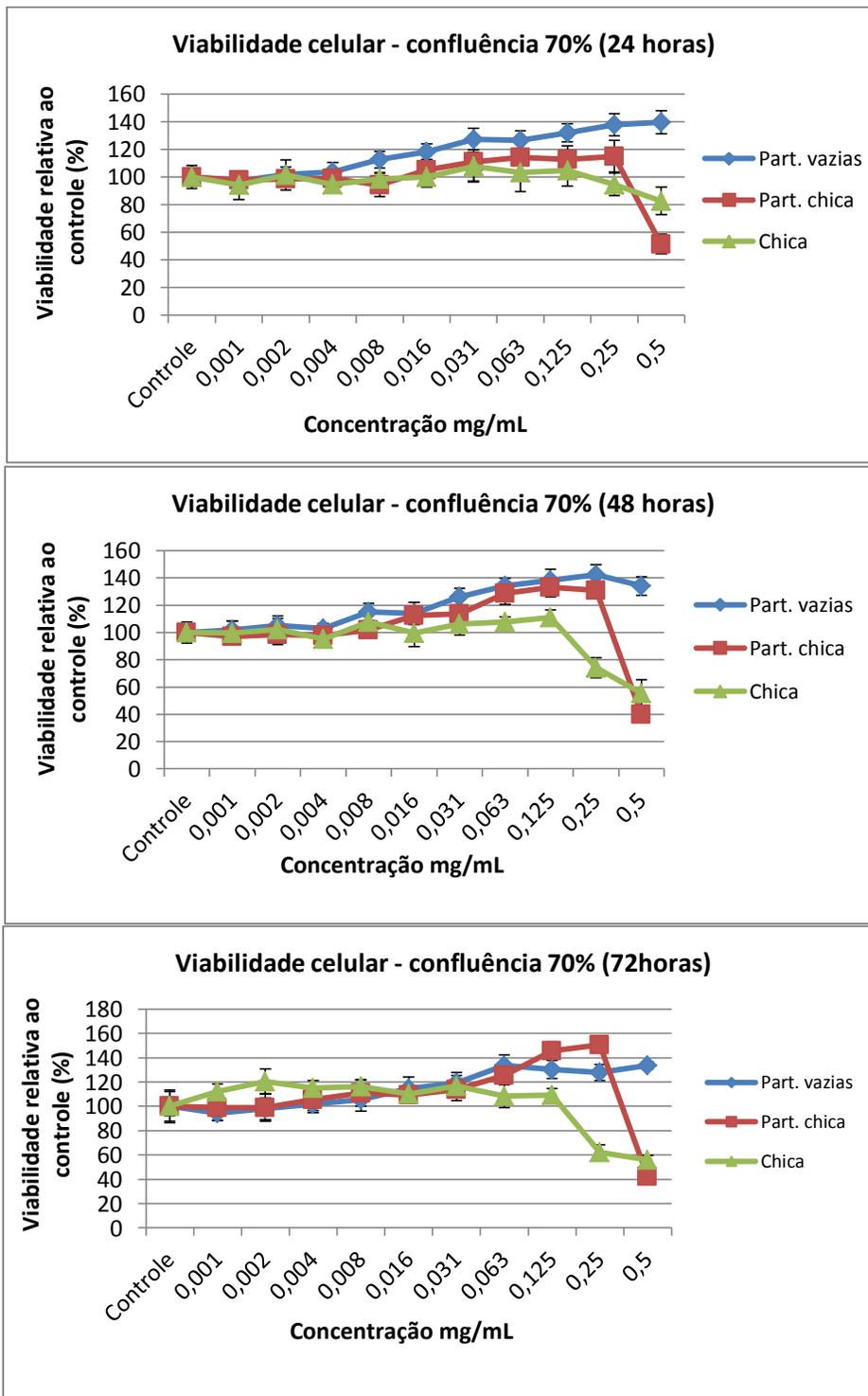
**Figura 33:** grau de hidratação dos hidrogéis formados por gelatina:ácido hialurônico (60:40) entrecruzados com distintas concentrações de genipina e intumescidos a distintos pH.

Para os ensaios farmacológicos foram produzidos hidrogéis entrecruzados com 1% de genipina.

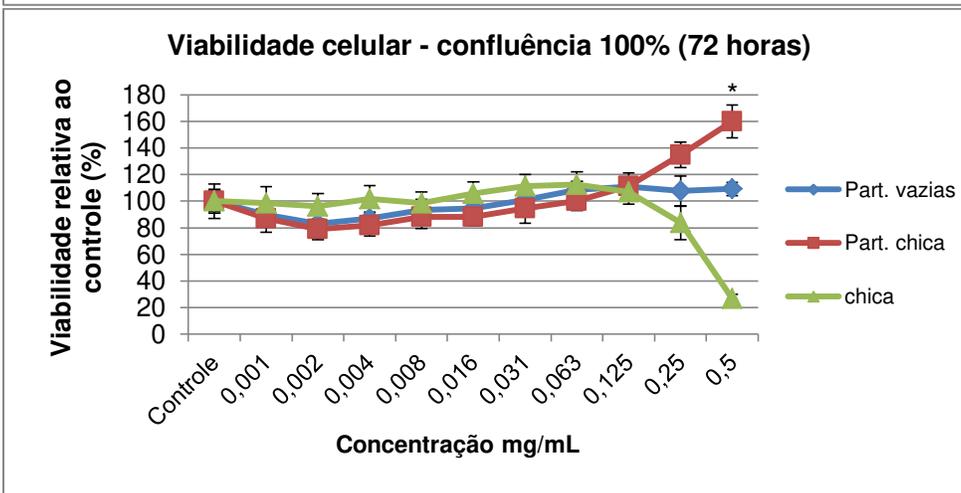
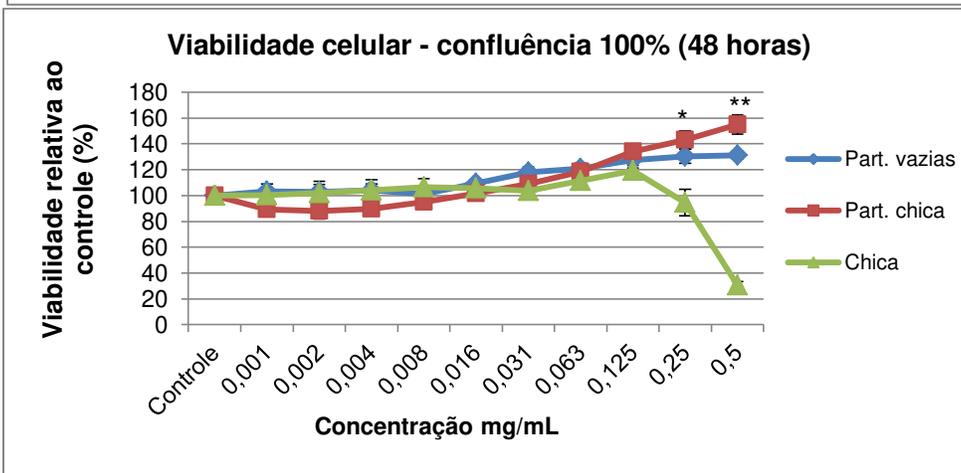
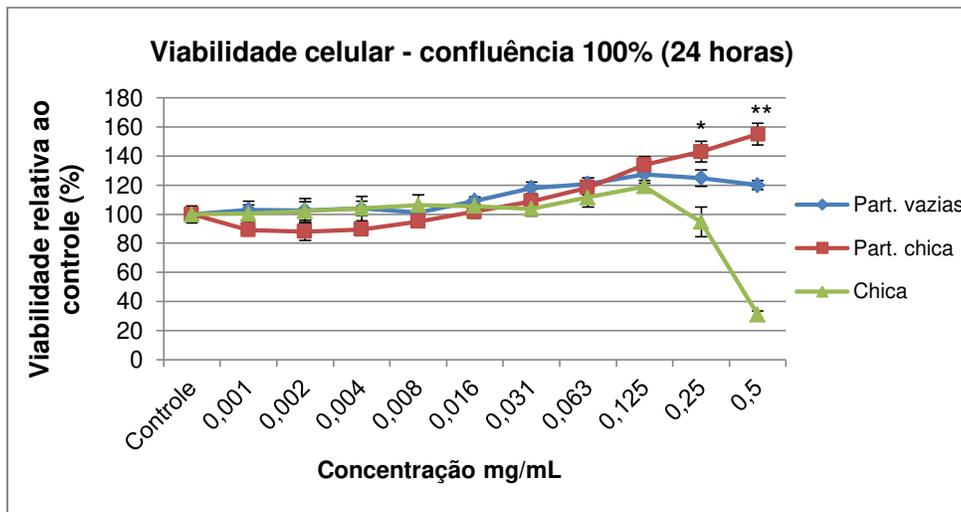
## 5.4 Etapa farmacológica - Ensaio de atividade *in vitro*

### 5.4.1 Testes de viabilidade celular

As nanopartículas de quitosana vazias ou conteúdo extrato de *A. chica*, bem como o extrato na forma livre foram testados em culturas de fibroblastos humanos. Inicialmente o método de viabilidade *in vitro* foi padronizado para determinar as melhores condições para avaliação das amostras. Foram utilizadas diferentes confluências celulares. Confluências inferiores a 50% não apresentaram boas condições para o teste, por isso não foram utilizadas. O perfil de atividade das amostras foi avaliado em placas com confluência de 70 ou 100% (Figuras 34 e 35). Após exposição das amostras por 24, 48 ou 72 horas em placas com confluência inicial de 70%, tanto as nanopartículas de *A. chica* como o extrato na forma livre na dosagem mais alta (0,5 mg/mL) provocaram diminuição da viabilidade celular (Figura 34).



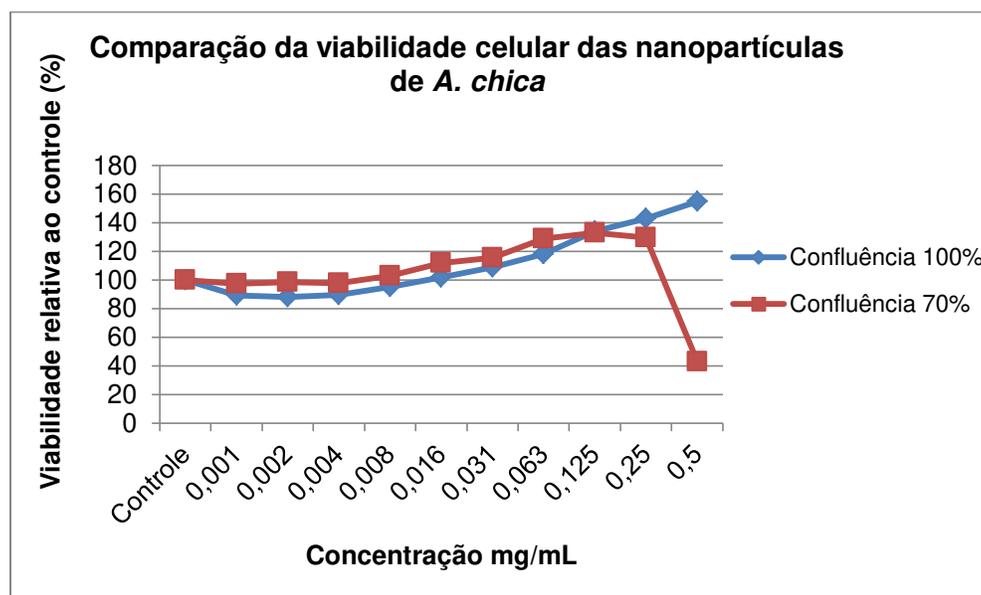
**Figura 34:** gráficos de crescimento celular relativo ao controle após 24,48 ou 72 horas de exposição do extrato de *A. chica*, partículas vazias ou partículas de *A. chica*, com confluência celular de 70%. Resultado expressos em média ± desvio padrão.



**Figura 35:** gráficos de crescimento celular relativo ao controle após 24,48 ou 72 h de exposição do extrato, partículas vazias ou partículas de *A. chica*, com confluência celular de 100%. Resultado: média± desvio padrão. Anova seguido de teste T \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .

Nos ensaios com 100% de confluência observou-se a mesma tendência de atividade para as amostras de extrato de *A. chica* livre e partículas vazias, quando comparado ao teste com confluência menor, no entanto, as partículas de *A. chica* além de manterem a viabilidade celular nas menores concentrações, estimularam a proliferação celular na concentração mais alta, com valores de viabilidade celular de cerca de 160% (Figura 35).

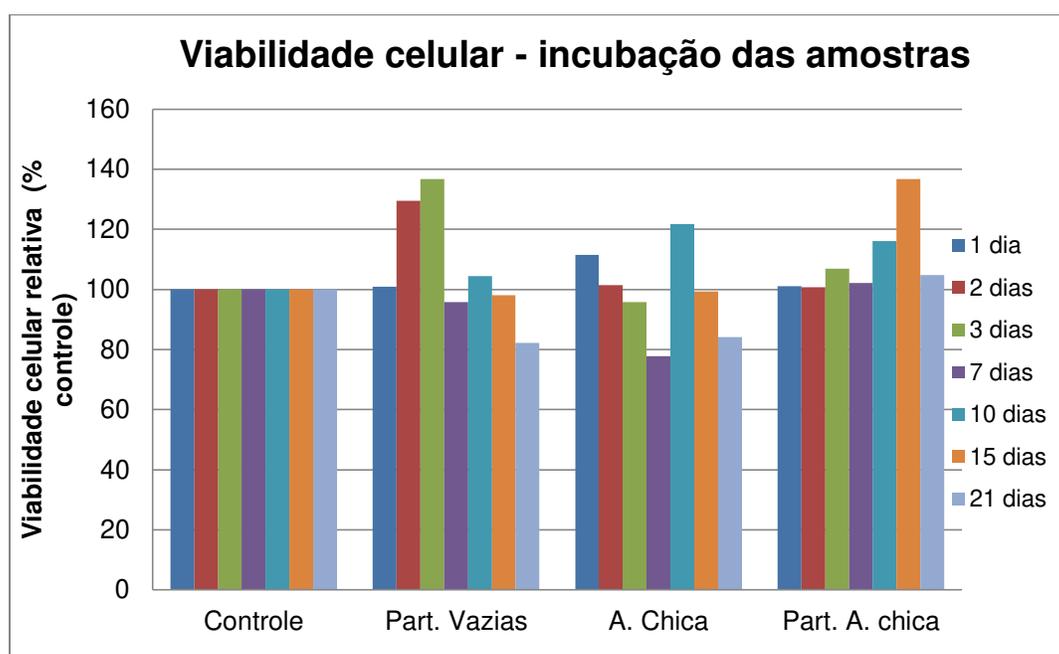
A comparação do perfil de atividade das nanopartículas de *A. chica* nos ensaios celulares com confluência iniciais de 70 ou 100% está demonstrada no gráfico da Figura 36, onde observou-se estímulo da proliferação celular para a amostra testada em poços contendo maior quantidade de células (confluência de 100%) e viabilidade menor que 50% para a mesma amostra quando testada em placas com 70% de confluência celular.



**Figura 36:** gráfico de crescimento celular relativo ao controle das partículas de *A. chica* em ensaios com confluência celular de 70 ou 100%.

#### 5.4.2 Testes de viabilidade celular - incubação das amostras

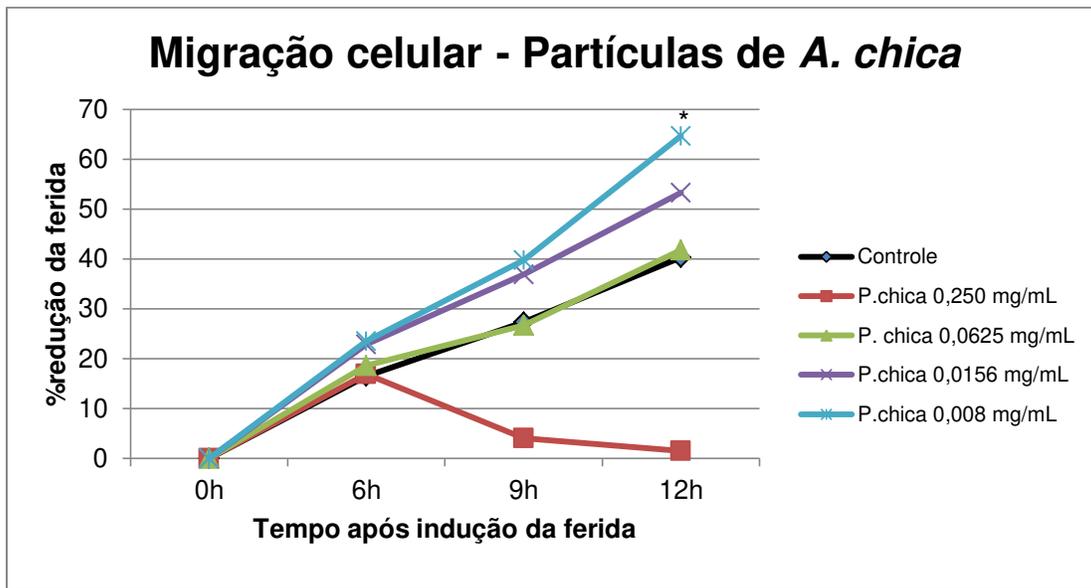
A atividade das amostras quando incubadas em meio de cultivo por tempos determinados foi avaliada através de teste MTT complementar aos outros realizados. A viabilidade relativa ao controle das partículas com e sem *A. chica* e do extrato livre, que ficaram em contato com o meio de cultivo durante 1, 2, 3, 7, 10, 15 ou 21 dias, foi superior a 70% (Figura 37).



**Figura 37:** gráfico de crescimento celular relativo ao controle do extrato de *A. chica*, partículas vazias e partículas de *A. chica* em contato com meio de cultivo por determinados tempos (1 a 21 dias).

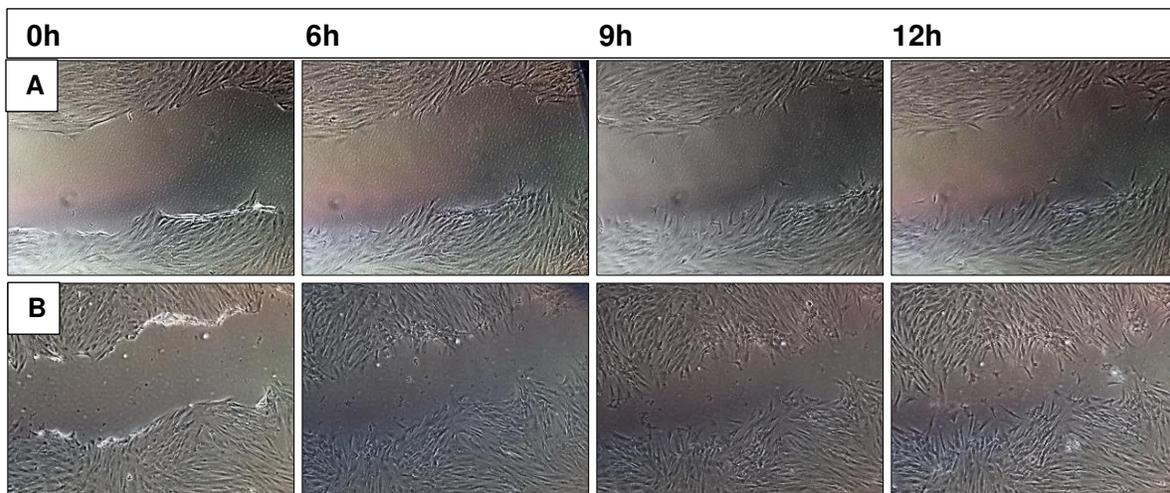
#### 5.4.3 Ensaio de migração celular - cicatrização *in vitro*

Na avaliação da atividade das nanopartículas de *A. chica* na migração de fibroblastos, observou-se que a menor concentração utilizada (0,008 mg/mL) foi a mais ativa, estimulando a cicatrização *in vitro* (Figura 38).



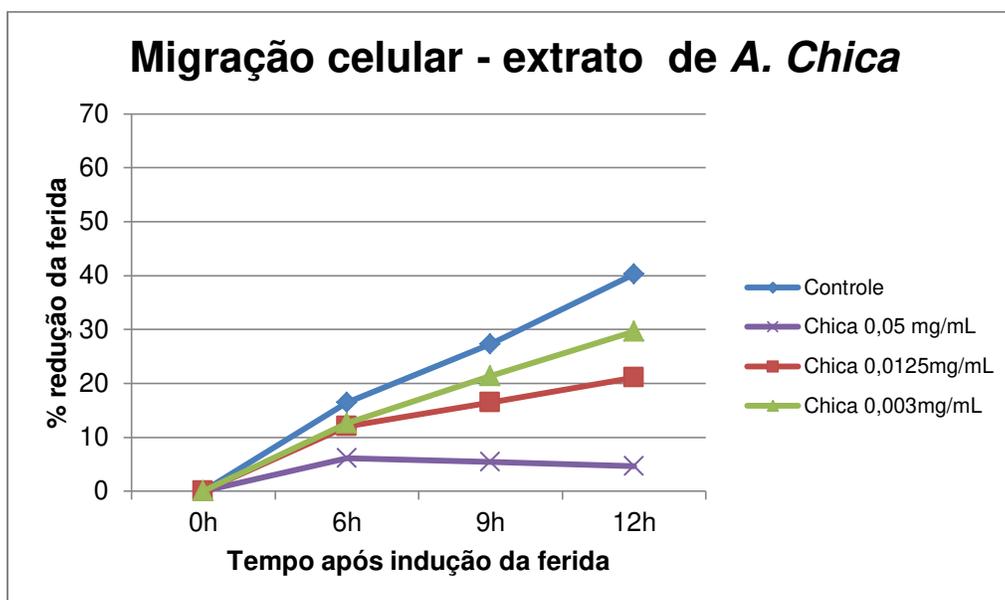
**Figura 38:** gráfico da atividade das partículas de *A. chica* na migração celular em determinados tempos após indução da ferida. Anova seguido de teste T \* $p < 0.05$ .

A diminuição da área da ferida foi observada com o passar do tempo, demonstrando a atividade das nanopartículas em comparação ao controle (Figura 39). A migração celular foi notada logo no primeiro tempo avaliado no ensaio (seis horas). Doze horas após a adição das nanopartículas observou-se migração celular suficiente para o contato entre os dois lados da ferida.



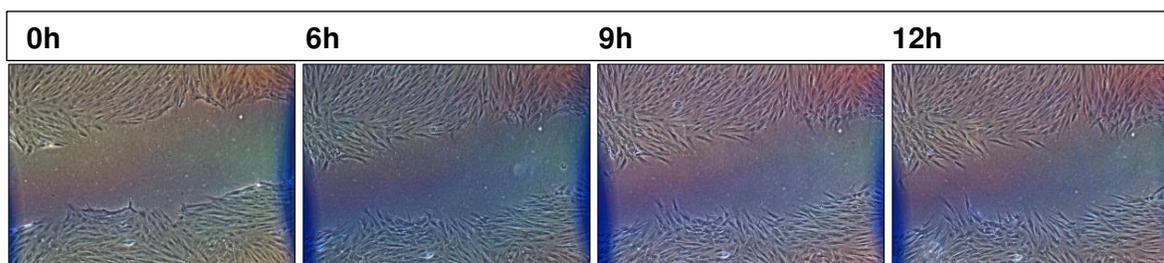
**Figura 39:** fotos ilustrativas da ferida a determinados tempos do ensaio de migração celular: A) células tratadas com meio (controle); B) células tratadas com nanopartículas de *A. chica* 0,008 mg/mL.

O extrato de *A. chica* livre, empregado em concentrações equivalentes à quantidade de extrato presente nas partículas (20 %), produziu migração celular com valores inferiores ao grupo controle (que foi tratado apenas com meio de cultivo) (Figura 40).



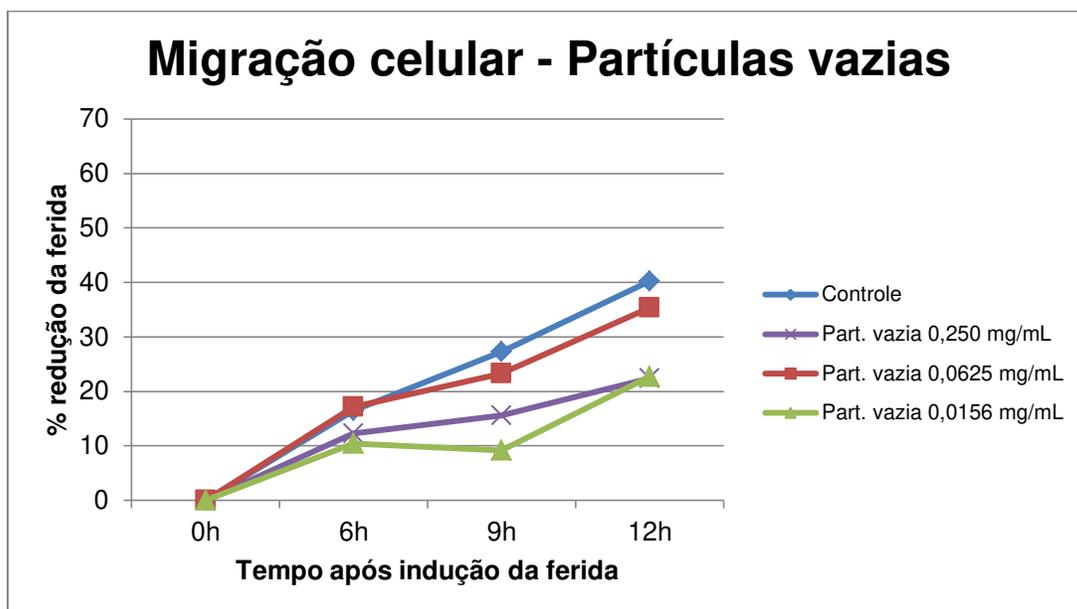
**Figura 40:** gráfico da atividade do extrato de *A. chica* na migração celular em determinados tempos após indução da ferida.

Notou-se uma tendência para diminuição da área da ferida com o extrato de *A. chica*, não superando, no entanto, o observado no grupo controle (Figura 41).

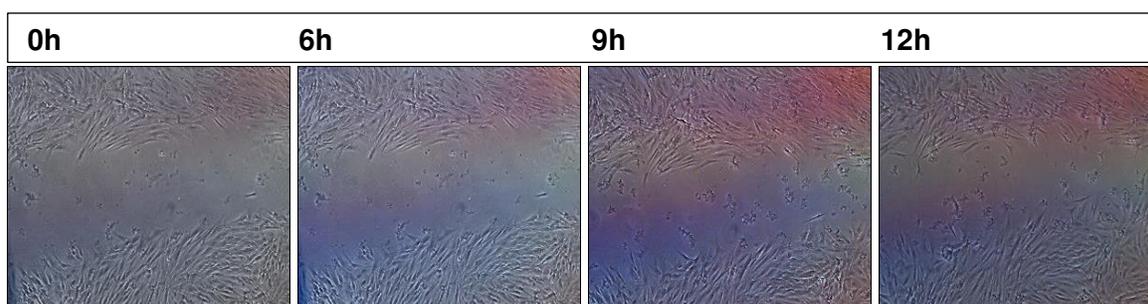


**Figura 41:** fotos ilustrativas da ferida a determinados tempos do ensaio de migração celular, tratadas com extrato de *A. chica*.

Assim como o extrato de *A. chica* livre, as nanopartículas vazias demonstraram não estimular a migração dos fibroblastos (Figuras 42 e 43).

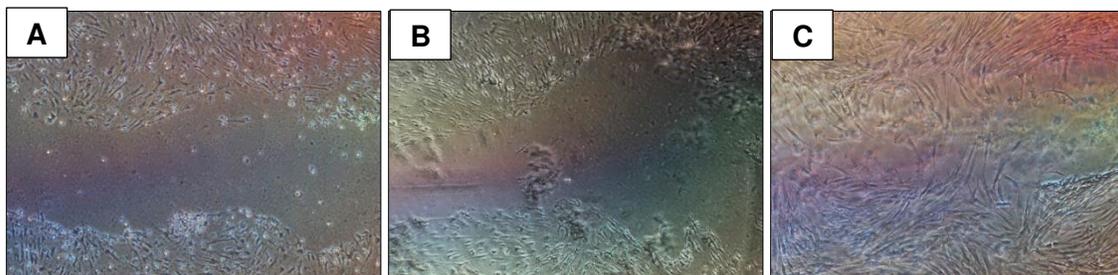


**Figura 42:** gráfico da atividade das partículas vazias na migração celular em determinados tempos após indução da ferida



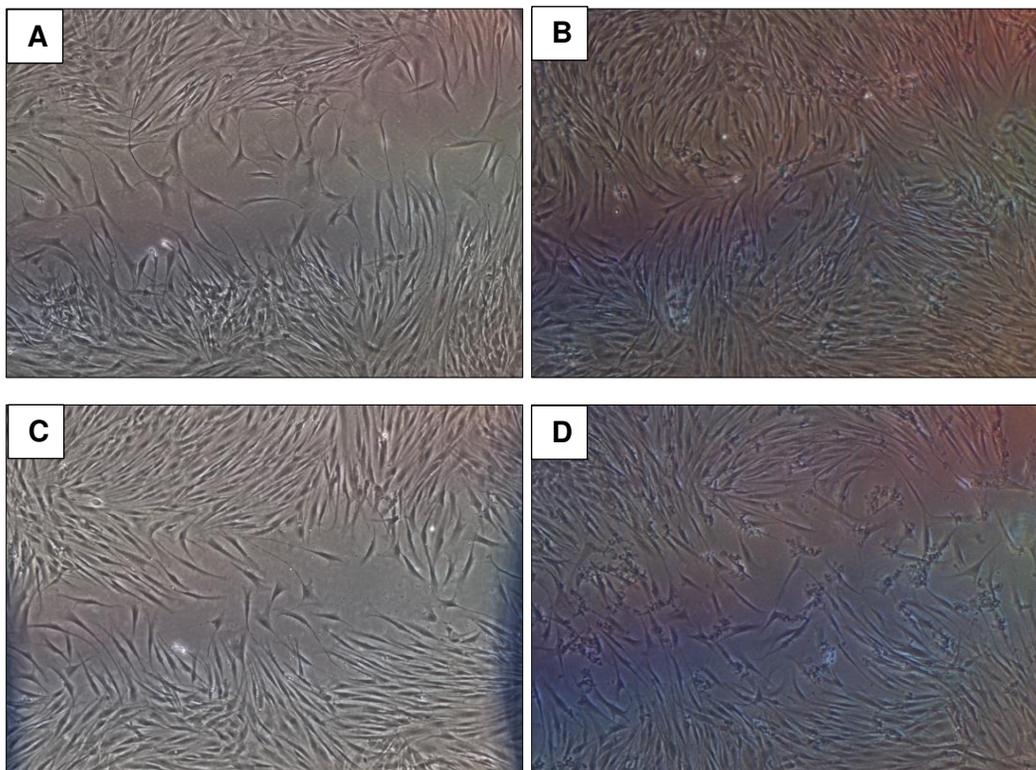
**Figura 43:** fotos ilustrativas da ferida a determinados tempos do ensaio de migração celular, tratadas com partículas vazias.

Na concentração de 0,250 mg/mL (dose mais alta utilizada) tanto as nanopartículas de *A. chica* como o extrato livre provocaram morte celular (Figura 44). As nanopartículas vazias não produziram morte na concentração correspondente.



**Figura 44:** fotos ilustrativas da ferida no ensaio de migração celular, células tratadas na dose equivalente a 0,250 mg/mL com A) extrato de *A. chica*, B) partículas de *A. chica*; C) partículas vazias.

Após 24 horas do tratamento todos os grupos apresentaram migração dos fibroblastos suficiente para o fechamento total da ferida. Um perfil mais homogêneo foi observado no grupo tratado com as nanopartículas (Figura 45).

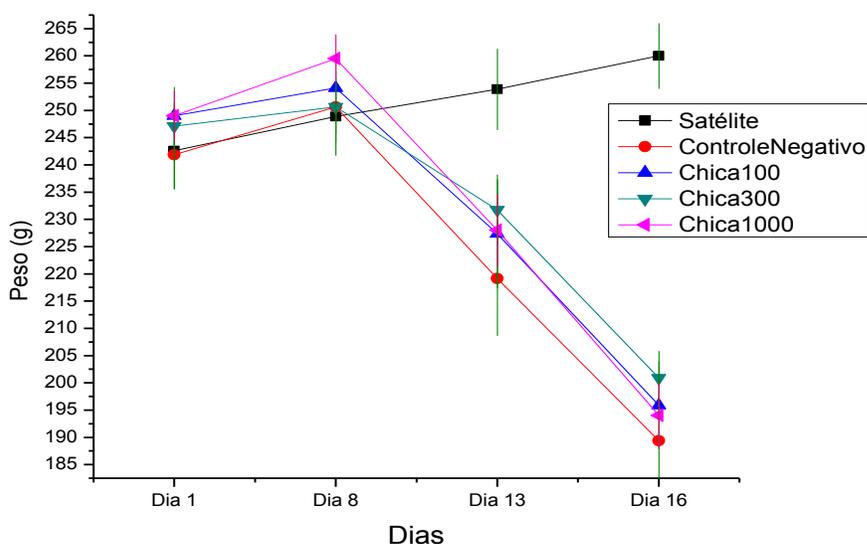


**Figura 45:** fotos ilustrativas da ferida após 24 horas do tratamento no ensaio de migração celular: A) células tratadas com meio (controle); B) células tratadas com nanopartículas de *A. chica*; C) extrato de *A. chica*; D) nanopartículas vazias.

## 5.5 Etapa farmacológica - Ensaios de atividade *in vivo*

### 5.5.1 Mucosite gastrointestinal

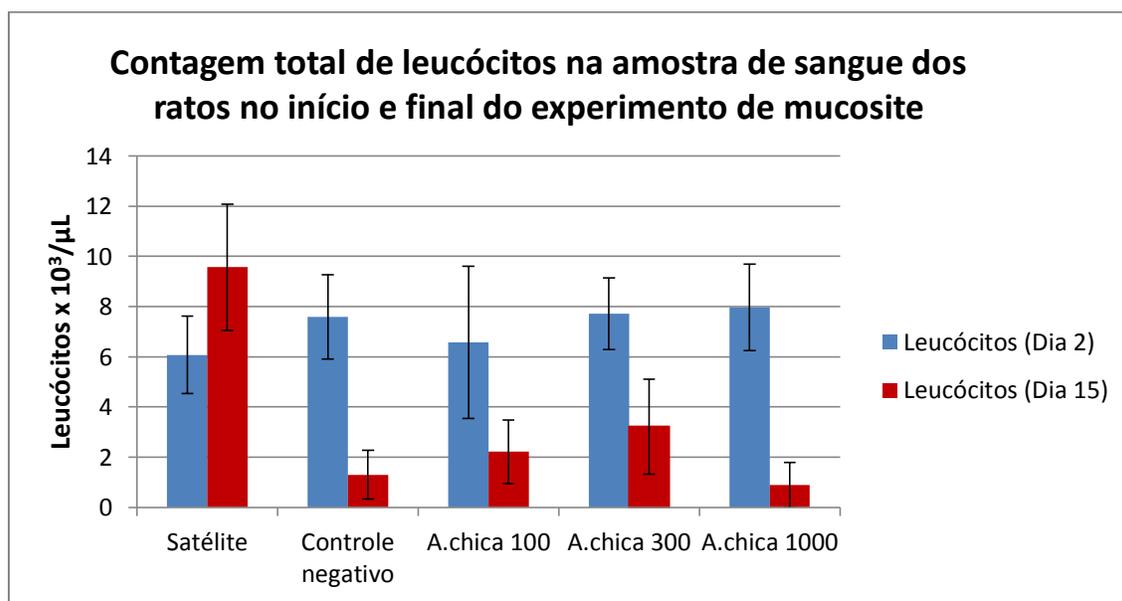
Para avaliar o efeito de proteção do extrato de *A. chica* frente à mucosite induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil (5-FU), as administrações das amostras foram realizadas sete dias antes da indução da moléstia. Todos os grupos tratados com 5-FU tiveram redução de peso significativa (Figura 46), mesmo os tratados com o extrato em diferentes dosagens. O grupo satélite, que não recebeu nenhum tratamento, apresentou ganho de peso compatível com sua idade e estado de higidez.



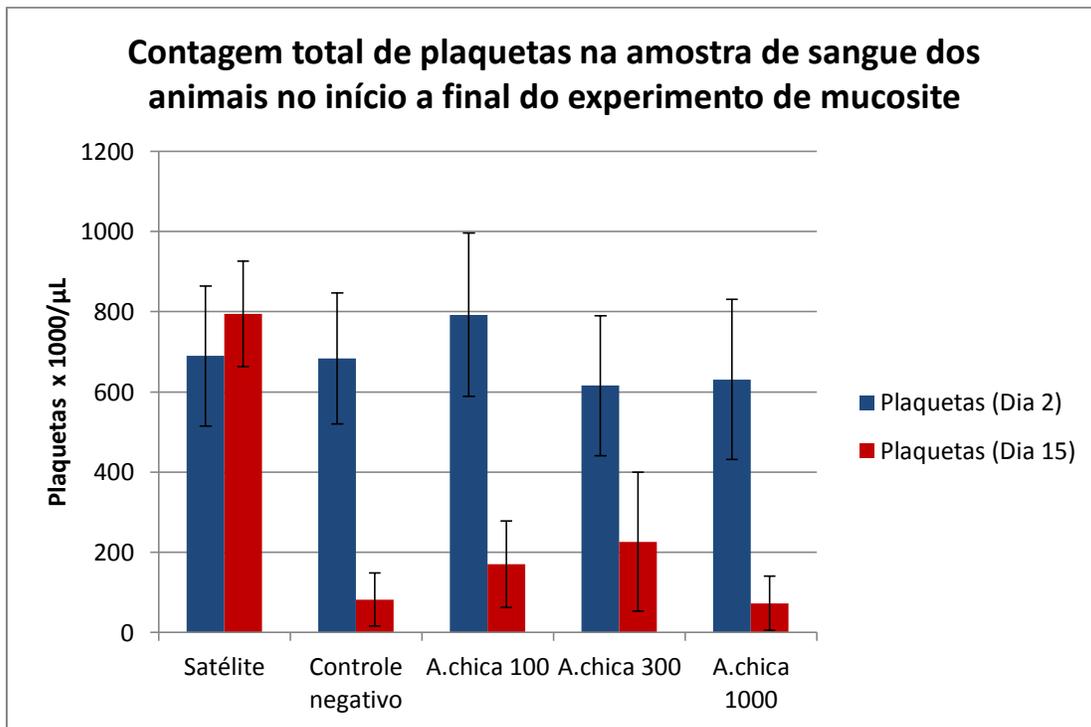
**Figura 46:** gráfico demonstrativo da variação do peso corporal (g) dos ratos no experimento de mucosite gastrointestinal induzida por 5-FU. Grupos satélite, controle ou tratados com *A. chica* nas doses 100, 300 ou 1000 mg/Kg, nos dias 1, 8, 13 e 16 do experimento (média  $\pm$  desvio padrão).

A quantidade de ração consumida durante o período experimental (16 dias) foi de cerca de 1300 gramas, tanto nos grupos que receberam 5-FU como no grupo satélite.

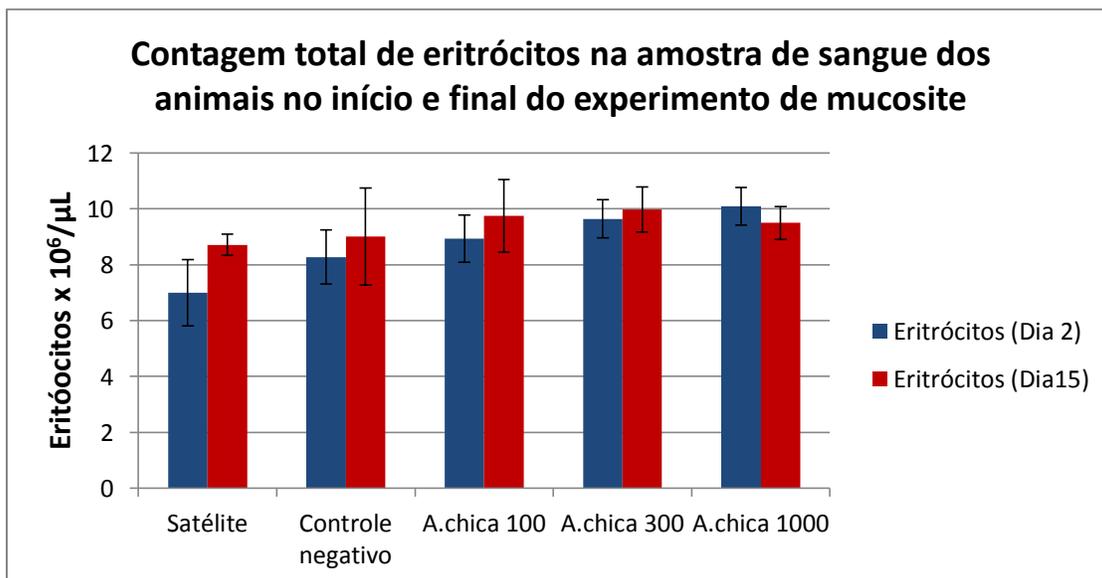
Para monitoramento dos níveis de leucócitos, eritrócitos e plaquetas antes e após a administração de 5-FU (no início e final do experimento), procedeu-se a coleta de sangue nos dias 2 e 15 do ensaio para realização do hemograma. Os níveis de leucócitos e plaquetas diminuíram após a administração do quimioterápico, mesmo nos grupos tratados com *A. chica* (Figura 47 e 48). Os valores de eritrócitos mantiveram-se constantes (Figura 49).



**Figura 47:** gráfico demonstrativo do número de leucócitos na amostra de sangue dos animais dos grupos satélite, controle ou tratados com *A. chica* nas doses 100, 300 ou 1000 mg/Kg, nos dias 2 e 15 do ensaio de mucosite gastrointestinal induzida por 5-FU.

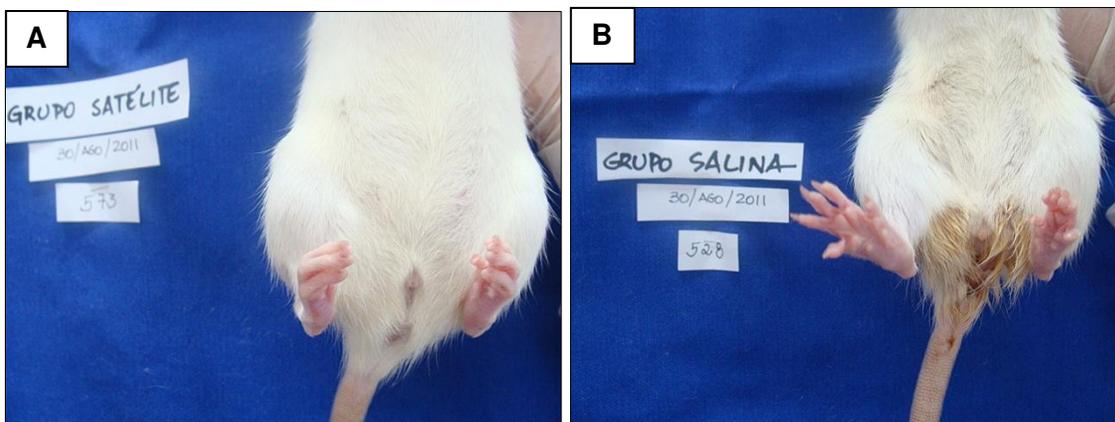


**Figura 48:** gráfico demonstrativo do número de plaquetas na amostra de sangue dos animais dos grupos satélite, controle ou tratados com *A. chica* nas doses 100, 300 ou 1000 mg/Kg, nos dias 2 e 15 do ensaio de mucosite gastrointestinal induzida por 5-FU.



**Figura 49:** gráfico demonstrativo do número de eritrócitos na amostra de sangue dos animais dos grupos satélite, controle ou tratados com *A. chica* nas doses 100, 300 ou 1000 mg/Kg, nos dias 2 e 15 do ensaio de mucosite gastrointestinal induzida por 5-FU.

Na avaliação clínica observou-se diarreia intensa (classificação +++) em 50 % dos ratos do grupo controle (tratado com salina) contra 12,5 % no grupo tratado com *A. chica* 100 mg/Kg (classificação ++) e 25 % no grupo que recebeu 1000 mg/Kg (classificação +). No grupo tratado com 300 mg/Kg do extrato não foi observado diarreia (Figura 50).

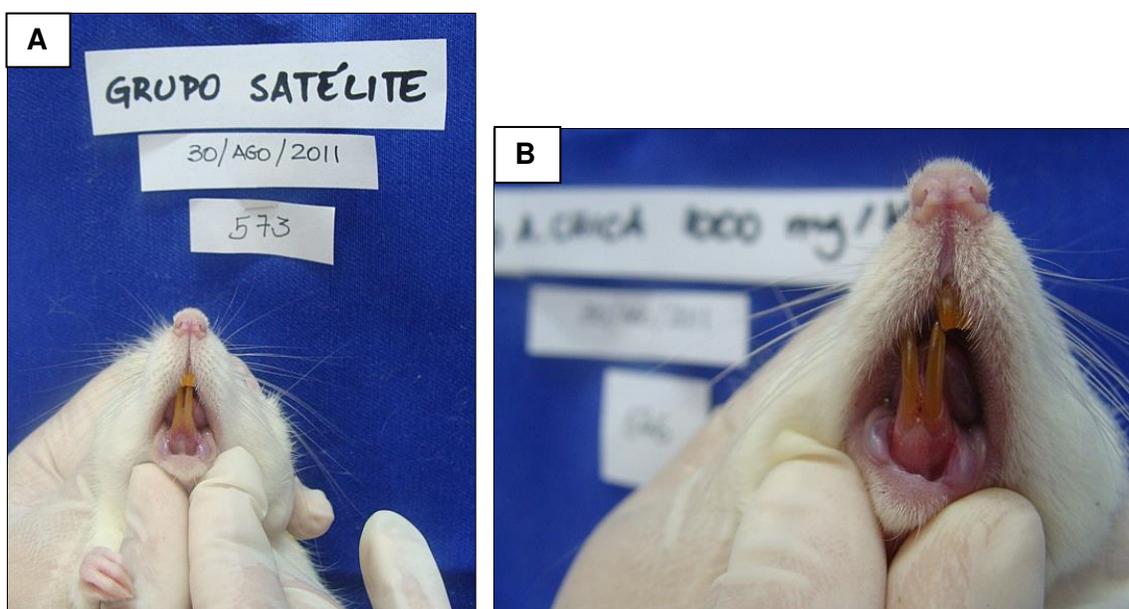


**Figura 50:** foto demonstrativa de um animal do grupo satélite (A) e do grupo controle salina (B) sem e com evidência de diarreia, respectivamente.

Todos os animais que receberam 5-FU apresentaram piloereção (Figura 51) e mucosa oral hiperêmica (Figura 52). Estado de letargia intensa foi observado apenas nos animais do grupo controle. Não houve mortalidade em nenhum grupo experimental.



**Figura 51:** foto de um animal do grupo controle salina, demonstrativa de piloereção.



**Figura 52:** foto demonstrativa da aparência da mucosa oral de um animal do grupo satélite (A) e de um animal submetido ao tratamento com 5-FU (B).

Após a eutanásia, no 16º dia, os órgãos internos (fígado, baço, coração, rins, adrenais, ovários, útero e pulmões) foram pesados para determinação do peso relativo (Tabela 6). Não houve diferença expressiva entre os grupos submetidos à quimioterapia e o grupo satélite, indicando que neste ensaio não houve alteração nos órgãos avaliados.

**Tabela 6:** peso relativo dos órgãos (%) dos animais do experimento para avaliação da atividade profilática em mucosite gastrointestinal induzida por 5-FU.

Grupo:	Peso relativo dos órgãos em porcentagem (intervalo com cálculo de desvio padrão)							
	Fígado	Baço	Coração	Rins	Adrenais	Ovários	Útero	Pulmões
Satélite	3,12 (2,3-3,9)	0,27 (0,24-0,29)	0,36 (0,3-0,4)	0,64 (0,57-0,7)	0,04 (0,03-0,05)	0,08 (0,06-0,10)	0,26 (0,22-0,3)	0,68 (0,5-0,8)
Controle Negativo	3,9 (3-4,7)	0,19 (0,11-0,27)	0,37 (0,31-0,42)	0,79 (0,68-0,89)	0,07 (0,05-0,09)	0,13 (0,08-0,16)	0,28 (0,18-0,38)	0,63 (0,56-0,7)
<i>A.chica</i> 100mg/Kg	3,6 (3,2-4,1)	0,19 (0,12-0,25)	0,42 (0,37-0,48)	0,77 (0,69-0,8)	0,07 (0,05-0,09)	0,08 (0,04-0,12)	0,24 (0,16-0,31)	0,6 (0,4-0,8)
<i>A.chica</i> 300mg/Kg	3,4 (3,1-3,6)	0,24 (0,18-0,30)	0,34 (0,32-0,37)	0,74 (0,68-0,79)	0,07 (0,04-0,09)	0,08 (0,07-0,10)	0,21 (0,13-0,29)	0,74 (0,34-1,1)
<i>A.chica</i> 1000mg/Kg	3,9 (3,4-4,3)	0,18 (0,13-0,24)	0,34 (0,31-0,37)	0,79 (0,68-0,9)	0,08 (0,04-0,11)	0,10 (0,07-0,13)	0,20 (0,12-0,29)	0,72 (0,4-1,1)

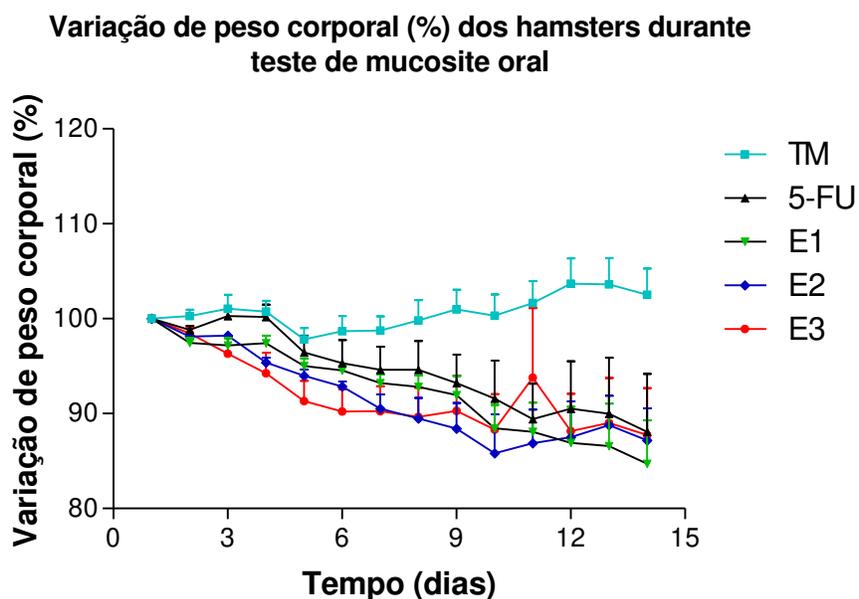
Quanto à avaliação do trato gastrointestinal, foram observadas alterações compatíveis com mucosite em todos os grupos, evidenciadas pela presença de pontos de ulcerativos e vermelhidão.

### 5.5.2 Mucosite Oral

Para realização do ensaio de mucosite oral foi estabelecida parceria com a Universidade Federal do Ceará (UFC), com a finalidade de aprender o modelo experimental e fazer um estudo preliminar da atividade do extrato de *A. chica* administrado por via oral.

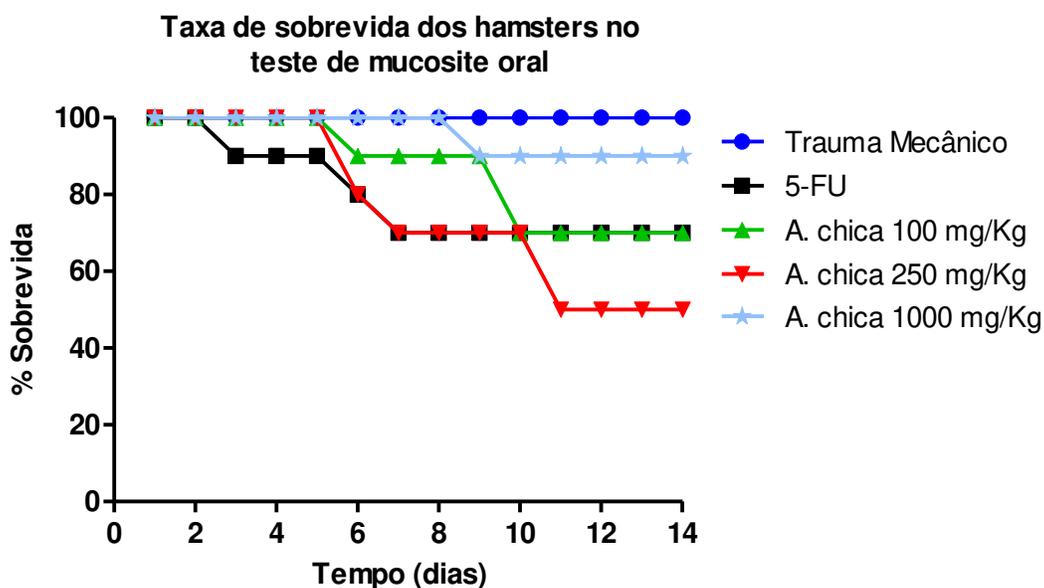
#### A- Avaliação de peso e sobrevida

Nos grupos onde a mucosite oral foi induzida houve redução de peso corporal. Os animais que não receberam o quimioterápico e foram submetidos apenas a escoriações mecânicas da mucosa (grupo Trauma Mecânico-TM) mantiveram o peso durante o experimento (Figura 53).



**Figura 53:** gráfico demonstrativo da variação do peso corporal (%) dos grupos trauma mecânico (TM), controle ou tratados com *A. chica* nas doses 250 (E1), 500 (E2) ou 1000 (E3) mg/Kg do experimento de mucosite oral induzida por 5-FU.

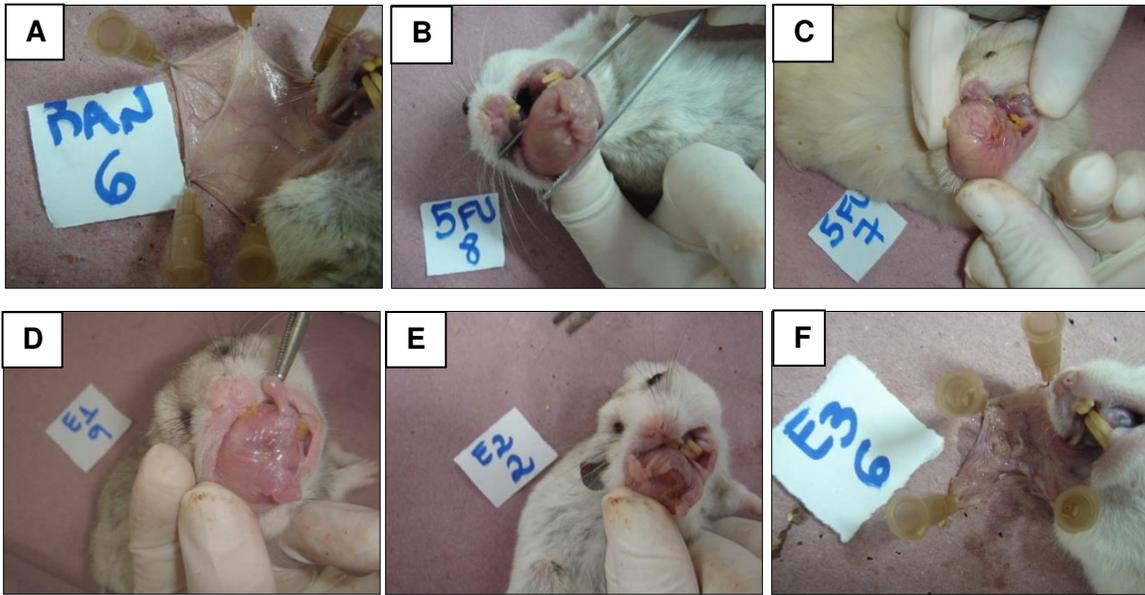
A taxa de sobrevivência foi de 100% para o grupo ranhura. Em todos os grupos submetidos à mucosite houve perda de animais durante o teste, com mortalidade de 30% para os grupos tratados com NaCl 0,9% (solução salina, veículo) e *A. chica* 100 mg/Kg, 50 % para o grupo *A. chica* 250 mg/Kg e 10% para o grupo tratado com a maior dose do extrato (1000 mg/Kg) (Figura 54).



**Figura 54:** gráfico demonstrativo da taxa de sobrevivência (%) dos grupos trauma mecânico, controle 5-FU ou tratados com *A. chica* nas doses 250 (E1), 500 (E2) ou 1000 (E3) mg/Kg do experimento de mucosite oral induzida por 5-FU.

### B- Análise macroscópica

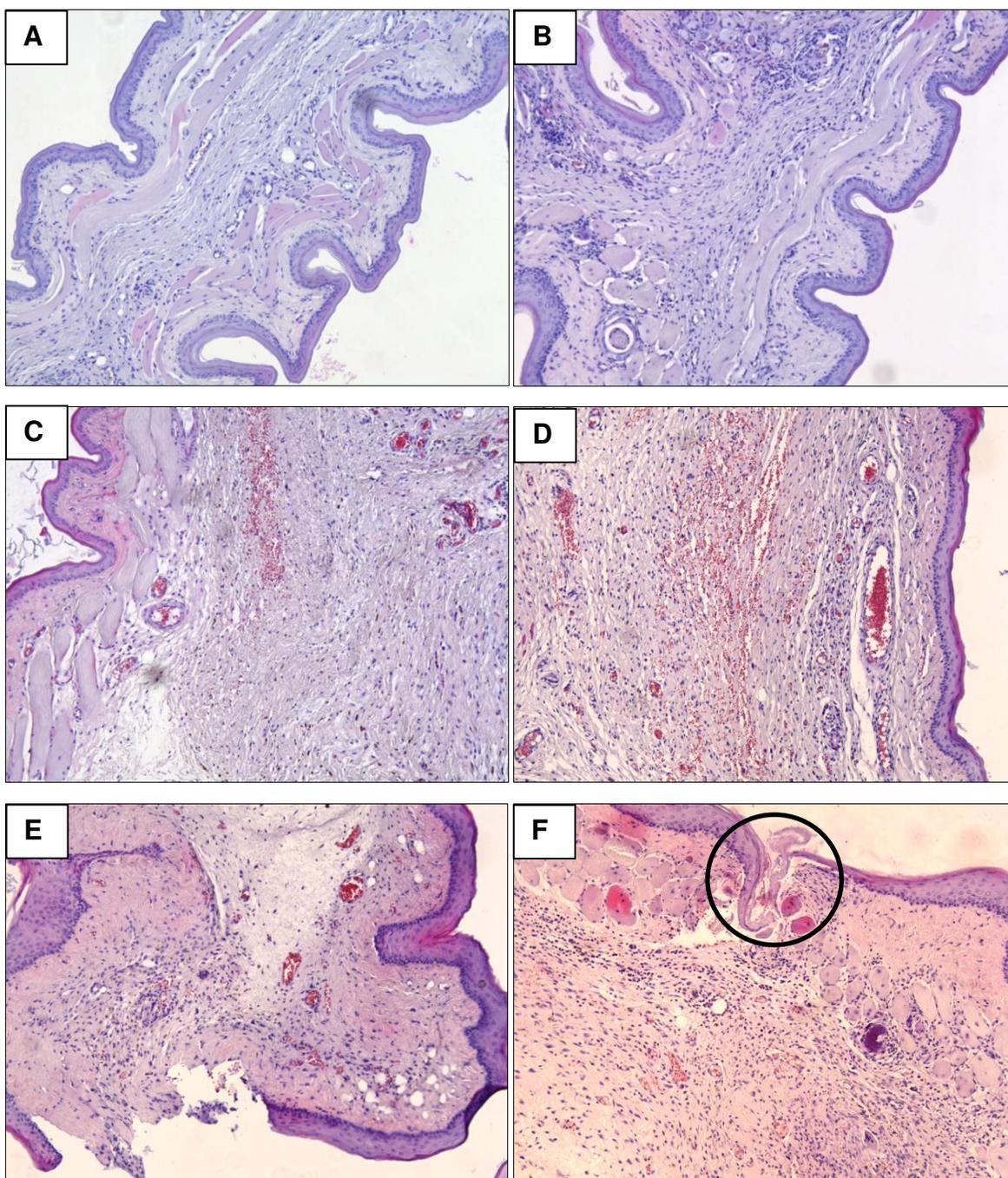
No décimo dia os animais foram anestesiados para avaliação da mucosa jugal. Como não havia sinal de recuperação de nenhum grupo, o experimento seguiu até o 14º dia. Na avaliação da aparência macroscópica da mucosa, o grupo ranhura apresentou recuperação total, equivalente ao *escore* 0. Os grupos submetidos à quimioterapia, que foram acometidos com mucosite, apresentaram severo eritema e formação de úlceras, sendo classificados com *escore* de 3-4 (Figura 55). Observou-se também a eminência de áreas cicatrizadas, correspondentes a fase do ensaio (fase de recuperação).



**Figura 55:** foto demonstrativa da aparência da mucosa jugal dos hamsters no 14<sup>o</sup> dia do experimento de mucosite oral, sendo A) animal do grupo trauma mecânico ou ranhura; B e C) grupo controle; D) grupo tratado com *A.chica* 250 mg/Kg; E) grupo tratado com *A.chica* 500 mg/Kg; grupo tratado com *A.chica* 1000 mg/Kg.

### C- Análise microscópica

O grupo trauma mecânico foi classificado com escore 0, devido a aparência saudável da mucosa. Os grupos que receberam 5-FU, tanto o grupo controle salina quanto os tratados com diferentes doses de *A. chica*, apresentaram edema, áreas hemorrágicas, úlceras e infiltrado celular com prevalência de fibroblastos, recebendo escore 2-3. Presença de área cicatricial foi observada em alguns indivíduos do grupo tratado com o extrato de *A. chica* na maior dose (Figura 56).



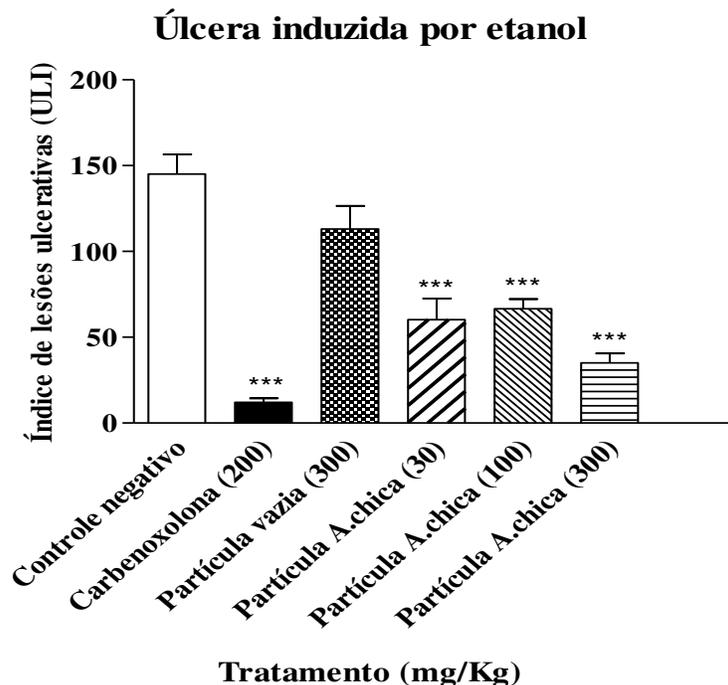
**Figura 56:** fotomicrografia da mucosa jugal dos animais no 14<sup>o</sup> dia do experimento de mucosite oral induzida por 5-FU. Grupo Trauma mecânico (**A**, **B**), grupos tratados com 5-FU, com evidência de edema (**C**), hemorragia (**D**) e úlcera (**E**). Animal do grupo *A.chica* 1000 mg/Kg com evidência de área cicatricial (**F**). Lâminas coradas pelo método de hematoxilina-eosina, análises realizadas em microscópio óptico (x 40).

### 5.5.3 Úlcera gástrica

#### 5.5.3.1 Úlcera induzida por etanol

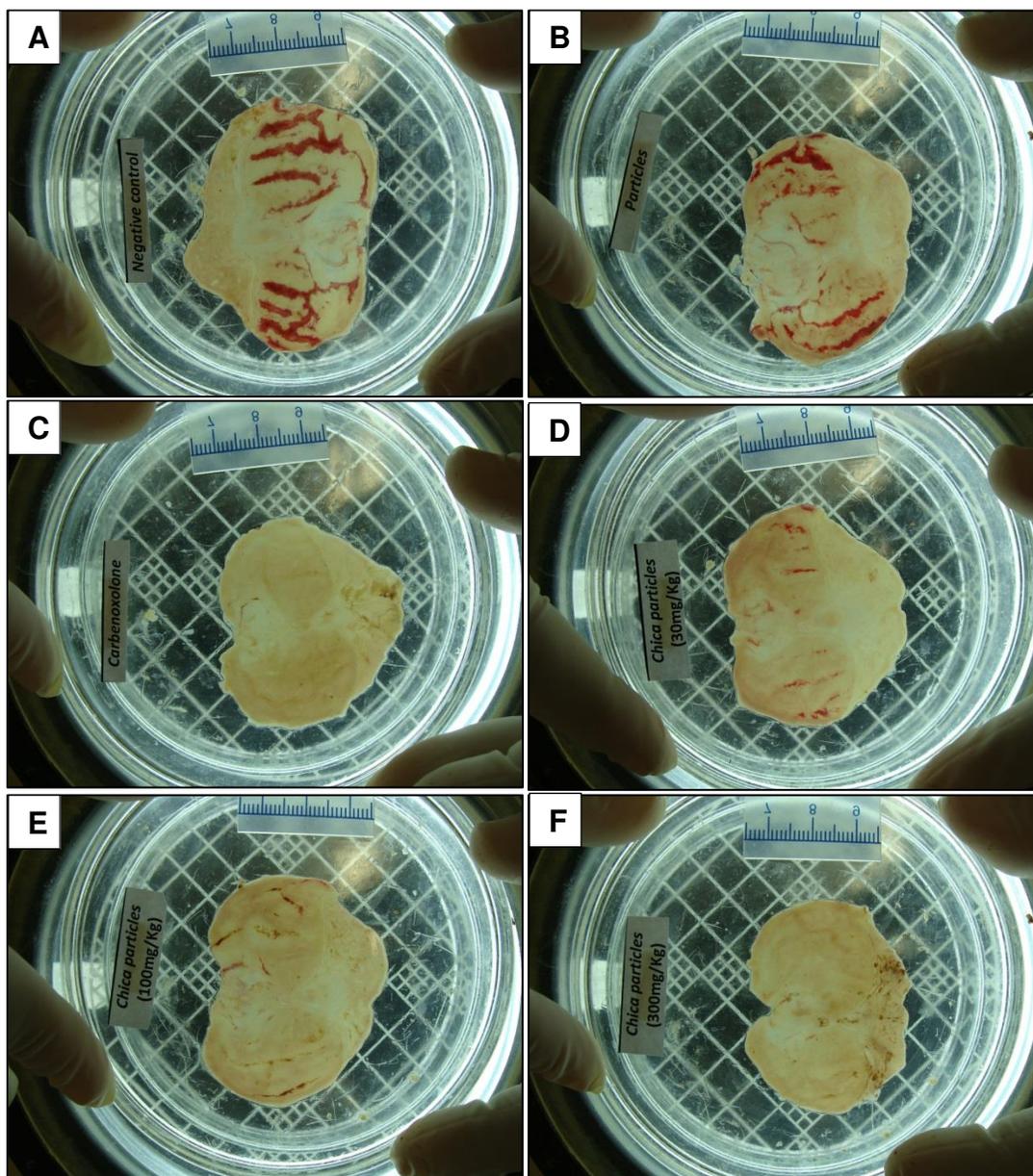
Para avaliação da atividade antiulcerogênica foi empregado o ensaio de úlcera induzida por etanol, que é um teste rápido e eficaz para avaliação da atividade das amostras em feridas de mucosa gástrica (Glavin & Szabo, 1992).

Os grupos tratados com as nanopartículas contendo o extrato de *A. chica* reduziram o índice de lesões ulcerativas em média 58%; 54 % e 76% nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg respectivamente, quando comparado ao grupo tratado com o veículo utilizado para administração das amostras (controle negativo). As nanopartículas vazias, que foram produzidas sem a adição do extrato, não apresentaram atividade relativa ao controle, caracterizando que para esta atividade a associação do extrato com os polímeros na produção das partículas foi fundamental (Figura 57).



**Figura 57:** gráfico demonstrativo do índice de lesões ulcerativas em ratos tratados v.o. com salina (10 mL/Kg), carbexolona (200 mg/Kg), partículas vazias (300 mg/Kg ou partículas de *A. chica* (30, 100 ou 300 mg/Kg). Resultados: média  $\pm$  erro. Anova seguido de Tukey. \*\*\* $p < 0.001$ .

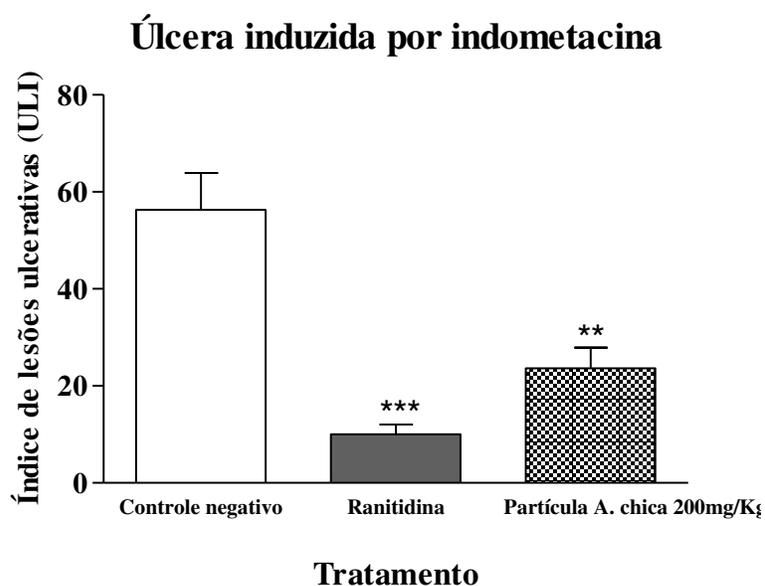
O aspecto dos estômagos dos animais tratados com as nanopartículas de *A. chica*, especialmente na maior dose (300 mg/kg) foi semelhante ao observado no grupo controle positivo Carbenoxolona (Figura 58).



**Figura 58:** fotos dos estômagos de animais representantes dos grupos tratados com veículo solução salina (A); nanopartículas vazias (B); carbenoxolona – controle positivo (C); nanopartículas de *A. chica* 30 mg/Kg (D); nanopartículas de *A. chica* 100 mg/Kg (E); nanopartículas de *A. chica* 300 mg/Kg (F).

### 5.5.3.2 Úlcera induzida por indometacina

Complementando a verificação dos efeitos das nanopartículas em úlceras de mucosa, foi realizado o teste empregando indometacina como agente ulcerativo. O índice de lesões ulcerativas do grupo tratado com nanopartículas foi de 23, contra índice de 56 no grupo tratado com salina, indicando que o tratamento com nanopartículas de *A. chica* reduziu em 58% as lesões ulcerativas se comparado ao controle negativo, tratado com o veículo utilizado para administração das amostras (Figura 59).



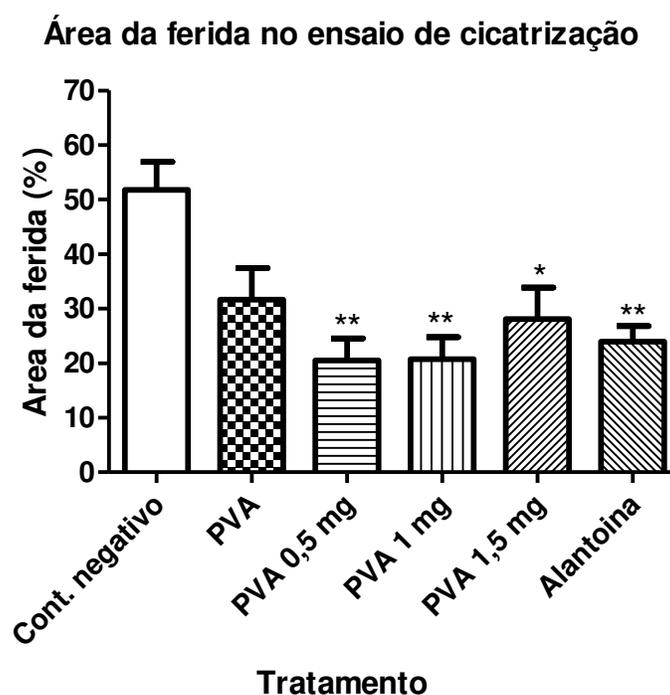
**Figura 59:** gráfico demonstrativo do índice de lesões ulcerativas em ratos tratados v.o. com solução salina (10 mL/Kg), carbexolona (200 mg/Kg), partículas vazias (300 mg/Kg) ou partículas de *A. chica* (30, 100 ou 300 mg/Kg). Anova seguido de Tukey. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### 5.5.4 Avaliação da atividade em úlceras de pele

A atividade dos sistemas transportadores contendo nanopartículas de *A. chica* foi avaliada em modelos de cicatrização cutânea em ratos. O tamanho da área da ferida após 10 dias de tratamento foi calculado em comparação percentual com o tamanho da lesão do primeiro dia do teste.

#### 5.5.4.1 Atividade do filme de álcool polivinílico (PVA)

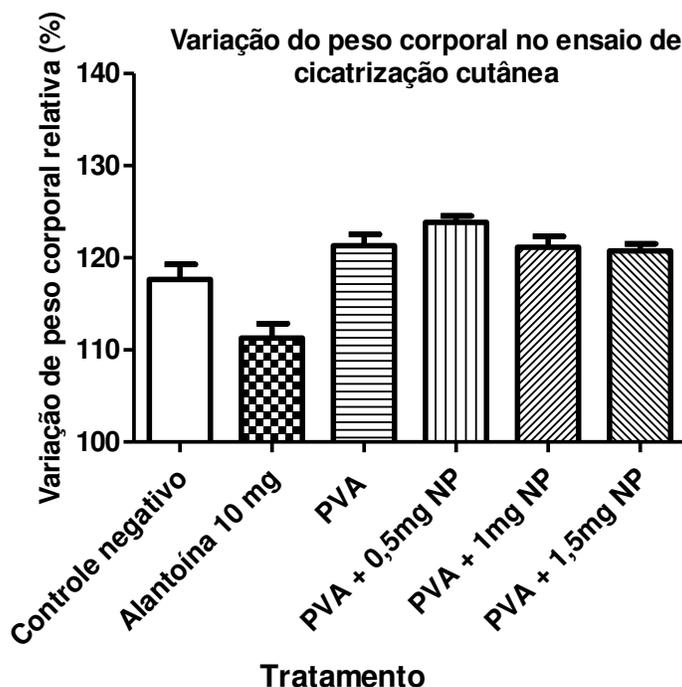
Os filmes de PVA carregados com as nanopartículas nas três doses empregadas foram ativos quando comparados ao grupo controle negativo (veículo). A menor dose empregada (0,5 mg de nanopartículas) produziu cerca de 79% de contração da área da ferida contra 48% de redução do grupo controle. Os animais que receberam apenas o filme sem nanopartículas com o extrato, apresentaram contração média de 68% e a alantoína, controle positivo, 76% de contração (Figura 60).



**Figura 60:** gráfico da área da ferida após 10 dias de tratamento com veículo solução salina 0,9%; filme de PVA sem nanopartículas ou filmes de PVA carregados com 0,5; 1 ou 1,5 mg de nanopartículas de *A. chica*. Valores representados pela média  $\pm$  erro. Anova seguido de Tukey. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Os animais foram pesados no primeiro e último dias do ensaio para verificar a variação média do peso em cada grupo. Os resultados estão expressos em porcentagem do peso final relativa ao peso inicial, que foi considerada como

100%. Todos os animais ganharam peso durante o experimento, indicando que a lesão e o tratamento não afetaram esse parâmetro (Figura 61).

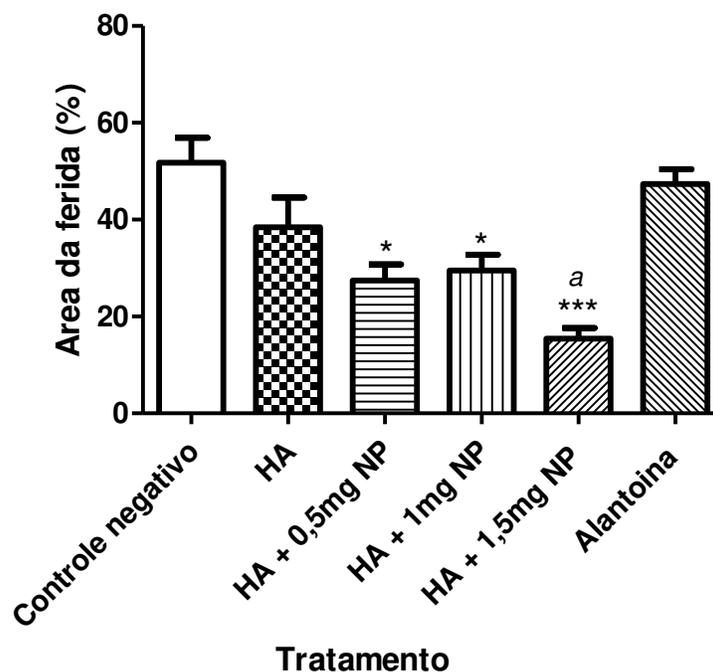


**Figura 61:** gráfico da variação do peso corporal (%) dos animais após 10 dias do ensaio de cicatrização empregando filmes de PVA.

#### 5.5.4.2 Atividade do hidrogel de ácido hialurônico

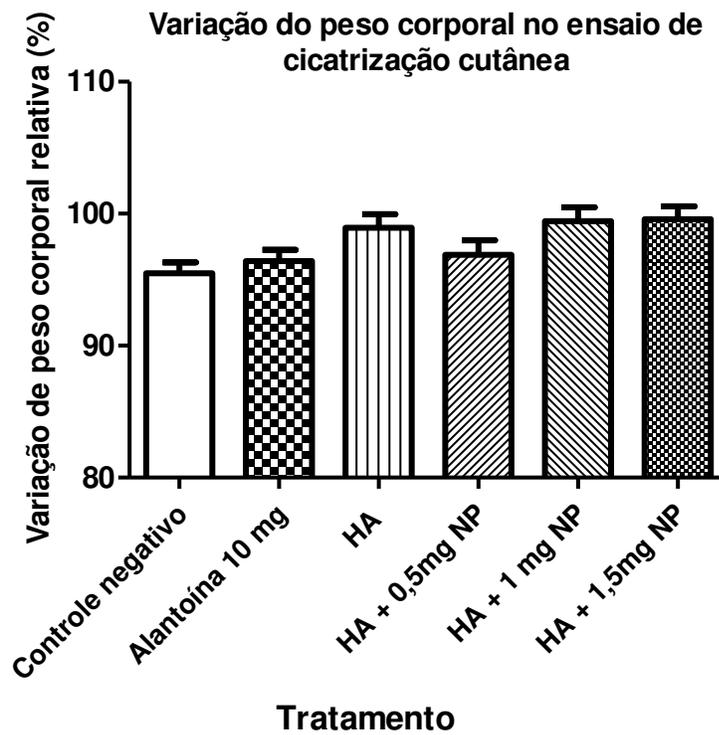
As três doses de nanopartículas (NP) veiculadas no hidrogel (0,5; 1 ou 1,5 mg) foram ativas, com contração média da área da ferida de 72; 70 e 85% respectivamente. O controle negativo (tratado com veiculo) contraiu 48% e a alantoína, empregada como controle positivo, apresentou contração de 52% (Figura 62). O valor abaixo do esperado para o controle positivo pode estar relacionado à oclusão realizada na área da ferida.

### Tamanho da área da ferida no ensaio de cicatrização



**Figura 62:** gráfico da área da ferida após 9 dias de tratamento com veículo solução salina 0,9%; hidrogel de ácido hialurônico sem nanopartículas ou hidrogéis carregados com 0,5; 1 ou 1,5 mg de nanopartículas de *A. chica*. Valores representados pela média  $\pm$  erro. Anova seguido de Tukey. \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (comparados ao veículo); <sup>a</sup> $p < 0.05$  (comparado ao hidrogel HA sem partículas).

Todos os grupos apresentaram valores de variação de peso relativa abaixo de 100%, indicando que houve diminuição do peso corporal após dez dias de experimento (Figura 63).



**Figura 63:** gráfico da variação do peso corporal (%) dos animais após 10 dias do ensaio de cicatrização empregando hidrogéis.

## 6 DISCUSSÕES

A crescente utilização de medicamentos a base de plantas despertaram uma preocupação com a sua eficácia e segurança, pois um processamento inadequado do material vegetal pode ocasionar destruição das moléculas, comprometendo a atividade farmacológica (Heinrich *et al.*, 2007). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para a transformação de uma planta em medicamento deve-se visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Portanto, a produção de medicamentos fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios envolvendo aspectos botânicos, agrônômicos, químicos, estudos farmacológicos e toxicológicos, além do desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas, para garantia da padronização do medicamento fitoterápico (ANVISA, 2009).

O grupo do CPQBA - UNICAMP estuda a espécie *Arrabidaea chica* desde 2003, com abordagens de pesquisas na área agrícola, química, tecnológica e farmacológica para obtenção de dados pré-clínicos de segurança, eficácia e reprodutibilidade que contribuam para a produção de um medicamento fitoterápico.

O conhecimento das características do insumo vegetal é fundamental para a padronização da matéria prima. Levando isso em conta, estudos anteriores desenvolveram marcadores microssatélites para a caracterização genética de exemplares de *Arrabidaea chica*, disponíveis no banco de germoplasma do CPQBA. O alto nível de polimorfismo detectado com estes marcadores indicou a sua utilidade na elaboração de estratégias para conservação e exploração racional de *A. chica* (Figueira *et al.*, 2010). O material vegetal utilizado para o desenvolvimento deste estudo foi a variedade denominada acesso 6, oriunda de Manaus-AM e disponível no banco de germoplasma.

Os efeitos físicos e químicos na degradação de antocianinas têm sido amplamente estudados (Mercadante & Bobbio, 2007; Castañeda-Ovando *et al.* 2009; Lee & Cho, 2012; Frank *et al.* 2012a). O alto poder redutor das antocianinas torna esta classe de compostos muito instável, portanto alguns pontos devem ser observados durante a produção dos extratos de *A. chica* para preservação das suas características. Entre os parâmetros que devem ser controlados citamos a temperatura (40°C), luminosidade e o pH do meio. Observou-se também que a execução do processo deve ser realizada no menor período de tempo possível para diminuir efeitos de degradação do produto final.

O pH é o fator que mais influencia na coloração das antocianinas (Figura 20) (Bobbio & Bobbio, 2001). A estabilidade do cátion flavílio, núcleo fundamental das antocianinas (Figura 21), é mantida em condições ácidas, que previnem a degradação desses pigmentos (Kong *et al.*, 2003).

O ácido cítrico foi utilizado no presente trabalho para acidificação do solvente extrativo. O extrato produzido foi neutralizado para sua utilização nos sistemas farmacêuticos e nos testes biológicos. Estipulou-se valores máximos de pH 6,0-6,5 para evitar a formação de um material polimerizado (Figura 19) e possíveis perdas devido a alcalinidade.

Entre outros fatores que desencadeiam o processo de degradação das antocianinas está o oxigênio (Bobbio & Bobbio, 2001). Assim, foi avaliada a influência desse parâmetro sobre a produção dos extratos com o emprego de atmosfera normal (oxigênio) comparada com atmosfera inerte (nitrogênio) no processo de secagem por *spray drying*. Observou-se que a concentração dos pigmentos de interesse no extrato seco empregando atmosfera inerte foi 70% maior do que o extrato seco em atmosfera normal, (Figura 22), indicando a necessidade do emprego de meio inerte nos processamentos de extratos de *A. chica* em *Spray dryer*.

Ao planejar o desenvolvimento de produtos contendo extratos ricos em antocianinas deve-se considerar estratégias para conter a degradação das

mesmas. A encapsulação em nanopartículas é uma alternativa para garantir a estabilidade e melhorar a apresentação de produtos a base de plantas (Frank *et al.*, 2012b; Thapa *et al.*, 2013).

A encapsulação em micro ou nano partículas de compostos cuja ação na forma livre já é conhecida tem trazido grandes benefícios para terapêutica. A incorporação de fármacos em sistemas de liberação modifica sua apresentação ao sistema biológico, aumentando a eficiência de ação. A encapsulação permite não apenas a preservação da atividade do composto através da sua proteção contra as agressões do meio externo como luz, oxigênio e o próprio meio biológico, mas também produz diminuição na frequência de administração, redução da quantidade necessária para alcançar o efeito terapêutico, redução dos efeitos secundários, além do aumento no tempo de prateleira do composto encapsulado (Mehnert, 2001; Vasir *et al.*, 2003; Granada *et al.*, 2007; Grazú *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2013).

A fim de viabilizar o desenvolvimento de produtos a base de *A. chica*, o extrato padronizado foi incorporado à nanopartículas de quitosana. O delineamento de novos sistemas farmacêuticos envolve inicialmente duas importantes etapas: a escolha das matérias primas e o estudo dos parâmetros de produção.

A quitosana foi escolhida como matéria-prima para produção das nanopartículas devido a sua biocompatibilidade, baixa toxicidade, mucoadesividade, além ser um excelente material para a utilização no reparo de feridas (Sinha *et al.*, 2004; Argüelles *et al.*, 2004; Jayakumar *et al.*, 2011; Garcia-Fuentes & Alonso, 2012). Estas propriedades caracterizam a quitosana como candidata ideal para aplicações propostas (úlceras de mucosa e pele).

A primeira abordagem do estudo para produção das partículas foi realizada em parceria com a Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP (resultados não expressos), empregando a quitosana Sigma-Aldrich® C3646, que foi purificada empregando a técnica de precipitação-redissolução descrita por

Nasti *et al.*, (2009). A purificação remove uma quantidade significativa de contaminantes, que são capazes de afetar tanto o processo de formação de partículas como a interação com as células (Nasti *et al.*, 2009). Para o preparo da solução da quitosana foi necessário acréscimo de ácido e agitação constante por 48h. O período necessário para o preparo da solução de quitosana incluindo a purificação foi, no mínimo, de uma semana. Em contrapartida, para o preparo da solução com a quitosana ultrapura em forma de cloridrato (Protosan®), cerca de 15 minutos foram suficientes para completa dissolução em água.

Signini & Campana Filho (2001) compararam diferentes formas purificadas de quitosana e relataram que nos casos de cloridratos de quitosana, a presença de cargas e de contra-íons altera drasticamente as interações inter e intra cadeias, modificando o seu arranjo no estado sólido, aumentando sua hidrofiliabilidade e conferindo solubilidade em água sem a necessidade da adição de ácido para promover a completa solubilização do polímero. Levando em conta as propriedades do produto, o cloridrato de quitosana Protosan® foi escolhido para o preparo das nanopartículas neste trabalho.

Entre os métodos de reticulação da quitosana mais bem sucedidos está a ligação cruzada com poliânions multivalentes. O tripolifosfato (TPP) é o poliânion mais comumente utilizado devido à sua rápida capacidade de gelificação, por ser atóxico e por não gerar solventes residuais (Gan *et al.*, 2005; Fàbregas *et al.*, 2013). O sistema nanoparticulado quitosana-TPP apresenta características atrativas, como por exemplo, a formação de partículas com tamanho facilmente regulável (Gan *et al.*, 2005). Segundo Dong *et al.*, (2013) o tamanho das partículas de quitosana é variável de acordo com parâmetros escolhidos para o processo de produção.

A primeira abordagem para a obtenção das nanopartículas consistiu no estudo dos parâmetros de produção, onde foram avaliadas proporções de massa e volume, além do método e velocidade de agitação. A produção das partículas foi monitorada através de medidas do seu tamanho e potencial zeta. A análise do

potencial zeta determina a densidade de carga na camada adjacente à superfície das partículas. Pode ser utilizada como ferramenta para determinar a estabilidade da formulação. Valores absolutos (negativos ou positivos) acima de 30 mV são indicativos de repulsão entre as partículas, ou seja, há menor probabilidade de formação de agregados (Singh & Lillard Jr., 2009).

Foram avaliadas proporções de massa do reticulante TPP adicionado a quitosana variando de 0,1 a 25%. A melhor condição de massa estudada foi a proporção compreendida entre 10 e 20% (TPP:quitosana). Assim como no trabalho de Gan *et al.*, (2005) o aumento da quantidade de TPP adicionado foi proporcional a diminuição do tamanho das partículas.

Avaliou-se também a influência do volume da solução de reticulante acrescentado à solução de quitosana. Ficou constatado que este parâmetro também interferiu no tamanho das partículas e que a proporção de volume de 1:10 (TPP:quitosana) foi a melhor condição avaliada.

Referente aos métodos de agitação, entre os três métodos avaliados (agitação magnética, mecânica e ultrassom de sonda) a agitação mecânica empregando Ultra-turrax<sup>®</sup> demonstrou-se mais prática e reproduzível quanto ao tamanho das partículas, com velocidade de agitação de 3200 a 7500 rotações por minuto.

A partir dos resultados estabeleceram-se as condições para o preparo de nanopartículas de quitosana com TPP como sendo: a) Concentração de TPP 20% (m/m) em relação à quitosana; b) Volume TPP/quitosana (1:10; v/v); c) Agitação mecânica 3600 rpm para preparações com menores volumes (até 50 mL) e 7200 rpm para volumes maiores (100 mL).

Determinadas as condições para o preparo das partículas vazias, o próximo passo foi avaliar os parâmetros para a encapsulação do extrato de *A. chica*. Na produção das nanopartículas pela técnica de reticulação a amostra pode ser adicionada à solução de quitosana (Janes *et al.*, 2001 e Shu & Zhu, 2000), ou à

solução de entrecruzante (Vila *et al.*, 2002). Melhores condições de solubilidade do extrato foram observadas quando adicionado à solução de TPP, o que determinou sua adição ao agente reticulante para o preparo das partículas.

As partículas produzidas com extrato de *A. chica* nas proporções de 10, 15 ou 25% (proporção de massa em relação à quitosana) apresentaram tamanho médio de 153, 125 e 90 nm, respectivamente. O aumento da adição do extrato proporcional à diminuição do tamanho das partículas sugeriu interação entre os componentes do extrato de *A. chica* e os polímeros (Tabela 1). Partículas ainda menores (60 nm) foram produzidas aumentando a escala de produção. Os valores de potencial zeta (cerca de +32 mV) foram indicativos da estabilidade das amostras.

Levando em consideração a quantidade inicial de extrato adicionado (25% em relação à quitosana) e a eficiência de encapsulação de 84%, a proporção final de massa do extrato incorporado às partículas foi 1:5.

Além do tripolifosfato outros agentes entrecruzantes como o glutaraldeído, formaldeído e a genipina tem sido utilizados para o preparo de partículas de quitosana (Sinha *et al.*, 2004).

A reticulação química de quitosana, com o objetivo de obter derivados para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, tem como limitação o uso de reticulantes químicos que são, em sua grande maioria, tóxicos, como o glutaraldeído e formaldeído. Na busca de uma solução para esse inconveniente, alguns pesquisadores voltaram seus estudos para a descoberta de agentes de entrecruzamento menos citotóxicos e mais biocompatíveis. Foi assim que a genipina, um produto natural isolado de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*, foi introduzida como um eficaz reticulante químico da quitosana (Gonsalves *et al.*, 2011). Em termos de segurança, a quitosana entrecruzada com genipina pode ser uma boa alternativa para aplicações como carreadores de drogas (Lai *et al.*, 2010).

No presente trabalho a genipina foi avaliada isoladamente ou em mistura com TPP. A adição de genipina sozinha à solução de quitosana não resultou na formação de nanopartículas. Quando empregada em mistura com TPP promoveu a formação de partículas com tamanho médio de 330 nm, que diminuiu para 126 nm após a incorporação do extrato de *A. chica*. A diminuição do tamanho das partículas também foi observada na reticulação com TPP (de 150 para 90 nm), indicando novamente a tendência de interação do extrato com a matriz polimérica na formação das partículas.

As nanopartículas de quitosana empregando TPP como reticulante apresentaram os melhores resultados de tamanho e potencial zeta dentre as condições avaliadas, sendo escolhidas para dar continuidade aos estudos.

A veiculação das nanopartículas em filmes absorvíveis ou hidrogéis caracteriza formas adicionais de emprego da amostra. A esponja, resultante da liofilização da solução de nanopartículas, pode ser caracterizada como uma forma de veiculação das partículas ou de armazenamento.

O filme absorvível de álcool polivinílico (PVA) foi produzido a partir da secagem da solução de PVA preparada utilizando agitação e aquecimento constantes. O efeito da temperatura na solubilidade do PVA está associado à quebra das ligações de hidrogênio. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio são rompidas diminuindo as forças intra e intermoleculares, favorecendo assim a solubilidade (Aranha & Lucas, 2001).

O volume de solução adicionado às placas de teflon com diferentes diâmetros foi avaliado para a produção de filmes com a espessura desejada (20-30  $\mu\text{m}$ ). Os filmes utilizados nos testes *in vivo* foram produzidos em tamanho igual ao da ferida gerada nos animais, para facilitar a aplicação proposta e assegurar a quantidade de partículas em cada amostra de filme aplicada no modelo experimental.

Neste trabalho optou-se pela produção de filmes absorvíveis de PVA com degradação imediata quando hidratado, com a finalidade de disponibilizar rapidamente as nanopartículas veiculadas. A produção de filmes de PVA mais duráveis (com tempo de degradação mais prolongado) é possível empregando o método de ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, descrito por Peppas & Simmons (2004). Este método propicia a formação de cristais que atuam como *cross-links* físicos e o polímero final se comporta como se fosse quimicamente reticulado. O polímero PVA é um dos poucos que exibem este fenômeno, com formação de hidrogel sem a necessidade da adição de entrecruzante (Peppas & Simmons, 2004).

O grau de entrecruzamento é um dos fatores mais importantes que afetam o intumescimento dos hidrogéis. Quanto maior a quantidade do entrecruzante incorporado à estrutura do hidrogel, mais compacta será sua estrutura e menor será a capacidade de absorção de água. Há uma quantidade máxima de água que pode ser absorvida denominada como grau de intumescimento de equilíbrio, este comportamento se deve a resposta viscoelástica do hidrogel (Ortega, *et al.*, 2012; Hoffman, 2012).

A princípio o sistema se encontrava no estado sólido (xerogel), formando uma rede rígida. Durante o processo de hidratação as cadeias poliméricas se intumesceram e adquiriram maior flexibilidade, alcançando o grau máximo de hidratação. Entretanto o sistema tendeu com o tempo a um estado de mínima energia, expulsando as moléculas de água que haviam penetrado na rede polimérica até alcançar um grau de hidratação estável (Ortega, *et al.*, 2012).

O grau de hidratação em equilíbrio em meios ácido, neutro ou básico para os hidrogéis entrecruzados com concentrações de genipina de 0,5; 1; 2 ou 5%, demonstrou uma maior tendência de retenção de água a pH neutro (Figura 33), que pode estar relacionado aos grupos iônicos que formam a matriz do hidrogel, por estarem parcialmente ionizados e não apresentarem interações iônicas tão fortes como a pH básico ou ácido (Ortega, 2013).

A etapa farmacológica compreendeu avaliações de atividade *in vitro* e *in vivo*. Nos ensaios *in vitro* foram avaliadas a viabilidade e migração celular empregando fibroblastos humanos de origem dermal. Observou-se que a quantidade de células existentes nos compartimentos da placa de cultivo no momento da aplicação das amostras (confluência inicial), pode ser determinante para o perfil de atividade. Isso foi observado para as nanopartículas de *A. chica* na maior concentração testada (0,5 mg/mL) que provocou diminuição drástica da viabilidade celular quando avaliada em placas com confluência inicial de 70% e estimulou a proliferação celular quando submetida a placas com maior quantidade de células (confluência de 100%) (Figura 36).

A viabilidade celular relativa ao controle em torno de 20 % apresentada pelo extrato livre na concentração equivalente a 0,5 mg/mL em ambas confluências testadas, pode estar associada com a capacidade antioxidante dos componentes do extrato de *A. chica*.

Segundo Heim *et al.* (2002), efeitos pró-oxidantes foram responsáveis por efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos de flavonoides isolados de vários produtos oriundos de plantas. Esta informação sugere que os mesmos atributos estruturais que favorecem a atividade antioxidante podem também exacerbar um *stress* oxidativo e causar dano a moléculas funcionais e estruturais das células (Heim *et al.*, 2002).

Propriedades pró-oxidantes dos flavonoides parecem ser dependentes da concentração (Procházková *et al.*, 2011). A viabilidade celular do extrato de *A. chica* livre foi de 90 % na concentração de 250 mg/mL e 20 % na concentração de 0,5 mg/mL. No estudo com a quercetina descrito por Procházková *et al.*, (2011), observou-se que concentrações de quercetina entre 1-50  $\mu$ M reduziram os níveis de danos oxidativos do DNA, enquanto que a 100  $\mu$ M a quantidade de danos foi aumentada. Estes resultados demonstraram o efeito pró-oxidante na maior concentração.

Além disso, um fator que é, por vezes, insuficientemente observado é a facilidade com que os compostos fenólicos sofrem reações químicas com constituintes do meio de cultivo celular. Essas reações podem resultar na oxidação do fenol produzindo uma variedade de produtos, incluindo quinonas, semiquinonas e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Long *et al.*, 2010).

O extrato quando incorporado nas nanopartículas demonstrou perfil de atividade diferenciado. As partículas de *A. chica* não apenas mantiveram as células viáveis como propiciaram a proliferação celular quando submetidas ao ensaio empregando confluência celular de 100%.

Um teste de viabilidade celular adicional foi realizado a fim de avaliar o comportamento das amostras quando em contato com o meio de cultivo por tempos determinados (de 1 a 21 dias), com o objetivo de avaliar a possível formação e/ou liberação de produtos que pudessem interferir na atividade das amostras. A viabilidade relativa ao controle das partículas com e sem extrato de *A. chica* e do extrato livre foi superior a 70% (Figura 37), indicando ausência de toxicidade segundo o preconizado pelo *International Standart* - ISO 10993-5.

O ensaio de cicatrização *in vitro* foi realizado para avaliar a atividade das amostras na migração de fibroblastos. As nanopartículas de *A. chica* apresentaram atividade neste teste, porém com um perfil concentração-resposta diferente do observado no ensaio de viabilidade. A concentração mais alta que ativou a proliferação no teste de viabilidade foi inativa no teste de migração, enquanto concentrações mais baixas (0,008 e 0,0156 mg/mL) que apenas mantiveram a viabilidade celular, no teste de migração foram as mais ativas, estimulando o fechamento da ferida (Figura 38). Estes resultados demonstraram a particularidade de cada ensaio celular e sugeriram o envolvimento tanto da proliferação como da migração celular na atividade das nanopartículas de *A. chica*.

Na concentração de 0,250 mg/mL (concentração mais alta utilizada) tanto as nanopartículas de *A. chica* como o extrato livre provocaram morte celular

(Figura 44), corroborando com os resultados do ensaio de viabilidade, onde observou-se que as amostras contendo *A. chica* podem ser tóxicas dependendo da concentração. As nanopartículas vazias não produziram morte celular na concentração correspondente.

Os resultados indicaram que em ensaios *in vitro* as nanopartículas de *A. chica* propiciaram tanto proliferação como a migração celular, sugerindo que a atividade sobre fibroblastos esteja envolvida com o mecanismo da ação das amostras.

Os ensaios *in vivo* compreenderam avaliações da atividade cicatrizante em úlceras de mucosa e pele, empregando modelos experimentais de mucosite, úlcera gástrica e cicatrização cutânea.

Experimentalmente, a mucosite pode ser induzida por radiação ou, principalmente, por tratamento quimioterápico. Há vários modelos experimentais citados na literatura, empregando diferentes quimioterápicos indutores de mucosite, como o 5-Fluorouracil, Metotrexato ou Irinotecano.

O quimioterápico 5-FU é vastamente utilizado na clínica oncológica e a mucosite é um dos seus principais efeitos colaterais. Vários autores utilizam esse quimioterápico para ensaios de indução de mucosite experimental, dentre eles Saegusa *et al.* (2008); Pavesi *et al.* (2008); Wright *et al.* (2009); França *et al.* (2009), Augusto *et al.* (2010); Özel *et al.* (2010); Letari *et al.* (2010); Wu *et al.* (2010).

Vários modelos animais têm sido desenvolvidos para investigação da mucosite. A escolha do modelo depende de fatores como disponibilidade do animal e o tipo de lesão que se deseja avaliar.

Sonis *et al.* (1990) descreveram o primeiro modelo animal para investigação de mucosite induzida por quimioterapia, utilizando 5-FU em hamsters. Avaliações clínicas e histológicas indicaram que modificações na mucosa foram similares ao visto na mucosite humana. Estudos subsequentes

utilizaram esse modelo, ou versões modificadas deste, para investigar a patologia e a mucotoxicidade de drogas citotóxicas (Logan *et al.* 2007). Experimentos com hamsters foram empregados visando estratégias de tratamento ou profilaxia da mucosite. O uso de fator de crescimento para fibroblastos (FGF-20) demonstrou-se efetivo na manutenção da integridade da mucosa em experimento envolvendo radio e quimioterapia (Alvarez *et al.*, 2003). Pavesi *et al.* (2008) estudaram o efeito do Cogumelo do Sol® no processo inflamatório e reparador da mucosite. Augusto *et al.* (2010) avaliaram o efeito protetor do extrato de *Uncaria tomentosa* na prevenção de mucosite oral. Tanto o Cogumelo do Sol como o extrato vegetal de *Uncaria tomentosa* não foram efetivos nos trabalhos citados. Um estudo empregando regimes tanto profilático como terapêutico foi desenvolvido por França *et al.* (2009), onde os efeitos do laser de baixa intensidade foram avaliados, indicando um possível efeito positivo na redução da severidade dos sinais da mucosite.

O modelo murino também pode ser utilizado para a investigação de aspectos da mucosite. O desenvolvimento do fator de crescimento de queratinócito (KGF) ou Palifermin para uso clínico foi precedido por numerosos estudos pré-clínicos, muitos dos quais envolvendo modelos murinos, que permitiram determinar a efetividade de KGF na prevenção da toxicidade da mucosa, assim como seus efeitos adversos (Logan *et al.*, 2007). Avaliações imunohistoquímicas utilizando camundongos foram realizadas empregando o quimioterápico 5-FU como indutor da mucosite (Wu *et al.*, 2010; Letari *et al.* 2010). A utilização de antagonista de receptores de interleucina caracterizou-se como uma possível estratégia para prevenção ou tratamento de mucosite intestinal (Wu *et al.*, 2011).

Ratos são amplamente utilizados para avaliações da patologia e tratamento, em modelos que empregam o uso de quimioterápicos como indutores da mucosite (Carneiro-Filho *et al.*, 2004; Stringer *et al.*, 2007; Logan *et al.*, 2008 a,b; Stringer *et al.*, 2009 a,b). O produto vegetal Iberogast®, que possui

propriedades anti-inflamatórias e compreende nove extratos vegetais, entre eles a camomila, embora tenha conferido melhora parcial nas características histopatológicas da mucosite induzida em ratos, não conferiu proteção significativa contra os efeitos causados por 5-FU (Wright *et al.*, 2009).

Um modelo empregando coelhos foi desenvolvido por Özel *et al.* (2010) para avaliação dos efeitos do 5-FU. Segundo os autores, um modelo padrão com coelhos pode ser desenvolvido a partir dos resultados, que deflagraram efeitos tóxicos do fármaco após dez dias de tratamento.

Obviamente, modelos animais nem sempre remetem ao que acontece com humanos em situações clínicas, entretanto, esses estudos são importantes para determinar eventos que ocorrem na mucosa após a administração de quimioterápicos, bem como possíveis tratamentos (Logan *et al.* 2007).

O presente trabalho contribuiu com os estudos do grupo para aprendizagem e padronização de modelos de mucosite oral e gastrointestinal, induzida por 5-FU em hamsters e ratos, respectivamente. Foram realizados estudos pilotos de indução de mucosite, incluindo avaliações preliminares dos efeitos do extrato de *A. chica*.

No modelo de mucosite gastrointestinal avaliou-se o efeito profilático do extrato de *A. chica* nas doses de 100, 300 e 1000 mg/Kg. As três doses de 5-FU de 90 mg/Kg foram suficientes para produzir evidências clínicas do surgimento da mucosite, como a redução de peso corporal observada em todos os grupos que receberam o quimioterápico, inclusive nos tratados com o extrato. Efeito semelhante foi observado no trabalho de Cool *et al.* (2005) onde administração de 5-FU resultou na redução de peso e o pré-tratamento com fator de crescimento *Insulin-like growth factor-I* não evitou tal efeito (Cool *et al.* 2005).

A variação do peso corporal após quimioterapia não teve relação com a ingestão de alimentos, considerando que a quantidade de ração consumida foi

semelhante entre os grupos tratados ou não com 5-FU. Esse dado sugere um possível efeito na absorção dos nutrientes.

A quimioterapia ocasionou diarreia, porém com menor prevalência e gravidade nos grupos tratados com *A. chica*. O efeito do quimioterápico na diminuição dos níveis sanguíneos de leucócitos e plaquetas não foi impedido pela administração do extrato nas dosagens testadas, a quantidade de eritrócitos manteve-se constante. A leucopenia, trombocitopenia e a diarreia estão entre os principais efeitos colaterais do tratamento com 5-FU (Gibson & Keefe, 2006).

Na observação dos sinais clínicos dos animais durante o experimento, observou-se maior dificuldade de locomoção e de resposta a estímulos no grupo controle salina, quando comparado aos grupos que receberam extrato de *A. chica*.

Quanto às avaliações dos órgãos internos após eutanásia, não foram observadas alterações do peso relativo nos órgãos avaliados (fígado, baço, coração, rins, adrenais, ovários, útero e pulmões). No trato gastrointestinal (estômago e intestino) observaram-se alterações compatíveis com mucosite, como a presença de pontos ulcerativos e vermelhidão em todos os grupos submetidos à quimioterapia, porém sem diferenças entre os grupos pré-tratados com o extrato de *A. chica* e o grupo controle salina.

O pré-tratamento com o extrato de *A. chica* contribuiu para diminuição de alguns efeitos relacionados à mucosite gastrointestinal, porém são necessários estudos complementares de padronização do modelo experimental, que incluem a determinação de parâmetros para análises macroscópicas e microscópicas para um resultado conclusivo de sua atividade.

Além do modelo de mucosite gastrointestinal, o extrato de *A. chica* também foi testado na mucosite oral. Hamsters foram utilizados neste modelo pela facilidade de observação de suas mucosas jugais (Sonis *et al.*, 1990).

Assim como na mucosite gastrointestinal, o quimioterápico escolhido para indução da mucosite oral foi o 5-FU. Além da administração do

quimioterápico foi realizado um trauma mecânico no quarto dia experimental, a fim de reproduzir os sinais clínicos da irritação crônica.

Os hamsters submetidos à quimioterapia apresentaram redução do peso corporal e taxa de sobrevivência de 50 a 90%. A mortalidade iniciou no terceiro dia do teste no grupo tratado com salina, no sexto dia nos grupos tratados com *A. chica* nas doses de 100 ou 250 mg/Kg e nono dia no grupo *A. chica* 1000 mg/Kg.

Estudo realizado pelo grupo de pesquisa do laboratório LAFICA (Lima *et al.*, 2005), demonstrou que a mucosite oral começa no 5º dia do experimento, sendo a inflamação máxima no 10º. O 14º dia corresponde à fase de recuperação, onde há início do processo cicatricial.

Na avaliação macroscópica da mucosa jugal observou-se que os grupos submetidos à quimioterapia (acometidos com mucosite), apresentaram severo eritema e formação de úlceras. A avaliação microscópica corroborou esses achados. O reparo na mucosa no grupo submetido apenas a escoriação mecânica demonstrou que a ranhura, provocada no quarto dia do ensaio, serviu apenas como um fator potenciador e que a quimioterapia foi a responsável pelo surgimento da mucosite.

A administração do extrato de *A. chica* aos animais acometidos pela mucosite permitiu a melhora de alguns sinais clínicos amenizando efeitos decorrentes da quimioterapia, como por exemplo, a diminuição da diarreia na mucosite gastrointestinal e o aumento na taxa de sobrevivência no teste de mucosite oral, porém não forneceu subsídios suficientes para conclusão da sua atividade nesses testes. Os ensaios realizados foram importantes para o delineamento inicial e aprendizagem dos modelos experimentais, porém estudos futuros serão necessários para padronização dos modelos de mucosite. Desta forma, testes complementares de atividade antiulcerogênica empregando-se modelos de úlcera induzida por etanol ou indometacina (anteriormente padronizados no laboratório de farmacologia do CPQBA-Unicamp) foram realizados com o extrato

encapsulado em nanopartículas, para avaliação da atividade no tratamento de úlceras de mucosas.

O efeito antiúlcera de produtos a base de plantas pode estar relacionado com a secreção gástrica, melhora da integridade da mucosa, interferência no *stress* oxidativo, inibição da *Helicobacter pylori*, entre outros fatores. Devido à variabilidade de constituintes químicos presentes nos extratos vegetais, esses produtos podem exibir atividades combinadas (Mofleh, 2011).

Os efeitos ulcerogênicos do etanol desempenham um papel crucial na alteração dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, incluindo destruição do muco e liberação de radicais livres (Mózsik & Javor, 1988; Mofleh, 2011). O uso do etanol na indução de úlceras é realizado através de procedimentos simples e reprodutíveis (Glavin & Szabo, 1992), por isso pode ser considerado um teste de escolha para triagem de amostras com possível efeito antiulcerogênico.

O tratamento com as nanopartículas contendo extratos de *A. chica* no teste de úlcera induzida por etanol promoveu a redução das lesões ulcerativas nas três doses avaliadas (30, 100 e 300 mg/Kg). A dose mais alta das nanopartículas apresentou 76% de redução do índice de lesões ulcerativas em comparação ao grupo controle negativo (Figura 57).

Trabalhos anteriores realizados pelo grupo (Jorge, 2008) caracterizaram a atividade do extrato de *A. chica* em doses maiores (100, 300 ou 1000 mg/Kg, apresentando DE<sub>50</sub> de 125 mg/Kg). Importante ressaltar que as doses utilizadas no presente trabalho referem-se à quantidade de nanopartículas. Se extrapolarmos a quantidade de *A. chica* presente nas partículas, a dose equivalente de extrato testada foi consideravelmente menor. A proporção aproximada de extrato presente nas nanopartículas é de 1:5, ou seja, a dose mais elevada de partículas testada nesse ensaio (300 mg/Kg) corresponde a cerca de 60 mg/Kg de extrato. Esses resultados sugerem que o encapsulamento do extrato em nanopartículas de quitosana propiciou uma diminuição de dose necessária para a atividade proposta.

Complementando a verificação dos efeitos das nanopartículas em úlceras de mucosa, foi realizado o modelo empregando indometacina como agente ulcerativo, que diferente do etanol, provoca a lesão por via sistêmica. A indometacina é um anti-inflamatório não esteroidal que inibe a enzima ciclo-oxigenase (COX) e, conseqüentemente, a síntese de prostaglandinas. A inibição da isoforma COX-2 é responsável pelo efeito anti-inflamatório enquanto que a inibição da isoforma COX-1 resulta nos efeitos adversos no trato gastrointestinal. Devido a seu alto poder ulcerogênico, a indometacina tornou-se a droga de primeira escolha para produzir um modelo experimental de úlcera (Suleyman *et al.*, 2010).

O índice de lesões ulcerativas das nanopartículas de *A. chica* na dose de 200 mg/Kg foi 58% menor que o grupo controle negativo (Figura 59).

Os resultados obtidos com as nanopartículas de *A. chica* nos modelos de lesão ulcerativa induzida por etanol ou indometacina caracterizaram a atividade promissora da amostra em úlceras de mucosa.

Estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisas comprovaram a atividade cicatrizante do extrato de *A. chica* em feridas de pele (Jorge *et al.*, 2008). O presente estudo avaliou a atividade de nanopartículas contendo extrato de *A. chica*, inseridas nos transportadores filme de PVA e hidrogel.

Os filmes de PVA foram rapidamente absorvidos na área da ferida, formando uma película protetora. Os filmes carregados com as três concentrações de nanopartículas (0,5; 1 ou 1,5 mg/unidade de filme) foram ativos apresentando um efeito independente da dose, sendo que a menor dose empregada (0,5 mg de nanopartículas/dia) foi suficiente para produzir o efeito máximo alcançado neste teste, com cerca de 79 % de contração da área da ferida, contra 48 % grupo salina.

Quando comparado ao filme de PVA, a degradação do hidrogel foi muito mais lenta. Após 24 horas do tratamento ainda foram encontrados pedaços do hidrogel na ferida, que eram removidos e trocados por novos todos os dias.

Os hidrogéis carregados com as mesmas quantidades de nanopartículas de *A. chica* que o filme de PVA (0,5, 1 ou 1,5 mg) foram ativos, apresentando contração de até 85% da área da ferida no grupo tratado com o hidrogel incorporado com 1,5 mg de nanopartículas (Figura 62).

A alantoína foi empregada como controle positivo nos testes de avaliação da atividade cicatrizante tanto do filme de PVA como do hidrogel, apresentando redução da área da ferida de 76 e 52%, respectivamente. Acredita-se que a oclusão foi responsável pela baixa atividade desse controle no teste do hidrogel. Para avaliar a atividade do hidrogel no modelo de cicatrização foi necessário utilizar um aparato que mantivesse a amostra em contato com a área da ferida. Para isso empregou-se uma gaze não aderente e uma fita microporosa envolvendo o dorso e a barriga do animal. A oclusão gerada favoreceu a atividade do hidrogel, por manter um ambiente úmido, porém não foi benéfica para a alantoína. O curativo também pode estar relacionado à dificuldade no ganho de peso dos animais durante o teste, considerando que no ensaio onde não foram utilizados curativos ocorreu ganho de peso em todos os grupos.

Tanto o filme absorvível como o hidrogel carregados de nanopartículas de *A. chica* demonstraram atividade no modelo de cicatrização cutânea.

Assim como no ensaio de úlcera gástrica, a dose empregada foi consideravelmente mais baixa se comparada ao uso do extrato livre, evidenciando que o extrato de *A. chica* quando complexado aos polímeros e incorporado em partículas é ativo em doses ainda menores.

O processo de encapsulação do extrato de *A. chica* em nanopartículas de quitosana, entrecruzadas com tripolifosfato de sódio, demonstrou-se uma

alternativa válida para o encapsulamento do extrato e propiciou a redução da dose necessária para os efeitos propostos.

## 7 CONCLUSÃO

O presente trabalho agregou dados aos estudos com a espécie vegetal *Arrabidaea chica*, contribuindo com parâmetros de eficácia, segurança e reprodutibilidade, necessários para viabilizar o desenvolvimento de um produto final.

Para garantir a preservação dos constituintes do extrato de *A. chica* devem ser controlados parâmetros de produção como temperatura (40°C), proteção contra luminosidade, extração em meio ácido, neutralização a valores máximos de pH 6 - 6,5 e emprego de atmosfera inerte para secagem em *spray dryer*.

A formação de nanopartículas de quitosana entrecruzadas com tripolifosfato foi viável e a incorporação do extrato de *A. chica* resultou em complexos estáveis, demonstrando uma possível interação entre o extrato e os polímeros. As melhores condições de preparo das partículas dentre as avaliadas foram proporções de massa 1:5 e volume 1:10 de TPP em relação a quitosana, agitação mecânica com velocidade de 3600 - 7200 rpm e proporção de extrato de *A. chica* de 1:4 em relação a quitosana.

A veiculação das nanopartículas em esponjas, filmes absorvíveis ou hidrogéis propiciou uma forma adicional de emprego das amostras contendo *A. chica*. Esses sistemas de transporte têm como vantagem a possibilidade de adaptações dos parâmetros do processo de produção para atender as aplicações propostas de cicatrização de pele e mucosa.

Os estudos *in vitro* demonstraram a potencial atividade das nanopartículas de *A. chica* na proliferação e migração de fibroblastos.

Os estudos *in vivo* demonstraram a atividade promissora dos sistemas com *A. chica* em úlceras de mucosa, bem como a atividade na cicatrização de úlceras de pele.

O encapsulamento do extrato em nanopartículas propiciou uma diminuição de dose necessária para as atividades propostas, quando comparado ao extrato sem encapsular.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Dados da presente tese de doutorado contribuíram para elaboração de dois pedidos de patentes depositados junto a INOVA-UNICAMP no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

O trabalho do grupo de pesquisas do CPQBA com espécie *A. chica* resultou no processo “Composições farmacêuticas compreendendo extrato de *Arrabidaea chica* Verlot em sistemas de liberação micro e nanoparticulados e lipossomais, processos de fabricação e uso dos mesmos.” Processo número: PCT/BR2012/000532 (Apêndice 2).

A parceria entre os centros de pesquisas brasileiro (CPQBA) e espanhol (CSIC) resultou no pedido de patente “Processo de obtenção de produtos a base de quitosana e enriquecidos com *Arrabidaea chica*” processo número: PCT/BR2013/000496 (Apêndice 3).

## REFERÊNCIAS

Ai, H, Mills, DK, Jonathan AS, Jones SA. Gelatin-glutaraldehyde cross-linking on silicone rubber to increase endothelial cell adhesion and growth. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*. 2002; 38(9): 487-92.

Alcerito T, Barbo FE, Negri G, Santos DYAC, Meda CI, Young MCM, Chávez D, Blatt CTT. Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical and Systematics Ecology*. 2002; 30: 677-83.

Alvarez E, Fey EG, Valax P, Yim Z, Peterson JD, Mersi M, Jeffers M, Dindinger M, Twomlow N, Ghatpande A, La Rochelle WJ, Sonis ST, Lichenstein HS. Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis. *Clin Cancer Res*.2003; 9 (9): 3454-61.

Amaral RRdo, Santos AAD, Saravia A, Botas G, Cruz RAS, Fernandes CP, Rocha L, Boylan F. Biological Activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. *Lat. Am. J. Pharm*. 2012 31 (3): 451- 5.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Legislação de medicamentos fitoterápicos. Resolução RE nº1- 2005. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br>> acesso em janeiro de 2009.

Aranha IB, Lucas EF. Poli (álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2001; 11 (40): 174-81.

Argüelles W, Heras A, Acosta N, Galed G, Gallardo A, Miralles B, Peniche C, San Román J. Caracterización de quitina y quitosano. In: Ana Pastor de Abraham, editor. *Quitina y Quitosano: Obtención, Caracterización y Aplicaciones*. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú/Fondo Editorial; 2004. p.157-206.

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

Augusto CMJ, Borra RC, Gagioti SM, França CM. Avaliação do Extrato de *Uncaria tomentosa* na Prevenção de Mucosite Oral Induzida: Estudo Experimental em Animais. *RevOdontolBrasCentral*. 2010; 18 (48): 57-61.

Bae M-J, Shin HS, Kim E-K, Kim J, Shon D-H. Oral administration of chitin and chitosan prevents peanut-induced anaphylaxis in a murine food allergy model. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013; 61: 164-8.

Barata LES, Schiozer AL, Braga AMP, Schreiber AZ, Fernandes LL. Extratos Fitoterápicos à Base de *Arrabidaea chica* Para Emprego Como Antifúngico e Antibacteriano e Composições Fitoterápicas à Base de Extratos Fitoterápicos de *Arrabidaea chica* Para Emprego Como Antifúngico e Antibacteriano. INPI, Brasil, Patente de Invenção PI0600943-3. 2006.

Barbosa WLR, Pinto LN, Quignard E, Vieira JMV, Silva Jr JOC, Albuquerque S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18: 544-8.

Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Roveri N, Rubini K. Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin. *Biomaterials*. 2002; 23 (24): 4827-32.

Bobbio PA, Bobbio FO. Química do processamento de alimentos. Editora Varela. 2001.

Bourgeteau V, Nding N. Plant extract obtained from the family of Bignoniaceae (*Arrabidaea*), Balanitaceae, Annonaceae (*Monodora*) and Clusiaceae (*Calophyllum*) as active agent for controlling melanogenesis. Patente WO2010146294-A1, 2010.

BRASIL, 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), decreto lei Nº 5813, de 22 de junho de 2006.

BRASIL, 2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (Rennisus), <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>, Brasília.

Burton OT, Zacccone P. The potential role of chitin in allergic reactions. *Trends in Immunology*. 2007; 28 (10): 419-22.

Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and Kinetics of the Crosslinking Reaction between Biopolymers Containing Primary Amine Groups and Genipin. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*. 2003; 41: 3941-53.

Carneiro-Filho BA, Lima IPF, Araujo DH, Cavalcante MC, Carvalho GHP, Brito GAC, Lima V, Monteiro SMN, Santos FN, Ribeiro RA, Lima AAM. Intestinal Barrier Function and Secretion in Methotrexate-Induced Rat Intestinal Mucositis. *Digestive Diseases and Sciences*. 2004; 49 (1): 65-72.

Castañeda-Ovando A, Pacheco-Hernández ML, Páez-Hernández ME, Rodríguez JA, Galán-Vidal CA. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*. 2009; 113: 859-71.

Chapman E, Perkin AG, Robinson R. The colouring matters of carajura. *Journal of the Chemical Society*. 1927: 3015-41.

Chen C-L, Wang Y-M, Liu C-F, Wang J-Y. The effect of water-soluble chitosan on macrophage activation and the attenuation of mite allergen-induced airway inflammation. *Biomaterials*. 2008; 29: 2173-82.

Collins M, Birkinshaw C. Physical properties of crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008; 19 (11): 3335-43.

Cool JC, Dyer JL, Xian CJ, Butler RN, Geier MS, Howarth GS. Pre-treatment with insulin-like growth factor-I partially ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats. *Growth Horm IGF Res.* 2005; 15: 72-82.

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

Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 2013; 1830 (6): 3670-95.

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

Donatini RS, Ishikawa T, Barros SBM, Bacchi ME. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2009; 19 (1A): 89-94.

Dong Y, Kiong NgW, Shen S, Kim S, Tan RBH. Scalable Ionic Gelation Synthesis of Chitosan Nanoparticles for Drug Delivery in Static Mixers. *Carbohydrate Polymers.* 2013; 94 (2): 940-5.

Dos Santos VC, Longo TB, Garcia ALH, Richter MF, Guecheva TN, Henriques JAP, Ferraz ABF, Picada JN. Evaluation of the Mutagenicity and Genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoneaceae), an Amazon Plant with Medicinal Properties. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A.* 2013; 76: 381-390.

Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 2003; 24: 4337-4354.

Fàbregas A, Miñarro M, García-Montoya E, Pérez-Lozano P, Carrillo C, Sarrate R, Sánchez N, Ticó JR, Suñé-Negre JM. Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic

polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 446 (1–2): 199–204.

Faria FO, Stefanivercelheze AE, Mali S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. *Quim. Nova*. 2012; 35 (3): 487-92.

Figueira GM, Ramelo PR, Ogasawara DC, Montanari Jr I, Zucchi MI, Cavallari MM, Foglio MA. A set of microsatellite markers for *Arrabidaea chica* (Bignoniaceae), a medicinal liana from the neotropics. *American Journal of Botany*. 2010: 63-4.

França CM, Núñez SC, Prates RA, Noborikawa E, Faria MR, Ribeiro MS. Low-intensity red laser on the prevention and treatment of induced-oral mucositis in hamsters. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2009; 94: 25-31.

Frank K, Kohler K, Schuchmann HP. Stability of anthocyanins in high pressure homogenization. *Food Chemistry*. 2012a; 130: 716-719.

Frank K, Walz E, Gräf V, Greiner R, Köhler K, Schuchmann HP. Stability of anthocyanin-rich w/o/w-emulsions designed for intestinal release in gastrointestinal environment. *Journal of Food Science*. 2012b; 77 (12): N50-N57.

Gan Q, Wang T, Cochrane C, McCarron P. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2005; 44: 65-73.

Garcia-Fuentes M, Alonso MJ. Chitosan-based drug nanocarriers: Where do we stand? *Journal of Controlled Release*. 2012; 161: 496-504.

Gibson RJ, Keefe DMK. Cancer chemotherapy-induced diarrhea and constipation: mechanisms of damage and prevention strategies. *Support Care Cancer*. 2006; 14: 890-900.

Glavin GB, Szabo S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. *The FASEB Journal*. 1992; 6: 825-31.

Gonsalves AA, Araújo CRM, Soares NA, Goulart MOF, Abreu FC. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. *Quim. Nova*. 2011; 34 (7): 1215-23.

Gough JE, Scotchford CA, Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002; 61 (1): 121-30.

Granada A, Nemen D, Dora CL, Neckel GL, Lemos-Senna E. O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. 2007; 28 (2): 129-39.

Grazú V, Moros M, Sánchez-Espinel C. Nanocarriers as Nanomedicines: Design Concepts and Recent Advances, Chapter 14. *Frontiers of Nanoscience*. 2012; 4 (1): 337-9.

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

Hansson M, Olsson I, Nauseef WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2006; 445: 214-24.

Harborne JB, Williams CA. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Report*. 2001; 18: 310-33.

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

Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Le PM, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SA, Arnason JT. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*. *Phytochemical Analysis*. 2007; 18 (2): 161-9.

Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2002; 13: 572-84.

Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*, London: Elsevier. 2007.

Hennink WE, Van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002; 54 (1): 13-36.

Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*. 2008; 49 (8): 1993-2007.

Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012; 64: 18-23.

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

Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*. 2004; 22 (7): 354-62.

Janes KA, Fresneau MP, Marazuela A, Fabra A, Alonso MJ. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*. 2001; 73: 255-67.

Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*. 2011; 29: 322-37.

Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2002; 54 (1): 37-51.

Jorge MP, Madjarof C, Ruiz ALTG, Fernandes AT, Rodrigues RAF, Souza IMO, Foglio MA, Carvalho JE. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010; 118: 361-6.

Jorge MP. Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Arrabidaea chica* Verlot [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas; 2008.

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

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

Lai JY, Li YT, Wang TP. *In Vitro* Response of Retinal Pigment Epithelial Cells Exposed to Chitosan Materials Prepared with Different Cross-Linkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010; 11: 5256-72.

Lee JH, Cho KM. Changes occurring in compositional components of black soybeans maintained at room temperature for different storage periods. *Food Chemistry*. 2012; 131: 161-9.

Leitão RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EA, Macedo FD, Silva LR, Oria RB, Vale ML, Cunha FQ, Brito GA. Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced

experimental oral mucositis in hamster. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2007; 59 (5): 603-12.

Letari O, Booth C, Bonazzi A, Garofalo P, Makovec F, Rovati LC, Caselli G. Efficacy of CR3294, a new benzamidine derivative, in the prevention of 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis and diarrhea in mice. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2010; 66: 819-27.

Liang CC, Park AY, Guan JL. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols.* 2007; 2 (2): 329-33.

Lila MA. Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2004; (5): 306-13.

Lima V, Brito GAC, Cunha FQ, Rebouças CG, Falcão BAA, Augusto RF, Souza MLP, Leitão BT, Ribeiro RA. Effects of the tumor necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113 (3): 210-7.

Logan RM, Gibson RJ, Bowen JM, Stringer AM, Sonis ST, Keefe DMK. Characterisation of mucosal changes in the alimentary tract following administration of irinotecan: implications for the pathobiology of mucositis. *Cancer ChemotherPharmacol.* 2008b; 62: 33-41.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. Serum levels of NF $\kappa$ B and pro-inflammatory cytokines following administration of mucotoxic drugs. *Cancer Biology & Therapy.* 2008a; 7 (7): 1139-45.

Logan RM, Stringer AM, Bowen JM, Yeoh AS-J, Gibson RJ, Sonis ST, Keefe DMK. The role of pro-inflammatory cytokines in cancer treatment-induced alimentary tract mucositis: Pathobiology, animal models and cytotoxic drugs. *Cancer Treatment Reviews.* 2007; 33: 448-60.

Long LH, Hoi A, Halliwell B. Instability of, and generation of hydrogen peroxide by, phenolic compounds in cell culture media. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2010; 501: 162-9.

Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum. 2002; p. 85.

Mafioleti L, Junior IFS, Colodel EM, Flach A, Martins DTO. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *Journal of Ethnopharmacology*. 2013; 150 (2): 576-82.

Magalhães IRS, Soares AO, Araújo LM, da Costa PRC, Roland IA, Borrás MRL. Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the Leaves and Tea of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.). *Verl. Biol Trace Elem Res*. 2009; 132: 239-46.

Matsuda S, Iwata H, Se N, Ikada Y. Bioadhesion of gelatin films crosslinked with glutaraldehyde. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999; 45 (1): 20-7.

Medeiros CACX. *Estudo do efeito da atorvastatina na mucosite oral induzida por 5-fluorouracil em hamsters [Tese]*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina; 2010.

Mehnert W, Mader K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001; 47: 165-96.

Mercadante AZ, Bobbio FO. Anthocyanins in Foods: Occurrence and Physicalchemical Properties. *Food Chemical and Functional Properties*. 2007; 4.3.

Mishra D, Hubenak JR, Mathur AB. Nanoparticle systems as tools to improve drug delivery and therapeutic efficacy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013; 101 (12): 3646-60.

Mofleh I A Al. Spices as Alternative Agents for Gastric Ulcer Prevention and Treatment. In Jianyuan Chai, editor. Peptic Ulcer Disease. Rijeka: InTech; 2011. p. 351-74.

Monteiro KM. Avaliação Farmacológica e Toxicológica do Complemento nutricional “TK3” [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Ciências Médicas; 2006.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65: 55-63.

Mózsik G, Javor T. A biochemical and pharmacological approach to the genesis of ulcer disease. I. A model study of ethanol-induced injury to gastric mucosa in rats. *Digestive Diseases Sciences.* 1988; 33: 92-105.

Muzzarelli RAA. Chemical and Technological Advances in Chitins and Chitosans Useful for the Formulation of Biopharmaceuticals. In: Bruno Sarmiento, José das Neves, editores. Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting, and polymer therapeutics. Chichester: Wiley. 2011: 3-16.

Nasti A, Zaki NM, Leonardis P, Ungphaiboon S, Sansongsak P, Rimoli MG, Tirelli N. Chitosan/TPP and Chitosan/TPP-hyaluronic Acid Nanoparticles: Systematic Optimisation of the Preparative Process and Preliminary Biological Evaluation. *Pharmaceutical Research.* 2009; 26 (8): 1918-30.

Nguyen MXH. Characterization of allergenic and antimicrobial properties of chitin and chitosan and formulation of chitosan-based edible film for instant food casing [TESE]. Melbourne: School of Applied Sciences Science, Engineering and Health Colleges RMIT University; 2012.

Nickerson MT, Farnworth R, Wagar E, Hodge SM, Rousseau D, Paulson AT. Some physical and microstructural properties of genipin-crosslinked gelatin-

maltodextrin hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006; 38 (1): 40-4.

Nishikawa DO, Zague V, Pinto CASO, Vieira RP, Kaneko TM, Velasco MVR, Baby AR. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais peel-off contendo rutina. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 2007; 28 (2): 227-32.

Oliveira DPC, Borrás MRL, Ferreira LCL, López-Lozano JL. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. &Bonpl.) B. Verl. sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 2009; 19 (2B): 643-9.

Oliveira PA. Estudo da estabilidade e estabilização das antocianinas do bagaço de uva seibel [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2001.

Ortega FR, Rodríguez G, Aguilar MR, García-Sanmartín J, Martínez A, San Román J. Comportamiento reológico de geles biodegradables para aplicaciones en medicina regenerativa. *Biomecánica*. 2012; 20: 7-19.

Ortega FR. Preparation and development of new bioactive resorbable polymeric systems loaded with bemiparin for drug delivery and tissue engineering [tese]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2013.

Özel O, Aycicek A, Kenar F, Aktepe F, Sargin R, Yilmaz MD, Derekoy FS. Histopathologic changes in the rabbit submandibular gland after 5-fluorouracil chemotherapy. *Turk J Med Sci*. 2010; 40 (2): 213-20.

Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Preparation and characterization of polyvinyl alcohol-gelatin hydrogel membranes for biomedical applications. *AAPS PharmSciTech*. 2007; 8 (1): 142-6.

Pauletti PM, Castro-Gamboa I, Silva DHS, Young MCM, Tomazela DM, Eberlin MN, Bolzani VS. New antioxidant C-Glucosylxanthenes from stems of *Arrabidaea samydoidea*. *Journal of Natural Products*. 2003; 66: 1384-7.

Pauly G, Pauly M, Pauly FM, Moser P, Pauly-florentiny M. Cosmetic or pharmaceutical preparation containing *Arrabidaea chica* extract, effective e.g. as antioxidant, antiinflammatory agent and/or elastase inhibitor in skin care or sun protective compositions. *Brasil Patente WO200152809-A*, 2001.

Pavesi VCS, Guedes Filho JE, Fernandes KPS, Bussadori SK, Bach EE, Biasotto-Gonzalez DA, Martins MD. Efeito de cogumelos medicinais na reabilitação da inflamação químico-induzida. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*. 2008; 37 (1): 10-4.

Peattie RA, Nayate AP, Firpo MA, Shelby J, Fisher RJ, Prestwich GD. Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants. *Biomaterials*. 2004; 25: 2789-98.

Pedro AS, Cabral-Albuquerque E, Ferreira D, Sarmiento B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*. 2009; 76: 501-8.

Peng HT, Martineau L, shek PN. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2008; 19 (3): 997-1007.

Peniche C, Fernández M, Rodríguez G, Parra J, Jimenez J, Bravo AL, Gómez D, San Román J. Cell supports of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate systems. Morphology and biological behavior. *J Mater Sci: Mater Med*. 2007; 18: 1719-1726.

Peppas NA, Simmons REP. Mechanistic analysis of protein delivery from porous poly(vinyl alcohol) systems. *J. Drug Del. Sci. Tech*. 2004; 14 (4): 285-289.

Pina F, Melo MJ, Laia CAT, Parola AJ, Lima JC. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 869-908.

Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82: 513-23.

Ribeiro AFC, Telles TC, Ferraz VP, Souza-Fagundes EM, Cassali GD, Carvalho AT, Melo MM. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 2012; 22(2): 364-73.

Roy K, Mao H-Q, Huang S-K, Leong KW. Oral gene delivery with chitosan–DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine.* 1999; 5 (4): 387-91

Saegusa Y, Ichikawa T, Iwai T, Goso Y, Ikezawa T, Nakano M, Shikama N, Saigenji K, Ishihara K. Effects of acid antisecretory drugs on mucus barrier of the rat against 5-fluorouracil-induced gastrointestinal mucositis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology.* 2008; 43: 531-7.

Sahoo N, Manchikanti P, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia.* 2010; 81: 462-71.

Saraf AS. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia.* 2010; 81: 680-9.

Scogin R. Anthocyanins of the Bignoniaceae. *Biochemical and Systematics Ecology.* 1980; 8: 273-76.

Segura T, Anderson BC, Chung PH, Webber RE, Shull KR, Shea LD. Crosslinked hyaluronic acid hydrogels: a strategy to functionalize and pattern. *Biomaterials.* 2005; 26: 359-71.

Shu XZ, Zhu KJ. A novel approach to prepare tripolyphosphate/chitosan complex beads for controlled release drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2000; 201: 51-8.

Signini R, Campana Filho SP. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2001; 11 (2): 58-64.

Silva CF. *Micropartículas de quitosana com didanosina e sua formulação em grânulos mucoadesivos [tese]*. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química; 2006.

Singh R., Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug deliver. *Experimental and Molecular Pathology/ExpMolPathol*. 2009; 86 (3): 215–23.

Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2004; 274: 1-33.

Siraichi JT, Pedrochi F, Natali MR, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Bento AC, Baesso ML, Nakamura CV. Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*. *Appl Spectrosc*. 2013a; 67 (10):1179-84.

Siraichi JTG, Felipe DF, Brambilla LZS, Gatto MJ, Terra VA, Cecchini AL, Cortez LER, Rodrigues-Filho E, Cortez DAG. Antioxidant Capacity of the Leaf Extract Obtained from *Arrabidaea chica* Cultivated in Southern Brazil. *PLoS ONE*. 2013b; 8(8): 1-9.

Sonis ST, Peterson RL, Edwards LJ, Lucey CA, Wang L, Manson L. et al. Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol*. 2000; 36: 373–81.

Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990; 69 (4): 437-43.

Sousa IMO. Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de bases semissólidas, contendo *Arrabidaea chica* (humb.&bonpl.) Verlot, para uso em cicatrização [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia; 2013.

Stringer AM, Gibson RJ, Bowen JM, Logan RM, Ashton K, Yeoh AS-J, Al-Dasooqi N, Keefe DMK. Irinotecan-induced mucositis manifesting as diarrhoea corresponds with an amended intestinal flora and mucin profile. *Int. J. Exp. Path.* 2009b; 90: 489-99.

Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS-J, Burns J, Keefe DMK. Chemotherapy-Induced Diarrhea Is Associated with Changes in the Luminal Environment in the DA Rat. *Exp Biol Med.* 2007; 232: 96-106.

Stringer AM, Gibson RJ, Logan RM, Bowen JM, Yeoh AS-J, Burns, Laurence J, Keefe DMK. Irinotecan-induced mucositis is associated with changes in intestinal mucins. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2009a; 64: 123-32.

Suleyman H, Albayrak A, Bilici M, Cadirci E, Halici Z. Different Mechanisms in Formation and Prevention of Indomethacin-induced Gastric Ulcers. *Inflammation.* 2010; 33 (4): 224-34.

Taffarello D, Jorge MP, Sousa IMO, Duarte MCT, Figueira G M, Queiroz NCA, Rodrigues RAF, Carvalho JE, Ruiz GALT, Foglio MA. Atividade de Extratos de *Arrabidaea Chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot Obtidos por Processos Biotecnológicos sobre a Proliferação de Fibroblastos e Células Tumerais Humanas. *Química Nova.* 2013; 36(3): 431-6.

Takemura OS, Iinuma M, Tosa H, Miguel OG, Moreira EA, Nozawa YA. Flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. Cuprea. *Phytochemistry*. 1995; 38: 1299-300.

Thapa RK, Khan GM, Parajuli-Baral K, Thapa P. Herbal Medicine Incorporated Nanoparticles: Advancements in Herbal Treatment. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 03 (24): 7-14.

Tsuda T, Ueno Y, Yoshikawa T, Hitoshi K, Toshihiko O. Microarray profiling of gene expression in human adipocytes in response to anthocyanins. *Biochemical Pharmacology*. 2006; 71(8): 1184-97.

Van Vlierberghe S, Dubruel P, Schacht E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*. 2011; 12 (5), 1387-408.

Vanderhooft JL, Alcoutlabi M, Magda JJ, Prestwich GD. Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan–Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2009; 9 (1): 20-8.

Vasir JK, Tambwekar K, Garg S. Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 255: 13-32.

Vila A, Sánchez A, Tobío M, Calvo P, Alonso MJ. Design of biodegradable for protein delivery. *Journal of Controlled Release* 2002; 78: 15-24.

Von Poser GL, Schripsema J, Henriques AT, Jensen SR. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Bioch. Syst. Ecol.* 2000; 28: 351-66.

Waibel KH, Haney B, Moore M, Whisman B, Gomez R. Safety of Chitosan Bandages in Shellfish Allergic Patients. *Military Medicine*. 2011; 176 (10): 1153-6.

Wang BC, He R, Li ZM. The Stability and Antioxidant Activity of Anthocyanins from Blueberry. *Food Technol. Biotechnol.* 2010; 48 (1): 42-9.

Wang C, Lau TT, Loh WL, Su K, Wang DA. Cytocompatibility study of a natural biomaterial crosslinker—Genipin with therapeutic model cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2011; 97B (1): 58-65.

Wright TH, Yazbeck R, Lymn KA, Whitford EJ, Cheah KY, Butler RN, Feinle-Bisset C, Pilichiewicz AN, Mashtoub S, Howarth GS. The herbal extract, Iberogast®, improves jejunal integrity in rats with 5-Fluorouracil (5-FU)-induced mucositis. *Cancer Biology & Therapy*. 2009; 8 (10): 923-9.

Wu Z, Han X, Qin S, Zheng Q, Wang Z, Xiang D, Zhang J, Lu H, Wu M, Zhu S, Yu Y, Wang Y, Han W. Interleukin 1 receptor antagonist reduces lethality and intestinal toxicity of 5-fluorouracil in a mouse mucositis model. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2010; 64: 89-93.

Wu ZQ, Han XD, Wang Y, Yuan KL, Jin ZM, Di JZ, Yan J, Pan Y, Zhang P, Huang XY, Wang ZG, Zheng Q. Interleukin-1 receptor antagonist reduced apoptosis and attenuated intestinal mucositis in a 5-fluorouracil chemotherapy model in mice. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011; 68 (1): 87-96.

Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26 (14): 1925-33.

Yoo JS, Kim YJ, Kim SH, Choi SH. Study on genipin: A new alternative natural crosslinking agent for fixing heterograft tissue. *Korean Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2011; 44 (3): 197-207.

Zafra-stone S, Yasmin T, Bagchi M. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2007; 51(6): 675-83.

Zandi M, Mirzadeh H, Mayer C. Effects of concentration, temperature, and pH on chain mobility of gelatin during the early stages of gelation. *Iranian Polymer Journal (English Edition)*. 2007; 16 (12): 861-70.

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

## APÊNDICE 1



CEUA/Unicamp

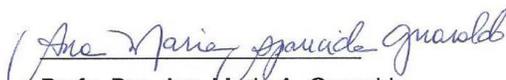
### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

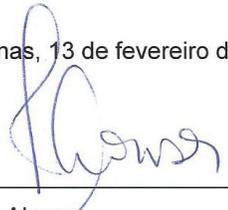
#### CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "*Arrabidaea chica* Verlot: formulações de liberação sustentada para aplicação em úlceras de mucosa e pele" (protocolo nº 1900-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Ann Foglio / Leila Servat, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 13 de fevereiro de 2012.

Campinas, 13 de fevereiro de 2012.

  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

2ª. VIA

## APÊNDICE 2

[Mobile](#) | [Deutsch](#) | [Español](#) | [Français](#) | [日本語](#) | [한국어](#) | [Português](#) | [Русский](#) | [中文](#)



**PATENTSCOPE**  
 Search International and National Patent Collections

---

**WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION**  
[Search](#) | [Browse](#) | [Translate](#) | [Options](#) | [News](#) | [Login](#) | [Help](#)

Home > IP Services > PATENTSCOPE

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

[PCT Biblio: Data](#) | [Description](#) | [Claims](#) | [National Phase](#) | [Notices](#) | [Drawings](#) | [Documents](#)

Latest bibliographic data on file with the International Bureau [⇒ Submit observation](#) [PermaLink](#)

---

**Pub. No.:** WO/2013/091056      **International Application No.:** PCT/BR2012/000532  
**Publication Date:** 27.06.2013      **International Filing Date:** 19.12.2012

**IPC:** **A61K 36/185** (2006.01), **A61K 9/127** (2006.01), **A61K 9/50** (2006.01), **A61K 9/60** (2006.01), **A61P 31/04** (2006.01), **A61P 31/10** (2006.01)

**Applicants:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831 Distrito De Barão Geraldo Caixa Postal 6.131 CEP 13083-970 - Campinas - SP (BR)

**Inventors:** FOGLIO, Mary Ann; (BR).  
 CARVALHO, João Ernesto de; (BR).  
 RUIZ, Ana lucia tasca Góis; (BR).  
 JORGE, Michelle Pedroza; (BR).  
 SERVAT, Leila; (BR).  
 ZAGO, Patricia Maria Wiziack; (BR).  
 EBERLIN, Marcos Nogueira; (BR).  
 POLCELLI, Elaine Cristina Cabral; (BR).  
 SANTANA, Maria Helena Andrade; (BR).  
 SOUZA, Viviane Ferre de; (BR).  
 FIGUEIRA, Glyn Mara; (BR).  
 OLIVEIRA, Ilza Maria; (BR).  
 RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira; (BR)

**Agent:** SILVADO, Fernanda Lavras Costallat; Rua Roxo Moreira 1831 Distrito de Barão Geraldo Caixa Postal 6.131 CEP: 13083-970 - Campinas -SP (BR)

**Priority Data:** P11105312-7 20.12.2011 BR

**Title**  
**(EN)** PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING *ARRABIDAEA CHICA* EXTRACT IN CONTROLLED RELEASE SYSTEMS, PRODUCTION PROCESS AND USE THEREOF  
**(FR)** COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES COMPRENANT UN EXTRAIT D'*ARRABIDAEA CHICA* DANS DES SYSTÈMES À LIBÉRATION CONTRÔLÉE, PROCÉDÉ DE FABRICATION ET UTILISATION DE CEUX-CI  
**(PT)** COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS COMPREENDENDO EXTRATO DE *ARRABIDAEA CHICA* EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PROCESSO DE FABRICAÇÃO E USO DOS

# APÊNDICE 3

< Uso exclusivo do INPI >

Espaço reservado ao protocolo



INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
PROTEÇÃO DE MARCAS

26/12/2012 018120047755  
UP21/12/2012



BR 10 2012 033126 8

Espaço para etiqueta

## DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
- 1.2 Qualificação PESSOA JURÍDICA DE DIREITO PÚBLICO, AUTARQUIA ESTADUAL
- 1.3 CNPJ/CPF: 460684250001/33
- 1.4 Endereço Completo CIDADE UNIVERSITÁRIA, "ZEFERINO VAZ"
- 1.5 CEP: 13083-970                      1.6 Telefone (19) 35215015                      1.7 Fax: (19) 35215210
- 1.8 E-mail: patentes@inova.unicamp.br

continua em folha anexa

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

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

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

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

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº \_\_\_\_\_                      Data de Depósito: \_\_\_\_\_

- 5. Prioridade:**                       interna                       unionista

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

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmb(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: MARY ANN FOGLIO
- 6.2 Qualificação BRAS, DIVORCIADA, PESQUISADOR                      6.3 CPF: 096.776.818-77
- 6.4 Endereço completo RUA ALEXANDRE CAZAELLATO, 999, EM PAULÍNIA - SP
- 6.5 CEP: 13081-970                      6.6 Telefone: 19 2139-2861                      6.7 Fax:
- 6.8 E-Mail: foglioma@cpqba.unicamp.br

continua em folha anexa

653 - PARTICULARES