

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CICATRIZANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE *Casearia sylvestris* Swartz EM ANIMAIS E  
IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS**

**ELAISE GONÇALVES PIERRI**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS**

**ARARAQUARA-SP**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JULIO DE MESQUITA FILHO"**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CICATRIZANTE E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE *Casearia sylvestris* Swartz EM ANIMAIS E  
IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS**

**ELAISE GONÇALVES PIERRI**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

**ORIENTADOR: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos**

**Araraquara**

**2013**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Pierri, Elaise Gonçalves

P622a      Avaliação das atividades cicatrizante e anti-inflamatória de *Casearia sylvestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos / Elaise Gonçalves Pierri. – Araraquara, 2013  
125 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Orientador: André Gonzaga dos Santos

1. *Casearia sylvestris*. 2. Salicaceae. 3. Diterpenos clerodânicos. 4. Casearinas. 5. Anti-inflamatório. 6. Cicatrizante. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.

*“...e nunca considerem seu estudo como uma obrigação, mas sim como uma oportunidade invejável de aprender, sobre a influência libertadora da beleza no domínio do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro.”*

*Albert Einstein*

## DEDICATÓRIA

*Ao meu paizinho querido, Epaminondas, que tantas vezes apoiou e amparou os momentos mais importantes de minha vida e sempre incentivou este projeto e que agora se encontra na casa do PAI. Este trabalho é para você papai, que nunca me deixou desistir!*

*A minha mãezinha, Clarice, pelo amor, colo e aconchego que tantas vezes precisei!*

*Aos meus filhos queridos Ricardo, Vinícius e Isabella por nunca desistirem da mãe “sargento” deles! Vocês foram minha inspiração.*

*Ao meu marido Eduardo Augusto que foi companheiro, paciente, dedicado, incentivador, amoroso, em muitos momentos patrocinador deste projeto, dedico a ele os louros de mais esta vitória.*

*Aos meus irmãos Elaine, Elair, Eduardo Henrique e Roselaine que mesmo de longe sempre torceram por mim.*

*Aos meus amigos e irmãos em Cristo das Equipes de Nossa Senhora de Araraquara (Equipe 12) que sempre oraram por mim nesta caminhada.*

## **Agradecimentos**

A DEUS, acima de tudo, pelo dom da vida e da sabedoria em viver!

Aos animais pela existência e por possibilitar que o homem faça novas descobertas na ciência.

Ao meu orientador Professor Dr. André Gonzaga dos Santos que desde o primeiro momento não hesitou em encarar mais este desafio. E também por sua amizade e dedicação que sempre demonstrou a seus alunos, formando não só cientistas, mas seres humanos com cabeça pensante. Continue assim professor, porque só assim poderemos deixar de herança um futuro melhor para nossos filhos e netos.

A Professora Dra. Chung Man Chin pela “barriga de aluguel” no início deste projeto. Deixo aqui minha eterna gratidão.

A minha grande amiga e irmã Professora Dra. Selma Lucy Franco do Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá-PR, pelo apoio logístico, técnico, e por muitas vezes emocional durante mais esta caminhada. Serei eternamente grata a DEUS por você existir e participar de minha vida e do meu crescimento pessoal e espiritual.

Ao Laboratório de Histologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, especialmente ao Professor Dr. Cleverton Roberto de Andrade pelo auxílio esclarecedor.

Ao Professor Aristeu Tininis do Instituto Federal de São Paulo localizado na cidade de Matão por permitir a utilização de seu laboratório para a realização das análises em CLAE-DAD.

A Professora Dra. Luzmarina Hernandes do Laboratório de Histologia e Embriologia, Departamento de Ciências Morfológicas da Universidade Estadual de Maringá-PR, pelos ensaios de cicatrização.

A minha “segunda filha”, Carla, aluna de iniciação científica que abraçou minha causa colaborando com os ensaios de inflamação.

As estagiárias Juliana e Elaine que muito colaboraram com os ensaios de controle de qualidade.

Aos técnicos Eduardo, Caio, Matheus, Rodrigo, Margarete e Angélica que muitas vezes socorreram no laboratório, meu MUITO OBRIGADO!

Ao grupo LAPDESF pela parceria proporcionando o suporte para a realização desta pesquisa.

Para não cometer injustiças esquecendo algum nome, agradeço à “família Lapdesf” por ter me adotado como “irmãzinha”.

Aos meus amigos de laboratório Josiane, Ana Carolina, Poliana, Natália, Ana Paula, Flávio, Paulo Renato, Rafael e todos que fizeram parte de minha vida nestes três anos de caminhada.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

A CAPES pela apoio financeiro.

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 1:</b> Geração dos metabólitos do ácido aracdônico e seus papéis na inflamação. Os alvos moleculares das ações de alguns fármacos anti-inflamatórios são indicados por um X vermelho. Os agentes que inibem a produção de leucotrienos pela inibição da 5-lipoxigenase ou bloqueiam os receptores de leucotrienos não são mostrados. COX, Ciclo-oxigenase; HETE, ácido hidroxeicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico ... | <b>10</b> |
| <b>Figura 2:</b> Visão geral das respostas de cura após lesão. A cura após lesão aguda pode ocorrer por regeneração que restaura a estrutura normal do tecido ou por reparo com formação de cicatriz. A cura na lesão crônica envolve formação de cicatriz e fibrose .....                                                                                                                                                                              | <b>14</b> |
| <b>Figura 3:</b> Esquema do corte histológico da pele .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>16</b> |
| <b>Figura 4:</b> <i>Casearia sylvestris</i> Swartz indivíduo adulto e detalhe de folhas e flores .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>23</b> |
| <b>Figura 5:</b> Estrutura química geral de diterpenos clerodânicos presentes nas espécies de <i>Casearia</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>25</b> |
| <b>Figura 6:</b> Extração em fase sólida a partir do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>34</b> |
| <b>Figura 7:</b> Distribuição granulométrica de folhas seca e pulverizadas de <i>C. sylvestris</i> . Média de 5 determinações .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>46</b> |
| <b>Figura 8:</b> Cromatoplaça (sílica gel) das frações <b>EFSCs1, 2, 3</b> e extrato etanólico ( <b>EEtCs</b> ) (5,0 mg/mL, metanol) e padrões de diterpenos: casearina X ( <b>cas X</b> ), B ( <b>cas B</b> ) e caseargrewiina F ( <b>casg F</b> ) (1,0 mg/mL, metanol) .....                                                                                                                                                                          | <b>48</b> |
| <b>Figura 9:</b> Cromatograma do EEtCs e espectro no UV da caseargrewiina F. Condições de análise descritas acima (item 4.4.2.2) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>49</b> |
| <b>Figura 10:</b> Cromatograma da fração EFSCs2 e espectro no UV da caseargrewiina F. Condições de análise descritas acima (item 4.4.2.2).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>50</b> |
| <b>Figura 11:</b> Cromatograma do padrão de caseargrewiina F e seu espectro no UV. Condições de análise descritas acima (item 4.4.2.2) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>50</b> |
| <b>Figura 12:</b> Cromatograma do padrão de casearina X e seu espectro no UV. Condições de análise descritas acima (item 4.4.2.2) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>51</b> |
| <b>Figura 13:</b> Cromatograma do padrão de casearina B e seu espectro no UV. Condições de análise descritas acima (item 4.4.2.2) .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>51</b> |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 14:</b> Curva de calibração para solução padrão de caseargrewiina F em metanol .....                                                                                                                                                                                                                                       | <b>52</b> |
| <b>Figura 15:</b> Cromatoplaça (sílica gel) das frações CCCs1-54 em duas fases móveis distintas: CCCs1-18 (FM I: hexano:acetato de etila:isopropanol 70:28:02) e CCCs16-54 (FM II: hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37,3:2,7) .....                                                                                            | <b>55</b> |
| <b>Figura 16:</b> Cromatogramas das frações CCCs nas condições descritas no item 4.4.3 .....                                                                                                                                                                                                                                         | <b>55</b> |
| <b>Figura 17:</b> Estrutura química da casearina J e principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY (setas duplas) e HETCOR LR (setas simples) .....                                                                                                                                                                  | <b>58</b> |
| <b>Figura 18:</b> Curva analítica para solução padrão de casearina J em metanol...                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>60</b> |
| <b>Figura 19:</b> Análise longitudinal do grupo controle que recebeu injeção subplantar de solução de carragenina (0,1 mL/pata) .....                                                                                                                                                                                                | <b>62</b> |
| <b>Figura 20:</b> Análise longitudinal do grupo controle que recebeu injeção subplantar de solução salina (0,1 mL/pata).....                                                                                                                                                                                                         | <b>62</b> |
| <b>Figura 21:</b> Efeito da administração de EEtCs (10mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média $\pm$ erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6) ..... | <b>63</b> |
| <b>Figura 22:</b> Efeito da administração de EEtCs (100mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média $\pm$ erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6)..... | <b>63</b> |
| <b>Figura 23:</b> Efeito da administração de EFSCs1 (10mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média $\pm$ erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6)..... | <b>65</b> |
| <b>Figura 24:</b> Efeito da administração de EFSCs1 (50mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média $\pm$ erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6)..... | <b>65</b> |

- Figura 25:** Efeito da administração de EFSCs2 (10mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....66
- Figura 26:** Efeito da administração de EFSCs2 (50mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....66
- Figura 27:** Efeito da administração de CasgwF (0,5mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....68
- Figura 28:** Efeito da administração de CasgwF (2,5mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....68
- Figura 29:** Efeito da administração de CasgwF (5,0mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....69
- Figura 30:** Efeito da administração de CasB (0,5mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....69
- Figura 31:** Efeito da administração de CasB (2,5mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6) ..... 70

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 32:</b> Efeito da administração de CasB (5,0mg/Kg, v.o.) e Indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média $\pm$ erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).....                           | 70 |
| <b>Figura 33:</b> Fotografia dos estômagos dos ratos tratados e não tratados. <b>(a)</b> Grupo controle; <b>(b)</b> Grupo Indometacina 100 mg/Kg; <b>(c)</b> Grupo EEtCs 100 mg/Kg. Encontramos lesões com quadro hemorrágico em <b>(b)</b> .....                                                                                                             | 73 |
| <b>Figura 34:</b> Temperatura retal dos ratos medida ao longo do experimento .....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 75 |
| <b>Figura 35:</b> Medida do peso corporal a longo dos dias, demonstrando perda de até 10 % para o grupo tratado com AIE e 5 % para o grupo tratado com o extrato no final do experimento .....                                                                                                                                                                | 75 |
| <b>Figura 36:</b> Medida das patas traseiras ao final do experimento em cm (Dorso/Ventral [seta preta] x Latero/Medial [seta azul] x Antero/Posterior [seta vermelha]) .....                                                                                                                                                                                  | 76 |
| <b>Figura 37:</b> Medida da área das patas traseiras ao final do experimento em cm <sup>3</sup> (Dorso/Ventral x Latero/Medial x Antero/Posterior) (*p < 0,05 em relação ao controle positivo para a doença AR, **p < 0,05 em relação ao controle negativo para a doença AR [ratos saudáveis] – ANOVA).....                                                   | 77 |
| <b>Figura 38:</b> Fotografia dos cortes histológicos em HE, das patas traseiras, dos animais ao término do experimento em microscópio - Leica MZAPO. Aumento de 40 e 200x .....                                                                                                                                                                               | 78 |
| <b>Figura 39:</b> Ferida no dorso de rato Wistar durante o tratamento. <b>Esquerda:</b> ferida tratada com gelcreme base; <b>direita:</b> gelcreme de caseargrewiina F 0,06%. <b>(A)</b> início do tratamento; <b>(B)</b> 7 <sup>o</sup> dia de tratamento; <b>(C)</b> 10 <sup>o</sup> dia de tratamento e <b>(D)</b> 14 <sup>o</sup> dia de tratamento ..... | 79 |
| <b>Figura 40:</b> Corte transversal da ferida cutânea no dorso do rato Wistar coradas em HE (aumento de 10x). As setas indicam células bloqueadas em metáfase na língua de reepitelização onde, <b>(A):</b> grupo controle (gelcreme base); <b>(B):</b> grupo tratado (gelcreme EEtCs 2% ou gelcreme CasgwF 0,06%).....                                       | 82 |
| <b>Figura 41:</b> Língua de reepitelização mostra como foram realizadas as medidas de espessura e perímetro do epitélio neoformado .....                                                                                                                                                                                                                      | 82 |
| <b>Figura 42:</b> Análise da área de reepitelização (μm <sup>2</sup> ) da ferida dos animais tratados com gemcreme CasgwF 0,06% .....                                                                                                                                                                                                                         | 83 |

|                                                                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Figura 43:</b> Análise do perímetro de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gemcreme CasgwF 0,06% .....  | <b>83</b> |
| <b>Figura 44:</b> Análise da espessura de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gemcreme CasgwF 0,06% .....  | <b>84</b> |
| <b>Figura 45:</b> Análise do índice mitótico realizada em 10 campos de 400x da ferida dos animais tratados com gemcreme CasgwF 0,06% ..... | <b>84</b> |
| <b>Figura 46:</b> Análise da área de reepitelização ( $\mu\text{m}^2$ ) da ferida dos animais tratados com gemcreme Extrato 2% .....       | <b>85</b> |
| <b>Figura 47:</b> Análise do perímetro de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gemcreme Extrato 2% .....    | <b>86</b> |
| <b>Figura 48:</b> Análise da espessura de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gemcreme Extrato 2% .....    | <b>86</b> |
| <b>Figura 49:</b> Análise do índice mitótico realizada em 10 campos de 400x da ferida dos animais tratados com gemcreme Extrato 2% .....   | <b>87</b> |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Exemplos de diterpenos clerodânicos típicos em espécies de <i>Casearia</i> onde, os ligantes R1 a R5 referem-se a substituintes da estrutura representada na Figura 5 .....                                                                      | <b>25</b> |
| <b>Tabela 2:</b> Atividades biológicas das diferentes partes de <i>C. sylvestris</i> .....                                                                                                                                                                        | <b>26</b> |
| <b>Tabela 3</b> Análise granulométrica das folhas secas e moídas de <i>C. sylvestris</i> .                                                                                                                                                                        | <b>45</b> |
| <b>Tabela 4:</b> Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica .....                                                                                                                                                    | <b>52</b> |
| <b>Tabela 5:</b> Dados obtidos na quantificação de diterpenos do tipo casearinas em relação à casergrewiina F no extrato etanólico EEtCs e fração EFSCs2 .....                                                                                                    | <b>53</b> |
| <b>Tabela 6:</b> Dados obtidos das massas de cada fração (mg) e suas respectivas porcentagens em EFSCs2.....                                                                                                                                                      | <b>54</b> |
| <b>Tabela 7:</b> Dados espectrométricos de RMN obtidos para a <b>casearina J</b> a 300 MHz para $^1\text{H}$ e a 75 MHz para $^{13}\text{C}$ , em piridina- $d_5$ .....                                                                                           | <b>57</b> |
| <b>Tabela 8:</b> Dados das análises em CLAE-UV da casearina J para a construção da curva analítica.....                                                                                                                                                           | <b>61</b> |
| <b>Tabela 9:</b> Dados obtidos na quantificação da casearina J no extrato EEtCs...                                                                                                                                                                                | <b>61</b> |
| <b>Tabela 10:</b> Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média $\pm$ erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, EEtCs 10 e 100mg/Kg .....                                                       | <b>64</b> |
| <b>Tabela 11:</b> Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média $\pm$ erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, frações EFSCs1 e EFSCs2 10 e 50mg/Kg, respectivamente .....                     | <b>67</b> |
| <b>Tabela 12:</b> Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média $\pm$ erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, CasgwF e CasB, ambas nas dosagens de 0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg, respectivamente ..... | <b>71</b> |
| <b>Tabela 13:</b> Efeito ulcerogênico da indometacina .....                                                                                                                                                                                                       | <b>73</b> |
| <b>Tabela 14:</b> Intensidade e tipo de inflamação para os animais do grupo controle (gelcreme base) e tratado (gelcreme Extrato 2%) .....                                                                                                                        | <b>81</b> |
| <b>Tabela 15:</b> Intensidade e tipo de inflamação para os animais do grupo controle (gelcreme base) e tratado (gelcreme CasgwF 0,06%) .....                                                                                                                      | <b>81</b> |

## ABREVIATURAS

AcOEt: Acetato de etila

AIE: Anti-inflamatório estereoidal

AINE: Anti-inflamatório não-estereoidal

ANVISA: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

Cas B: casearina B

Cas X: casearina X

Casg F: caseargrewiina F

CC: Cromatografia em coluna

CCCs: fração obtida em coluna cromatográfica de fase normal

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos

CLAEprep: Cromatografia líquida de alta eficiência preparativa

CLAE-UV/VIS: Cromatografia líquida de alta eficiência com detector no Ultravioleta/Visível

CMC: Carboximetilcelulose

COX: Ciclo-oxigenase

EEtCs: Extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*

EFS: Extração em fase sólida

EFSCs: Fração obtida do extrato etanólico de folhas de *Casearia sylvestris*

EtOH: Etanol

HE: Hematoxilina-eosina

Hex: Hexano

HETE: Ácido hidroxieicosatetraenoico

HPETE: Ácido hidroperoxieicosatetraenoico

IGDE: isobutil galato-3,5-dimetil éter

i-PrOH: Isopropanol

I.U.G.: Índice de ulcerogênese gátrica

IFN: Interferon

IL: Interleucina

MGDE: metil galato-3,5-dimetil éter

NF- B: fator nuclear-kappa B

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAF: Fator de ativação plaquetária

PEG: Polietilenoglicol

PG: Prostaglandinas

RENAFITO: Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

R<sub>f</sub>: Fator de retenção

SUS: Sistema Único de Saúde

TGF: Fator de crescimento transformante

TNF: Fator de necrose tumoral

TX: Tromboxanas

UV: Ultravioleta

V<sub>eluente</sub>: Volume de eluente

V<sub>inj</sub>: Volume de injeção

λ<sub>máx</sub>: Comprimento de onda máximo

## RESUMO

*Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) é uma espécie vegetal arbórea ou arbustiva conhecida como “guaçatonga”, utilizada na medicina popular por suas propriedades antisséptica, antiofídica, antiulcerativa, anti-inflamatória e cicatrizante. A partir da droga vegetal (folhas) desenvolveu-se tratamento prévio e controle de qualidade, com o objetivo de caracterizar a planta como matéria-prima farmacêutica. O extrato etanólico foi produzido a partir de 2,0 Kg da droga vegetal e o rendimento da extração foi de 11,8% (p/p). Foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) com o extrato etanólico seco de folhas de *C. sylvestris*. A partir da fração EFSCs2 foi isolada uma substância por cromatografia em coluna de fase normal que foi identificada por análises espectrométricas como a casearina J. Análises cromatográficas foram realizadas para identificação e quantificação de diterpenos clerodânicos no extrato etanólico e suas frações. Os diterpenos clerodânicos caseargrewiina F, casearinas B e X foram identificados e o teor de diterpenos clerodânicos totais foi determinado por CLAE-DAD no extrato EEtCs e na fração EFSCs2, cujos valores foram 27,4% e 50,6%, respectivamente. Das análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram também obtidos os teores de casearina J e caseargrewiina F no extrato etanólico das folhas, cujos valores foram de 2,35 e 1,1%, respectivamente. Para avaliarmos a atividade anti-inflamatória foi realizado o ensaio do edema de pata em ratos sendo os resultados obtidos promissores comparando-se à indometacina e tanto frações (EFSCs 1 e 2) como substâncias purificadas (Casgw F e Cas B) não apresentaram grau de lesão gástrica nos animais quando analisados macroscopicamente, ao contrário da indometacina que apresentou grau 5 (máximo) de lesão pelo índice de ulceração. Na atividade anti-inflamatória crônica (artrite) o reestabelecimento das proporções das articulações para o grupo tratado com dexametasona (1 mg/Kg) foi de 80 % e de 75 % para o grupo tratado com o extrato (100 mg/Kg), apresentando importante papel de controlador da doença inflamatória crônica, não sendo evidenciada toxicidade nos órgãos analisados após término do experimento. Os resultados do ensaio de cicatrização sugerem que o gelcreme de casergrewiina F 0,06% favoreceu o processo cicatrização em feridas cutâneas de ratos Wistar.

**Palavras-chave:** *Casearia sylvestris*. Salicaceae Diterpenos clerodânicos. Casearinas. Anti-inflamatório. Cicatrizante.

## ABSTRACT

*Casearia sylvestris* Sw (Salicaceae) is a tree or shrub known as "guaçatonga" used in folk medicine for its antiseptic, antiophidian, antiulcerogenic, anti-inflammatory and wound healing properties. From the leaves it was developed pretreatment and quality control, in order to characterize the plant as pharmaceutical raw material. The ethanol extract was produced from 2.0 kg of the plant drug, and the extraction yield was 11.8% (w/w). It was performed a solid phase extraction (EFS) with 20.0 g of the ethanol extract of dried leaves of *C. sylvestris*. The purification was carried out in three steps, including a solid phase extraction by means of silica and activated carbon, normal-phase column chromatography and aqueous reversed-phase high efficiency chromatography. The diterpenes caseargrewiin F, casearins B and X. were used as standards. The clerodane type diterpenes were identified and quantified via HPLC-DAD in the extract EEtCs and EFSCs2 fraction whose values were 27.4% and 50.6%, respectively. From EFSCs2 fraction it was isolated a substance identified via spectrometric analysis as casearin J, existing in the literature. From the HPLC-UV analysis the casearin J and caseargrewiin F contents were gotten in the leaves ethanol extract, which values were 2.35 and 1.1% respectively. In order to evaluate the anti-inflammatory activity, rat's paw edema was performed where the results were promising regarding to indomethacin and, either extract (EEtCs), fractions (EFSCs 1 and 2) and purified substances (Cas B and CasgwF) showed no gastric wound in the animals stomach when macroscopically examined, in opposite to indomethacin that showed wound level 5 (maximum) on the ulceration index. In the chronic anti-inflammatory activity (arthritis) the reestablishment of the joints proportion for the group treated with dexamethasone (1 mg / kg) was 80 % and for the group treated with the extract (EEtCs) (100 mg / kg) was 75% showing important role as controlling the chronic inflammatory disease, with no evident toxicity in the organs analyzed after finishing the experiment. The results of the healing test indicates that the casergrewiina cream-gel F 0.06% favors the healing process in cutaneous wounds in Wistar's rats.

**Key words:** *Casearia sylvestris*. Salicaceae. Clerodane diterpenes. Casearins. Anti-inflammatory. Wound healing.

## SUMÁRIO

|                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                           | <b>i</b>   |
| <b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....                                           | <b>vi</b>  |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                                                | <b>vii</b> |
| <b>RESUMO</b> .....                                                      | <b>ix</b>  |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                    | <b>x</b>   |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....                                                | <b>1</b>   |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....                                                 | <b>4</b>   |
| 2.1 Objetivo Geral .....                                                 | 4          |
| 2.2 Objetivos Específicos .....                                          | 4          |
| <b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                     | <b>5</b>   |
| 3.1 Plantas Medicinais .....                                             | 5          |
| 3.2 Medicamento Fitoterápico .....                                       | 6          |
| 3.3 Processo Inflamatório .....                                          | 8          |
| 3.3.1 Plantas com atividade anti-inflamatória .....                      | 11         |
| 3.4 Processo de Cicatrização .....                                       | 13         |
| 3.4.1 Fisiologia do processo cicatricial .....                           | 15         |
| 3.4.1.1 Recrutamento das células inflamatórias .....                     | 17         |
| 3.4.1.2 Reepitelização .....                                             | 17         |
| 3.4.1.3 Contração da ferida .....                                        | 18         |
| 3.4.1.4 Angiogênese .....                                                | 19         |
| 3.4.2 Plantas com atividade cicatrizante .....                           | 20         |
| 3.5 <i>Casearia sylvestris</i> Swartz .....                              | 22         |
| <b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....                                       | <b>29</b>  |
| 4.1 Materiais, Regentes e Equipamentos .....                             | 29         |
| 4.2 Material Vegetal .....                                               | 30         |
| 4.2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal .....                            | 30         |
| 4.2.2 Preparo do material vegetal .....                                  | 31         |
| 4.3 Ensaio Físico-Químicos de Qualidade .....                            | 31         |
| 4.3.1 Perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST) .... | 31         |
| 4.3.2 Teor de cinzas totais .....                                        | 31         |
| 4.3.3 Teor de cinzas insolúveis em ácido .....                           | 32         |
| 4.3.4 Determinação da fração extraível em etanol 96°GL .....             | 32         |
| 4.3.5 Análise granulométrica do pó .....                                 | 32         |

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4 Obtenção do Extrato .....                                                                                                                                                                                   | 33 |
| 4.4.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> por extração em fase sólida (EFS).....                                                                                               | 33 |
| 4.4.2 Análise cromatográfica do extrato etanólico e frações EFSCs.....                                                                                                                                          | 34 |
| 4.4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) .....                                                                                                                                                             | 34 |
| 4.4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de Diodo (CLAE-DAD) .....                                                                                                              | 34 |
| 4.4.3 Fracionamento de EFSCs2 por CC de fase normal .....                                                                                                                                                       | 35 |
| 4.4.3.1 Análises cromatográficas das frações CCCs .....                                                                                                                                                         | 35 |
| a) CCD.....                                                                                                                                                                                                     | 35 |
| b) CLAE-UV.....                                                                                                                                                                                                 | 36 |
| c) Técnicas espectrofotométricas utilizadas na determinação estrutural da substância isolada na fração CCCs11.....                                                                                              | 36 |
| d) Quantificação da casearina J no extrato EEtCs .....                                                                                                                                                          | 36 |
| 4.5 Ensaios Biológicos .....                                                                                                                                                                                    | 37 |
| 4.5.1 Ensaios de atividade anti-inflamatória.....                                                                                                                                                               | 37 |
| 4.5.1.1 Animais para o modelo de edema de pata.....                                                                                                                                                             | 37 |
| 4.5.1.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória aguda do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de <i>C. sylvestris</i> utilizando o modelo de edema de pata (baseado em WINTER et al., 1962) ..... | 38 |
| a) Análise estatística .....                                                                                                                                                                                    | 38 |
| b) Teste de gastrotoxicidade .....                                                                                                                                                                              | 38 |
| 4.5.1.3 Animais para o modelo anti-artrite reumatoide.....                                                                                                                                                      | 39 |
| 4.5.1.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória crônica do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através de modelo antiartrite reumatóide (baseado em TRENTAN et al., 1977).....                           | 39 |
| 4.5.2 Ensaio de atividade cicatrizante.....                                                                                                                                                                     | 40 |
| 4.5.2.1 Animais .....                                                                                                                                                                                           | 40 |
| 4.5.2.2 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e substância isolada de <i>C. sylvestris</i> .....                                                                                             | 41 |
| a) Índice mitótico .....                                                                                                                                                                                        | 42 |
| b) Espessura do epitélio .....                                                                                                                                                                                  | 42 |
| c) Perímetro e área do epitélio .....                                                                                                                                                                           | 42 |
| d) Tratamento estatístico .....                                                                                                                                                                                 | 42 |

|                                                                                                                                                                                                      |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                                      | <b>43</b>  |
| 5.1 Material Vegetal                                                                                                                                                                                 | 43         |
| 5.1.1 Preparo do material vegetal                                                                                                                                                                    | 43         |
| 5.2 Ensaios Físico-Químicos de Qualidade                                                                                                                                                             | 43         |
| 5.2.1 Perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)                                                                                                                                  | 43         |
| 5.2.2 Teor de cinzas totais                                                                                                                                                                          | 44         |
| 5.2.3 Teor de cinzas insolúveis em ácido                                                                                                                                                             | 44         |
| 5.2.4 Determinação da fração extraível em etanol 96°GL                                                                                                                                               | 45         |
| 5.2.5 Análise granulométrica do pó                                                                                                                                                                   | 45         |
| 5.3 Obtenção do Extrato                                                                                                                                                                              | 46         |
| 5.3.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>C. sylvestris</i> por extração em fase sólida (EFS)                                                                                         | 47         |
| 5.3.2 Análise cromatográfica do extrato etanólico e frações obtidas                                                                                                                                  | 47         |
| 5.3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)                                                                                                                                                        | 47         |
| 5.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de Diodo (CLAE-DAD)                                                                                                         | 48         |
| 5.3.3 Fracionamento de EFSCs2 por CC de fase normal                                                                                                                                                  | 53         |
| 5.3.4 Determinação estrutural da substância purificada CCCs11                                                                                                                                        | 56         |
| 5.3.5 Quantificação da casearina J no extrato EEtCs                                                                                                                                                  | 60         |
| 5.4 Ensaios Biológicos                                                                                                                                                                               | 61         |
| 5.4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória aguda do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de <i>C. sylvestris</i> (modelo de edema de pata) (baseado em WINTER, RISLEY & NUSS, 1962) | 61         |
| 5.4.1.1 Teste de gastrotoxicidade                                                                                                                                                                    | 72         |
| 5.4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória crônica do extrato etanólico de <i>C. sylvestris</i> através de modelo anti-artrite reumatóide (baseado em TRENTAN et al., 1977)                      | 73         |
| 5.4.3 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e substância isolada de <i>C. sylvestris</i>                                                                                          | 79         |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>                                                                                                                                                                                  | <b>88</b>  |
| <b>7 REFERÊNCIAS</b>                                                                                                                                                                                 | <b>90</b>  |
| <b>8 ANEXOS</b>                                                                                                                                                                                      | <b>105</b> |



# INTRODUÇÃO

Claude Pierri

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui área territorial extensa com 8,5 milhões de quilômetros quadrados e diversos biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia e Caatinga), apresentando ampla diversidade de solo e clima que favorece sua biodiversidade. De acordo com Wilson (1997), existem aproximadamente 250.000 espécies de plantas vasculares e briófitas. Em um total de mais de 155.000 espécies de angiospermas tropicais cerca de 60.000 existem em nosso país (PRANCE, 1997; GIULIET e FORERO, 1990).

Segundo Otto Gottlieb:

*“A biodiversidade do Brasil hoje constitui importante fonte de riqueza e uma das últimas fronteiras biológicas do mundo. E somente através do conhecimento das interações que existem entre os organismos é que podemos garantir que o impacto desta exploração não atinja o bem estar e a saúde do povo. Para que seja atingida esta meta precisamos conhecer a linguagem da natureza a fim de que possamos entender, participar e interferir no seu funcionamento”* (GOTTLIEB et al., 1998).

Desta biodiversidade o Brasil detém em torno de 15 a 20% do total mundial (BRASIL, 2006) e entre os elementos que a compõem, estão as plantas, que são a matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além disso, as plantas são utilizadas aqui há muito tempo em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Nosso país ainda possui uma rica diversidade cultural e étnica que resulta no acúmulo de conhecimento e tecnologias tradicionais, passadas de geração em geração, destacando-se o amplo conhecimento no manejo e uso de plantas medicinais.

Diante deste fato e, de acordo com as propostas de estímulo para o desenvolvimento de políticas públicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) inserindo a medicina tradicional no sistema oficial de saúde, o Ministério da Saúde do Brasil estabeleceu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Tal norma fundamenta as diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações de diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país, ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das

cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (BRASIL, 2006).

A ANVISA publicou em 2008 a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, na qual foram incluídas as espécies vegetais que já apresentam um corpo de evidências científicas, eficácia e posologia que permitiria seu uso pela população, entretanto, muitas destas plantas contidas nesta lista requerem uma avaliação toxicológica mais profunda (ANVISA, 2008).

Em 2010 foi publicada a Resolução RDC nº 10 de 9 de Março de 2010, que dispõe sobre a produção, distribuição e uso de plantas medicinais, particularmente sob a forma de drogas vegetais, de modo a garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a esses produtos pelos consumidores.

Os produtos contidos nesta Resolução destinam-se ao uso episódico, oral ou tópico, para o alívio sintomático das doenças relacionadas, devendo ser disponibilizados exclusivamente na forma de planta seca rasurada ou triturada, para o preparo de infusões, decocções e macerações, não permitindo o uso de drogas vegetais na forma de cápsulas, xaropes, tinturas, extratos, etc. Lembrando que estes são produtos de venda livre isentos de prescrição médica (ANVISA, 2010a). Dentre as plantas que constam nesta lista estão a *Calendula officinalis*, *Casearia sylvestris* (guaçatonga), *Cordia verbenácea* (erva baleeira), *Echinodorus macrophyllus* (chapéu de couro), *Hamamelis virginiana*, *Matricaria recutina* (camomila), *Malva sylvestris*, *Maytenus ilicifolia* (espinheira santa) entre outras.

Associadas ao uso popular a pesquisa científica da planta *Casearia sylvestris* Sw. destaca suas propriedades terapêuticas e seu grande potencial bioativo. Trabalhos mais recentes comprovando as ações antibotrópica, antiulcerogênica, antitumoral, cicatrizante e anti-inflamatória vem despertando o interesse da comunidade científica por esta planta (FERREIRA et al., 2011).

*Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) é uma espécie vegetal arbórea ou arbustiva chamada popularmente de guaçatonga, utilizada tradicionalmente como antisséptico, febrífugo, depurativo, anestésico tópico, antiulcerativo, antirreumático, antidiarreico e anti-inflamatório. Também indicada no tratamento de doenças de pele como sífilis cutânea, sarnas, eczemas, herpes, vitiligo e como cicatrizante (BACHI, 1986; CORREA, 1975; SIMÕES et al., 1986; SCAVONE et al., 1979; CAMARGO et al., 1993). Há mais de 80 anos, a planta foi incluída na Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (ERVA-DE-BUGRE), constando como parte utilizada suas folhas. O

emprego oficial citado é do extrato hidroalcoólico (etanol/água, 1:2, v/v) obtido por percolação (1:1, p/v) (SILVA, 1926). Estudos farmacológicos demonstraram diversas atividades exibidas por extratos ou substâncias purificadas, bem como baixa toxicidade (BASILE et al., 1990; FERREIRA et al., 2011).

Segundo a ANVISA (2010b) os medicamentos fitoterápicos devem comprovar sua eficácia e segurança e atender aos mesmos padrões de qualidade a que se submetem quaisquer medicamentos não fitoterápicos. Seu desenvolvimento requer estudos etnofarmacológicos, botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, farmacotécnicos e métodos analíticos para o controle de qualidade. A identificação de cada espécie vegetal e de seus princípios ativos ou seus marcadores químicos é de extrema importância para o desenvolvimento, padronização e controle de qualidade dos fitoterápicos e produtos cosméticos (CALIXTO, 2000).

Existem vários estudos fitoquímicos com espécies de *Casearia* cujos resultados demonstram o predomínio de diterpenos do tipo clerodânico no gênero (BASILE et al., 1990; ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002). Em sua maioria, estes diterpenos apresentam características estruturais marcantes encontrados somente em algumas outras famílias de vegetais, os quais se acreditam serem marcadores taxonômicos da espécie (FERREIRA et al., 2010).

É grande a probabilidade de que os diterpenos sejam responsáveis pela ação anti-inflamatória da planta, pois o extrato etanólico das folhas de *C. sylvestris* apresentou teor de cerca de 19 % (p/p) de diterpenos totais segundo Santos (2008) e, de acordo com a patente depositada na Europa pela empresa farmacêutica AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH (1999), os diterpenos clerodânicos esculentinas A e B isolados *C. esculenta* e semelhantes estruturalmente aos diterpenos isolados de *C. sylvestris* apresentaram ação anti-inflamatória.

Este estudo procurou explorar as duas atividades farmacológicas mais conhecidas, tanto do conhecimento popular como da literatura (cicatrizante e anti-inflamatória) para o extrato de *C. sylvestris* buscando identificar e, se possível, isolar os ativos que promovam tais ações, possibilitando avanços nos estudos farmacológicos. Sendo assim, estes estudos contribuirão para a padronização química de extratos para futuro desenvolvimento e produção de um medicamento fitoterápico.



# OBJETIVOS

Clare Pierre

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar as atividades anti-inflamatória e cicatrizante do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de folhas de *C. sylvestris*, identificar as substâncias responsáveis por tais ações e contribuir para o desenvolvimento e padronização de produtos farmacêuticos a base desta espécie vegetal.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar parâmetros físico-químicos de qualidade farmacopeicos de folhas de *C. sylvestris* (droga vegetal);
- b) Obter o extrato etanólico 1:12 (m/v) de folhas de *C. sylvestris*;
- c) Fracionar o extrato etanólico para obter uma fração concentrada em diterpenos clerodânicos;
- d) Purificar e identificar substâncias do extrato etanólico, especialmente diterpenos clerodânicos;
- e) Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, frações e substâncias purificadas em animais;
- f) Avaliar a atividade cicatrizante do extrato e substância purificada em animais;
- g) Identificar e quantificar os marcadores químicos da espécie no extrato etanólico.

A painting of a white flower with green leaves, signed 'Claude Lorraine' in the bottom right corner. The painting is a close-up of a single white flower with many small petals, surrounded by several large, green, elongated leaves. The background is dark and textured. The signature 'Claude Lorraine' is written in white paint in the bottom right corner.

# REVISÃO DA LITERATURA

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Plantas Medicinais

Há muito tempo o homem faz uso dos recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Existem relatos de seu uso pelo homem desde 3000 a.C. em pergaminhos que revelam que o povo fazia uso do ópio (*Papaver somniferum*) para amenizar ou mesmo extinguir a dor. Civilizações egípcias empregavam plantas e seus produtos para vários fins terapêuticos e também como conservantes teciduais no procedimento de embalsamamento. Em papiros (1500 a.C.), na Bíblia dos hebreus encontram-se milhares de citações sobre o emprego de plantas medicinais e preparações à base de ervas. Por mais de catorze séculos o tratado *De Matéria Médica* escrito pelo botânico grego Pedânio Dioscórides (78 d.C.) foi fonte de referência de cerca de 600 plantas medicinais, além de produtos minerais e animais. E foi através da experiência obtida pelos povos primitivos, passando de geração em geração, que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e incluídas na cultura popular (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

No século XVI, Paracelsus (1493-1541) formulou a “Teoria das Assinaturas” onde se baseava no provérbio latim “*similia similibus curantur*”, - “semelhante cura semelhante”. Assim, acreditava-se que a forma, cor, sabor, e odor das plantas relacionavam-se com suas propriedades terapêuticas indicando seu uso clínico. Estas plantas descritas passaram a fazer parte das farmacopeias tanto homeopática como alopática a partir do século XIX, quando foi dado o início de suas investigações com bases terapêuticas (ELVIN-LEWIS, 2001).

Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram exclusivamente constituídos por plantas e extratos vegetais. Somente após a revolução industrial, quando iniciaram os estudos da Química Orgânica e o desenvolvimento de técnicas para o isolamento de substâncias ativas presentes nas plantas, é que se permitiu obter substâncias isoladas como a morfina (*Papaver somniferum*, 1803), quinina e quinidina (*Cinchona* spp, 1819), atropina (*Atropa belladonna*, 1831), etc. Estas substâncias passaram a substituir os extratos vegetais por apresentarem maior reprodutibilidade dos efeitos devido à constância de sua composição, maior eficácia e segurança (AMENI, 2011). Apesar de todas estas descobertas sobre as plantas, ausência de comprovações científicas de sua eficácia, dificuldade de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais, aliado à

produção de fármacos via síntese química e ao crescimento econômico das indústrias, impulsionou a substituição das mesmas por fármacos sintéticos.

Na década de 60 a indústria farmacêutica desinteressou-se pelas substâncias de origem vegetal por acreditar que todas as possibilidades de usos e modificações químicas estivessem esgotadas (SCHENKEL et al., 2007).

Nos anos 80 novas descobertas na metodologia de isolamento de substâncias ativas de origem natural surgiram, o que possibilitou maior rapidez na identificação destas em amostras complexas (extratos, por exemplo), despertando novamente o interesse dos pesquisadores que passaram a utilizá-las como protótipo para a obtenção de novos fármacos. Alguns grupos farmacêuticos passaram a aprimorar os conhecimentos em produção de fitoterápicos em escala industrial, alavancando novamente o interesse pelos produtos naturais (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006).

Mundialmente as plantas medicinais ainda permanecem como fonte alternativa de tratamento e são amplamente utilizadas em países desenvolvidos como Alemanha e França.

### **3.2 Medicamento Fitoterápico**

Segundo a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010b):

“Fitoterápico é um medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos III. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais.”

Os efeitos terapêuticos dos fitoterápicos geralmente estão associados à ação sinérgica de várias substâncias (ou grupo de substâncias) contidas nas plantas que exibem atividade terapêutica (YUNES et al., 2001).

A ANVISA deixa claro que medicamentos fitoterápicos devem atender as mesmas exigências de eficácia, segurança e qualidade que os medicamentos convencionais. Por outro lado, coloca algumas características que são peculiares. A

normatização da ANVISA segue a escola alemã, reconhecida como uma das mais avançadas do mundo.

Segundo a Resolução RDC nº 14 de 31 de Março de 2010, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, são adotadas as seguintes definições:

- ✓ Planta medicinal: espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos;
- ✓ Relação “droga vegetal: derivado vegetal”: expressão que define a relação entre uma quantidade de droga vegetal e a respectiva quantidade de derivado vegetal obtida. O valor é dado como um primeiro número fixo ou na forma de um intervalo, correspondente à quantidade de droga utilizada seguido de (:) e, depois desses, o número correspondente à quantidade obtida de derivado vegetal.

Segundo Calixto (2000) as características abaixo apontadas são pertinentes para os fitoterápicos:

- ✓ A variabilidade no metabolismo secundário vegetal pode produzir diferenças na composição química em diferentes lotes de droga vegetal;
- ✓ As substâncias ativas nos medicamentos fitoterápicos estão numa mesma matriz complexa juntamente com outras não ativas;
- ✓ Os princípios ativos vegetais são frequentemente desconhecidos;
- ✓ Vários fatores podem influenciar na presença de substâncias presentes na planta ou nas preparações fitoterápicas – idade e parte da planta utilizada, condições e período de plantio e de coleta, exposição à luz ou altas temperaturas, métodos de coleta, secagem, armazenamento e transporte de matéria-prima, métodos de extração e contaminação por microrganismos, inseticidas, metais pesados, etc.

Conhecer os princípios ativos responsáveis pela atividade farmacológica ou estabelecer seus marcadores químicos é de fundamental importância para o desenvolvimento, padronização e controle de qualidade do fitoterápico. Deste modo, estabelecemos mecanismos de ação (farmacológico e toxicológico), a relação estrutura-atividade servindo como modelo para a síntese e semi-síntese de novos fármacos. De acordo com a concentração conhecida do princípio ativo/marcador conseguimos realizar os estudos farmacológicos (SANTOS, 2008).

Diante destes fatores, a padronização e controle de qualidade das drogas vegetais para que possamos produzir medicamentos fitoterápicos de qualidade são relevantes para que apresentem o efeito terapêutico desejado.

### 3.3 Processo Inflamatório

A inflamação ou processo inflamatório é uma resposta dos organismos vivos homeotérmicos a uma agressão sofrida. Entende-se como agressão qualquer processo capaz de causar lesão celular ou tecidual. Esta resposta padrão é comum a vários tipos de tecidos e é medida por diversas substâncias produzidas pelas células danificadas e células do sistema imunológico que se encontram eventualmente nas proximidades da lesão (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Baseadas nos quatro sinais cardinais da inflamação descritos por Celsius desenvolveram-se todas as teorias sobre o processo inflamatório (rubor, calor, edema, dor e perda da função). Podemos, resumidamente, dividir o processo inflamatório em quatro fases (ROBBINS; COTRAN, 2010):

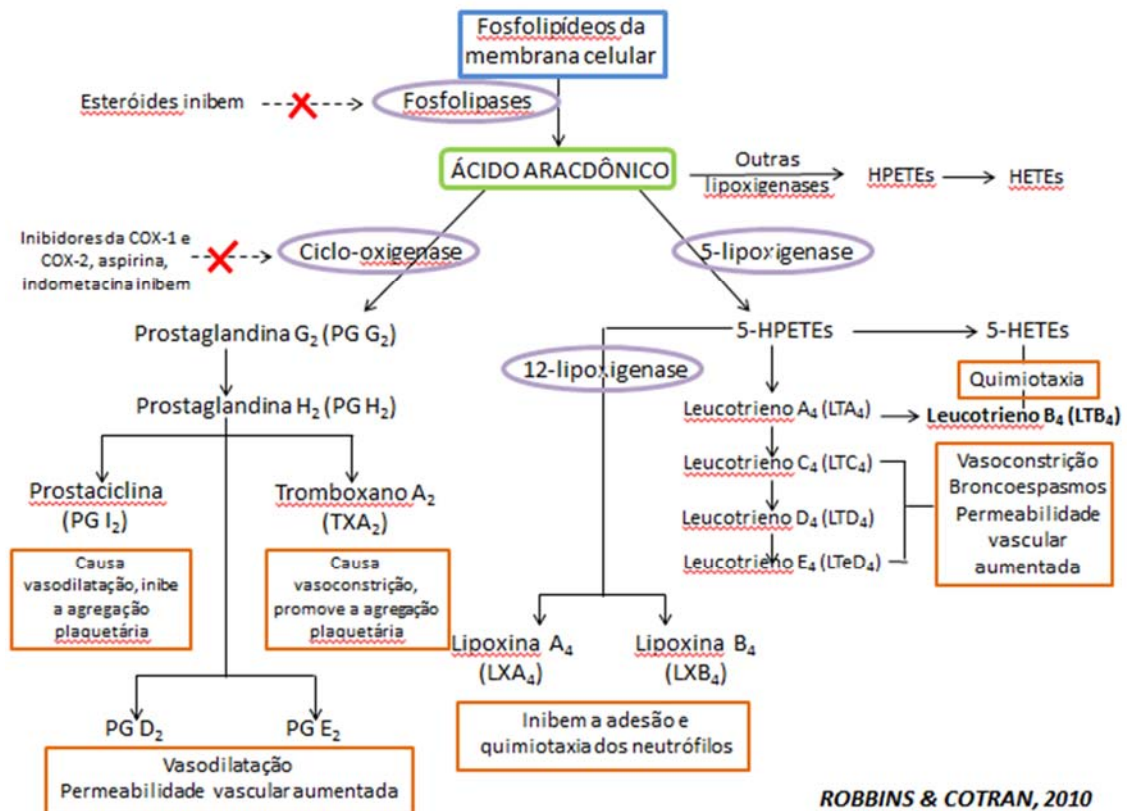
- **Fase irritativa:** modificações morfológicas e funcionais dos tecidos agredidos que promovem a liberação de mediadores químicos (histamina, prostaglandinas), estes desencadeantes das demais fases inflamatórias;
- **Fase vascular:** alterações hemodinâmicas da circulação e de permeabilidade vascular no local da agressão;
- **Fase exsudativa:** característica do processo inflamatório, esse fenômeno compõe-se de exsudato celular e plasmático proporcionado pelo aumento da permeabilidade vascular;
- **Fase degenerativa-necrótica:** composta por células com alterações degenerativas reversíveis ou não, derivadas da ação direta do agente agressor ou das modificações funcionais e anatômicas consequentes das três fases anteriores;
- **Fase produtiva-reparativa:** relacionada a característica de hiperemia da inflamação (exprime os aumentos de quantidade dos elementos teciduais – células), resultado das fases anteriores. Esta última fase visa destruir o agente agressor e reparar o tecido injuriado.

Atualmente, inflamação é definida como a reação do tecido vivo vascularizado à injúria local. Trata-se de um processo bioquímico e celular que acontece no tecido

conjuntivo vascularizado, envolvendo o plasma, as células circulantes, os vasos e os constituintes celulares e extracelulares desse tecido que tem como objetivo destruir, diluir ou isolar o agente lesivo induzindo a uma série de eventos que contribuem para a cicatrização e reconstituição do tecido lesado (ROBBINS; COTRAN, 2010). Na maioria das vezes, é uma resposta protetora cuja função é livrar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão. Ela pode se manifestar como um processo agudo ou crônico.

A **inflamação aguda** tem duração relativamente curta, de minutos, horas, a alguns dias e suas principais características são exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas (edema), migração celular e sensibilização ou ativação dos nociceptores. Esta resposta pode ser causada por um trauma mecânico, privação de oxigênio ou nutrientes, alterações imunológicas ou genéticas, agentes químicos, micro-organismos, temperaturas extremas ou radiação. Estes fatores provocam distúrbios na membrana celular, ocasionando a ativação da fosfolipase  $A_2$  e liberação de ácido araquidônico e seus metabólicos, PAF-acéter (fator de ativação plaquetária) e enzimas lisossômicas. O metabolismo do ácido araquidônico dá origem a inúmeras substâncias biologicamente ativas, como prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (TXs), importantes na fisiopatologia da inflamação. As enzimas lisossômicas tem potente atividade citotóxica e destroem células vizinhas, liberando assim novas enzimas. Os leucócitos são atraídos ao local da lesão por mediadores inflamatórios com atividade quimiotática (RANG, RITTER e DALE, 2001) (Figura 1).

**Figura 1:** Geração dos metabólitos do ácido aracdônico e seus papéis na inflamação. Os alvos moleculares das ações de alguns fármacos anti-inflamatórios são indicados por um X vermelho. Os agentes que inibem a produção de leucotrienos pela inibição da 5-lipoxigenase ou bloqueiam os receptores de leucotrienos não são mostrados. COX, Ciclo-oxigenase; HETE, ácido hidroxicicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxicicosatetraenoico.



O anti-inflamatório é o agente que reduz ou previne um ou mais componentes da reação inflamatória. Fundamentalmente, o controle farmacológico da inflamação pode ser exercido atuando diretamente sobre as células inflamatórias ou antagonizando a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pelo desencadeamento ou amplificação da reação inflamatória.

Por outro lado, a **inflamação crônica** é de longa duração (de semanas e até meses) e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (ROTE, 1998; RYAN e MAJNO, 1977; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Instala-se de forma lenta e insidiosa (ex. doenças reumatológicas como lúpus eritematoso sistêmico, artrite reumatoide) e sempre precedida pela inflamação aguda com o intuito de eliminar o agente agressor. Neste caso, clinicamente, não se observam sinais cardinais característicos

das reações agudas. Porém, todas as alterações vasculares e exsudativas que originam esses sinais clínicos continuam acontecendo, culminando com o destaque da última fase inflamatória, a fase produtiva-reparativa.

A injúria tecidual e tentativa de reparo coexistem em várias combinações. Pode ser sequência da inflamação aguda ou pode se iniciar e traiçoeiramente, como resposta de baixo grau e latente, sem nenhuma manifestação de reação aguda. Esta última (crônica) é a causa de dano tecidual em algumas das mais comuns e incapacitantes doenças humanas como: artrite reumatoide, aterosclerose, tuberculose e fibrose pulmonar. Responsável também pela progressão do câncer e doenças degenerativas como a doença de Alzheimer pode ser causada por:

- infecções persistentes de micro-organismos, que frequentemente provocam a reação de hipersensibilidade tipo retardada (reação granulomatosa; ex. tuberculose);
- doenças inflamatórias imunomediadas (doença autoimune; ex. asma brônquica);
- exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, endógenos (ex. aterosclerose) ou exógenos (ex. silicose) (ROBBINS e COTRAN, 2010).

A inflamação crônica é caracterizada por:

- infiltração com células mononucleares (macrófagos, linfócitos e células plasmáticas);
- destruição tecidual (agente agressor ou célula inflamatória);
- cura pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo através da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese), fibrose (MAJNO, 1998).

### **3.3.1 Plantas com Atividade Anti-inflamatória**

O termo fármacos anti-inflamatórios refere-se a agentes que intervêm no processo inflamatório agudo e crônico, tais como doenças reumáticas ou artrite, e nos quais o metabolismo do ácido araquidônico ocupa um importante papel neste processo (GOODMAN et al., 2006).

Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém, de uso limitado com relação a sua potência, eficácia e efeitos adversos (PARENTE, 2001; FIORUCCI, et al., 2001). Tanto os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) como os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) apresentaram problemas em pacientes com relação a seus efeitos adversos como reações gastrointestinais, cardiovasculares, etc. Os atuais moduladores ou anti-citocinas (anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF- $\alpha$ ) são caros e de difícil adesão devido a sua via de

administração ser sub-cutânea, o que dificulta o tratamento (CALIXTO et al., 2004). Devido a estes inconvenientes a busca por substâncias naturais com potencial anti-inflamatório, baixo custo e efeitos adversos reduzidos, tornam-se necessária.

De acordo com a literatura, plantas que exibem atividade anti-inflamatória muitas vezes o fazem através da habilidade que possuem em inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocitocinas e moléculas de adesão além da inibição do fator nuclear B (NF- B) (CALIXTO et al., 2004).

Como as preparações obtidas de drogas vegetais possuem uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente através de diferentes mecanismos de ação (CALIXTO et al., 2004), frequentemente tais preparações inibem mais de uma via de ação, maximizando efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos (SCHIMITZ e BACHER, 2005).

Várias plantas como *Arnica montana*, *Cordia verbenacea* (erva baleeira), *Uncaria tomentosa* (unha de gato), *Harpagophytum procumbens* (garra do diabo), *Conocliniopsis prasiifolia*, *Hyptis fruticosa*, *Matricaria recutita*, *Baccharis trimera*, *Coriandrum sativum*, *Calendula officinalis*, *Ligustrum morrisonense*, *Byrsonima japurensis* apresentam atividade anti-inflamatória como relatado na literatura (DA SILVA et al., 2008; ANDRADE et al., 2010; ZANUSSO-JUNIOR et al., 2011; RAYMUNDO et al., 2011; WU et al., 2011; SIMPLICIO et al., 2012).

Investigou-se o efeito anti-inflamatório e a toxicidade dos extratos em vários modelos experimentais em ratos Wistar para a *Cordia verbenacea*. No modelo do edema de pata induzido por carragenina foi administrado por via oral o extrato hidroalcoólico 70% de suas folhas nas dosagens de 0,59 a 2,98 mg/Kg, o qual inibiu significativamente o edema. Estudos com os componentes sesquiterpênicos,  $\alpha$ -humuleno e trans-cariofileno (50 mg/Kg, via oral) demonstraram que, no processo inflamatório induzido pela carragenina na pata, o  $\alpha$ -humuleno ocasionava uma redução da produção do fator de necrose de tumor TNF $\alpha$ , da interleucina IL-1 $\beta$ , da prostaglandina PGE<sub>2</sub>, do óxido nítrico sintetase iNOS, da ciclooxigenase COX-2. O trans-cariofileno também exercia efeitos semelhantes embora não inibisse interleucina IL-1  $\beta$ , e os dois sesquiterpenos se equivaleram a dexametasona usada como controle (FERNANDES et al., 2007).

No caso de *Hyptis fruticosa* (rica em compostos polifenólicos, como xantonas) o tratamento prévio com o extrato etanólico de suas folhas ou suas frações (partição líquido-líquido) hexânica, acetato de etila e hidrometanólica foram efetivas na

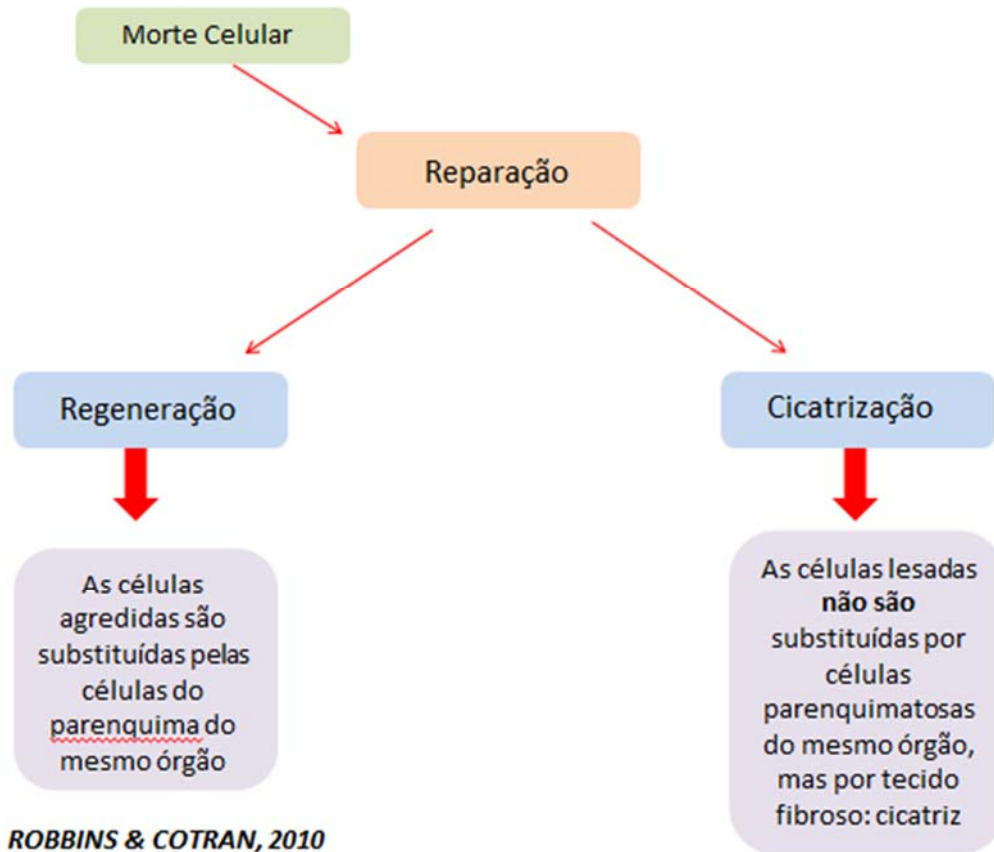
redução da resposta edematogênica provocada pela carragenina injetada subcutaneamente em pata de ratos (edema de pata) entre a segunda e quarta hora após a injeção e, em modelo de peritonite, onde a carragenina é injetada intraperitonealmente. Um suposto mecanismo de ação associado a esta atividade pode ser a inibição da síntese de mediadores inflamatórios cujo envolvimento no edema e na migração celular está bem estabelecida (ANDRADE, et al., 2010).

Simplicio et al. (2012) analisaram as atividades anti-inflamatória, analgésica, antiplaquetária e antiulcera do extrato aquoso da casca do caule de *Byrsonima japurensis* e identificaram flavonoides, substâncias capazes de inativar enzimas envolvidas na resposta inflamatória (fosfolipases e ciclo-oxigenase).

### **3.4 Processo de Cicatrização**

Abatangelo (1996) publicou editorial que descrevia o aumento do interesse mundial médico em tópicos que descreviam o processo de cura de feridas e de reparo de tecidos. Segundo Robbins & Cotran (2010), a habilidade que nosso corpo tem em substituir células lesionadas ou mortas e reparar tecidos após inflamação é crítica à sobrevivência. Quando sofremos uma lesão danificando células e tecido, nosso corpo responde promovendo uma série de eventos que servem para eliminar o que foi danificado, conter o dano e preparar as células sobreviventes à replicação. Este reparo celular pode ser dividido em dois processos: **regeneração e cicatrização** (Figura 2).

**Figura 2:** Visão geral das respostas de cura após lesão. A cura após lesão aguda pode ocorrer por regeneração que restaura a estrutura normal do tecido ou por reparo com formação de cicatriz. A cura na lesão crônica envolve formação de cicatriz e fibrose.



A regeneração resulta na restituição dos tecidos perdidos; a cicatrização pode restaurar as estruturas originais, mas envolve também a deposição de colágeno e a formação da cicatriz.

**Regeneração:** refere-se ao crescimento de células e tecidos para substituir estruturas perdidas. Os tecidos com alta capacidade proliferativa (sistema hematopoético, epitélios cutâneo e o trato gastrointestinal) renovam-se continuamente e podem regenerar-se após uma lesão, enquanto as células tronco destes tecidos não forem destruídas.

**Cicatrização:**

- (1) resposta tecidual a um ferimento (comum na pele);
- (2) resposta tecidual aos processos inflamatórios nos órgãos internos;
- (3) resposta tecidual à necrose celular a órgãos incapazes de regeneração.

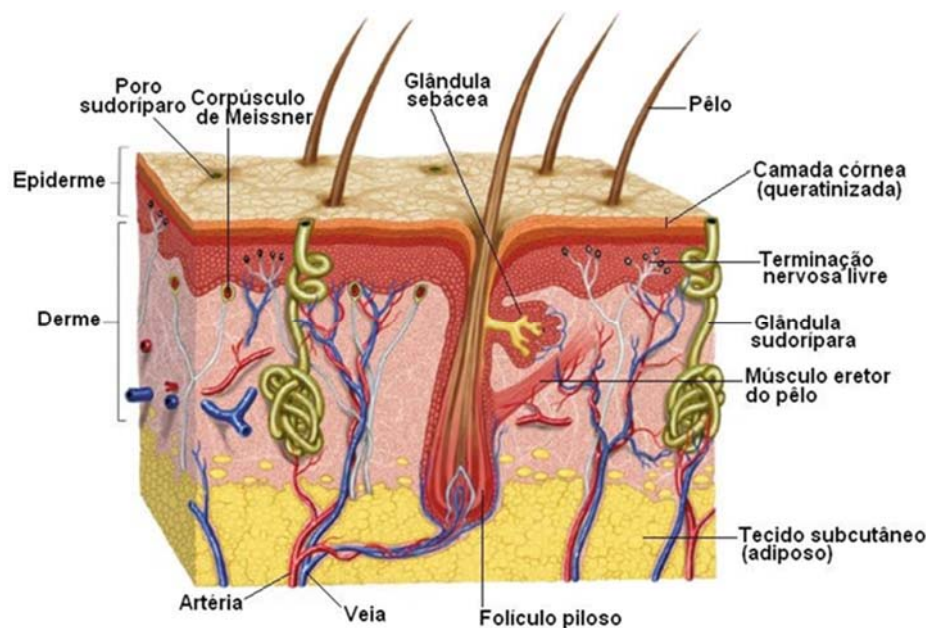
O processo de cicatrização consiste de: regeneração e deposição do tecido fibroso (ou formação cicatricial). Ferimentos superficiais (cutâneos) que só danificam o epitélio podem cicatrizar por regeneração epitelial. Já ferimentos cutâneos incisionais e excisionais que danificam a derme cicatrizam através da formação de uma cicatriz de colágeno. Lesões e inflamações crônicas e persistentes, como úlceras estomacais por *Helicobacter pylori* podem levar à cicatrização nos órgãos internos. Na cirrose hepática e em algumas formas de doença pulmonar induzida por carvão e sílica a fibrose extensiva está presente. Nos órgãos parenquimatosos, a substituição dos infiltrados inflamatórios por tecido de granulação e eventualmente fibrose, é denominado organização (BALBINO et al., 2005).

Trata-se de um processo complexo que se inicia quando a integridade da pele é alterada. Nela envolve interação entre células estromais e circulatórias que são ativadas por um conjunto de mediadores químicos, fragmentos de células e matriz celular, microrganismos e alterações físico-químicas do microambiente da lesão e áreas circunjacentes.

#### **3.4.1 Fisiologia do processo cicatricial**

A pele recobre a superfície do corpo e corresponde a um dos seus maiores órgãos, representando aproximadamente 16% do peso corporal. É constituída por duas camadas:

- (1) uma de origem ectodérmica (epiderme), epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, avascular, que repousa sobre a lâmina basal que o separa da derme;
- (2) derme, que é uma camada de tecido conjuntivo, rica em colágeno, apêndices como pelos e glândulas que provê suporte e nutrição ao epitélio (Figura 3).

**Figura 3:** Esquema do corte histológico da pele.

Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>.

As células mais abundantes do epitélio são os queratinócitos. A epiderme apresenta ainda outros 3 tipos de células: os melanócitos (que produzem melanina), as células de Langerhans (células apresentadoras de antígeno), e as células de Merkel, que são mecanoreceptoras (GARTNER; HIATT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2006).

Qualquer rompimento em sua integridade deve ser rapidamente e eficazmente reparado. Este processo de reparo requer uma sequência de eventos coordenados e progressivos: homeostasia, inflamação, síntese e deposição de colágeno, angiogênese, fibroplasia, epitelização, contração e remodelamento da matriz extracelular (STALDELMANN et al., 1998).

Nas últimas décadas vários estudos têm demonstrado que diversos fatores de crescimento e componentes da matriz extracelular são capazes de disparar sinais que iniciam e param cada uma das muitas atividades pelas quais as feridas são cicatrizadas (AGREN, 1999).

Diversos fatores de crescimento liberados por vários tipos celulares como plaquetas, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos iniciam o processo de cicatrização, atraindo células inflamatórias para o local da ferida, uma solução de continuidade, criada pela retirada do fragmento da pele e inicialmente preenchida por sangue coagulado, fibrina e exsudato de inflamação. Este por sua vez, será o

suporte para os fibroblastos e o endotélio vascular neoformado edificarem o tecido de granulação que em uma cicatrização de segunda intenção é de suma importância para a contração do tecido conjuntivo (SIMÕES et al., 1986; MARTIN, 1997).

Durante a cicatrização da ferida a migração celular inicia-se dentro de poucas horas depois do dano e continua até que a superfície epitelial esteja intacta (CLARK, 1996). O trabalho de reepitelização é feito pelo tecido conjuntivo retrátil através dos fibroblastos que começam a proliferar providenciando uma nova matriz celular rica em colágeno (MARTIN, 1997). Isto requer uma série de mudanças no comportamento celular que incluem proliferação celular, diferenciação e migração de queratinócitos da imagem da própria ferida, estando envolvidos neste processo mediadores químicos específicos, como por exemplo, fator de crescimento epidermal (EGF). Durante a proliferação a atividade mitótica é alta permanecendo assim, mesmo depois de fechada a ferida, por mais 2 a 4 dias (GARLICK, 1994).

Assim, para a cura de uma ferida, é necessário um sistema ideal, dinâmico, cíclico que envolve uma série de mensagens passageiras na matriz extracelular e mudanças correspondentes na interação e adesão celular que culmine com o remodelamento da área de cicatriz (GRINNELL, 1992).

#### **3.4.1.1 Recrutamento de células inflamatórias**

Nesta primeira fase ocorre a hemostasia, migração de leucócitos e início da cascata de reparação tecidual. Em resposta a agentes inflamatórios há uma diminuição do fluxo de sanguíneo pela vasoconstrição. Neutrófilos e monócitos são atraídos para o local da ferida por vários sinais quimiotáticos. Ambos são recrutados da circulação sanguínea devido a respostas de mudanças moleculares na superfície de células endoteliais dos capilares na área lesada.

A presença de neutrófilos no local da ferida alguns minutos após a lesão ocorre para que o risco de contaminação bacteriana seja evitado, mas estudos recentes têm demonstrado que estas células são também uma fonte de citocinas pró-inflamatórias que provavelmente atuam em alguns dos primeiros sinais para a ativação de fibroblastos e queratinócitos locais (MARTIN, 1997).

#### **3.4.1.2 Reepitelização**

Após a separação dos queratinócitos da membrana basal, estes encontram o leito da matriz provisória da ferida muito diferente daquela da membrana basal,

sendo composto de fibrina, fibronectina, vitronectina, tenascina e colágenos (AGREN, 1999), sobre o qual devem migrar para fechar a área desnuda. Os hemidesmossomos que prendem os queratinócitos da camada basal do epitélio à lamina basal devem ser desmontados e devem passar a expressar novas integrinas, receptores para vitronectina e tenascina e relocalizar receptores para colágeno, com o objetivo de se deslocarem na matriz provisória do leito ferido. Existem evidências que demonstram que as células da camada supra basal também migram.

Algumas horas após o início da migração ocorre um aumento na atividade proliferativa das células epidermais localizadas mais próximas à margem da ferida. Esta atividade, embora não seja estritamente necessária para o movimento da reepitelização, provê ao leito ferido uma quantidade extra de células para renovar aquelas perdidas durante a injúria.

A tarefa dos macrófagos inclui fagocitose de organismos patogênicos remanescentes e outras células. Uma vez ativados os macrófagos acionam uma bateria de fatores de crescimento e citocinas no local da ferida, assim, amplifica os primeiros sinais liberados pelas plaquetas e neutrófilos.

Com o objetivo de movimentar-se através do coágulo de fibrina, a primeira camada de queratinócitos processa solventes para destruir a barreira de fibrina a sua frente. Existem vários membros da família das metaloproteínas (MMP), cada uma das quais clivam um subconjunto específico de proteína da matriz.

Assim que a superfície da ferida tenha sido coberta por uma camada de queratinócitos, a migração epitelial cessa e um novo epitélio estratificado com uma lamina basal subjacente é reestabelecida.

Células supra basal param de expressar integrinas e queratina, sofrendo o programa de diferenciação padrão das células da camada externa da epiderme normal (MARTIN, 1997).

Há vários fatores de crescimento regulando a reepitelização, dentre os quais temos o EGF (*epidermal growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ), HB-EGF (*heparin-binding EGF*) e o KGF (*keratinocyte growth factor*). São todos fatores com atividade mitogênica e motogênica de queratinócitos.

#### **3.4.1.3 Contração da ferida**

A reepitelização de uma ferida é realizada facilmente pelo tecido conjuntivo contrátil subjacente, o qual reduz o tamanho a fim de aproximar as margens da

ferida. Como uma resposta inicial a lesão, fibroblastos residentes da vizinhança da derme ferida começam a proliferar, e 3 ou 4 dias após a lesão começam a migrar em direção a matriz provisória do coágulo.

Assim como os queratinócitos da margem da ferida tem que ajustar suas integrinas antes da migração, os fibroblastos dermais, os quais normalmente ocorrem em uma matriz de colágeno, processam regularmente seus receptores de colágeno e integrinas que ligam a fibrina, fibronectina e vitronectina para se movimentar no coágulo.

Cerca de uma semana após o ferimento, o coágulo estará totalmente invadido por fibroblastos ativados que são estimulados por TGF- $\beta_1$  (*transforming growth factor*  $\beta_1$ ) e outros fatores de crescimento a sintetizar e remodelar uma nova matriz rica em colágeno; neste estágio, uma porção dos fibroblastos da ferida se transformam em miofibroblastos, os quais expressam  $\alpha$  – actina muscular liso e lembram células musculares em sua capacidade de gerar força contrátil. Esta conversão é disparada por fatores de crescimento como o TGF- $\beta_1$  e por sinais mecânicos relacionado a forças opostas a contração.

Alguns minutos após a ativação das forças de resistência, fibroblastos ativam um sinal via AMPc, o qual envolve o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e a produção de ácido fosfatídico pela fosfolipase D. Subsequentemente, receptores de PDGF (*platelet-derived growth factor*) e EGF sobre a superfície celular tornam-se inativos e as células relaxadas retornam ao estado quiescente similar àquele de antes da lesão.

A apoptose ocorre em alguns fibroblastos da ferida, provavelmente os miofibroblastos, após a contração da ferida ter cessado (MARTIN, 1997).

#### **3.4.1.4 Angiogênese**

Os fatores responsáveis por promover a angiogênese são o FGF2 (*fibroblast growth factor-2*) e o VEGF (*vascular endothelial growth factor*). O FGF2 ou FGF básico é liberado no local da ferida por células endoteliais danificadas e por macrófagos, quando este fator de crescimento é inibido, a angiogênese é quase totalmente bloqueada (MARTIN, 1997).

Como as outras células migratórias, a morfogênese dos capilares também é dependente da proteólise regulada da matriz envolvente, durante a fase de invasão. Após migrarem nos espaços perivasculares, as células endoteliais proliferam e se alinham para formar novos vasos. Esses se agrupam e fazem profusão por entre os

fragmentos das membranas basais, a princípio formando fileiras sólidas de células. Nestes brotamentos sólidos as células endoteliais começam apresentar vacúolos citoplasmáticos que se fusionam inicialmente entre si e logo com os de células vizinhas, dando origem a nova luz vascular, enquanto o material das novas membranas basais vai sendo sintetizado. Estes novos capilares no seu crescimento se dirigem para a superfície da lesão e aí se encurvam para baixo, formando um pequeno arco ou cajado. Assim, eles conferem um aspecto granuloso avermelhado à superfície (origem do nome “tecido de granulação”). As paredes destes capilares “imaturos” são muito permeáveis e deixam passar muito líquido e proteínas para o tecido extracelular, sangrando facilmente ao menor trauma fazendo com que o tecido de granulação apresente aspecto edemaciado. A presença abundante de ácido hialurônico na matriz extracelular também contribui para o aspecto “edemaciado”, gelatinóide do tecido de granulação.

Os nervos entram no novo tecido tardiamente, por isso o tecido de granulação não dói, embora sangre ao menor contato. Entre os capilares aparecem fibroblastos, pericitos, miofibroblastos e macrófagos. A matriz extracelular vai se densificando com o passar dos dias adquirindo cada vez mais fibras colágenas. Estas formam um padrão frouxo que pouco a pouco se torna compacto devido a disposição das fibras em paralelo, enquanto os vasos sanguíneos vão se tornando menos proeminentes e desaparecem. Assim, o tecido de granulação acaba dando lugar a uma matriz fibrosa, dura, esbranquiçada e retraída (COTRAN, et al., 2000).

### 3.4.2 Plantas com Atividade Cicatrizante

Várias plantas como *Hamamelis virginiana* L., *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Memyceylon umbellatum*, *Aegle marmelos*, *Sambucus ebulus*, *Centaurea sadleriana*, *Centaurea iberica*, *Passiflora edulis*, *Centella asiatica*, *Tagetes erecta*, *Pinus* sp (JAYASHEELAN et al., 2010; GOMES, et al., 2006; KOCA, et al., 2009; CSUPOR, et al., 2010; SÜNTAR, et al., 2010; CHATTERJEE et al., 2011; SÜNTAR, et al., 2012) apresentam atividade cicatrizante como relata a literatura.

O hamamelis contém em sua casca e folhas uma mistura complexa de taninos condensados e hidrolisáveis, sendo o hamamelitanino (2', 5-di-O-galoila-hamamelofuranose) o principal constituinte das cascas. Estão presentes taninos hidrolisáveis como o mono e o tri-O-galoila-hamamelofuranose e seus derivados,

assim como proantocianidinas diméricas (HARTISCHI; KOLODZIEJ, 1996). Vários estudos farmacológicos realizados (*in vivo* e *in vitro*) avaliaram as atividades dos extratos de casca e folhas. As ações relatadas foram de inibição da 5-lipoxigenase e liso-PAF-acetil-CoA (HARTISCHI, 1997), antiviral contra *Herpes simplex* tipo I, para as frações enriquecidas com proantocianidinas (ERDELMEIER et al., 1996), antiedematogênica no modelo de edema de orelha (DUWIEJUA et al., 1994; KORTING et al., 1993), anti-inflamatória no teste de eritema UVB (HUGHES-FORMELLA et al., 1998) e antimutagênica (DAUER et al., 1998).

O hamamelitanino puro apresentou inibição do fator de necrose tumoral (TNF) de células endoteliais (HABTEMARIAM, 2002), o que confere ação anti-hemorrágica para *Hamamelis virginiana*.

As cascas de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) possuem em torno de 20 % de taninos totais, de onde foram isolados diferentes taninos condensados como: flavan-3-óis, prodelphinidinas e prorobinetinidinas (MELLO et al., 1996a, 1996b e 1999). Lima et al. (1998) demonstraram que fração acetônica do extrato do *Stryphnodendron adstringens*, em modelos de inflamação aguda e crônica, apresentou diminuição significativa no edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana, confirmando a diminuição da permeabilidade vascular proposto por Neves et al. (1992b), além das atividades antiulcera e hipotensora.

Espécies de *Pinus* estudadas por Süntar et al. (2012) apresentaram na composição química do óleo essencial quantidades significativas de  $\alpha$ -pineno e limoneno que são monoterpenos conhecidos da literatura por sua ação importante no processo de cicatrização e inflamatório (TUMEN, et al., 2010). Na espécie *Pinus pinea* há grande quantidade de limoneno no óleo essencial, o que confere importante atividade cicatrizante e bactericida desta espécie, devido também a presença de outros compostos terpênicos que apresentam ação bactericida, fungicida, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória.

O processo de cicatrização através de plantas é promovido por vários de seus componentes, incluindo substâncias ativas como flavonóides, triterpenos e alcalóides (SHARMA, et al., 1990). Oligoelementos essenciais, especialmente zinco e vitamina C, também influenciam o processo cicatricial atuando como co-fatores ou co-enzimas em várias funções metabólicas envolvidas na cicatrização de feridas (BHAR et al., 2003). Em geral, as plantas medicinais ricas em taninos são empregadas na cura de feridas pelo fato de formarem uma camada protetora devido

à constituição de um complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo sobre pele e mucosas danificadas, ocorrendo a reestruturação do epitélio, a formação de vasos e a ação anti-inflamatória (ajudam a vasoconstrição, reduzindo a permeabilidade vascular) (KAPU et al., 2001; MOTA et al., 1985).

O estudo do processo de cicatrização de feridas *in vivo* vem sendo realizado a muitos anos e tem como objetivo quantificar e qualificar o processo de reparo sob diferentes condições (VELLEY, 1954; XIE et al., 2009) e em diferentes tecidos e órgãos (SORG et al., 2009; YILMAZ et al., 2010). Os métodos de análise do processo de reparo variam. Por vezes tentando identificar fatores de crescimento e citocinas nas diferentes fases do processo de reparo por meio de congelamento e lise dos tecidos (ATHANASAPOULOS et al., 2006), por vezes utilizando marcadores imunohistoquímicos para quimiocinas (WETZLER et al., 2000) ou, muitas vezes, analisando características histopatológicas por meio de escores (RAYNER et al., 2000; PIERCE et al., 1992). Neste caso, analisando presença de neutrófilos e células mononucleares, assim como macrófagos e novos vasos (GRILLO e POSTSAD, 1961; BABAEI et al., 2013) ou classificando o processo inflamatório como agudo, crônico ou de transição (misto) (MAROIS et al., 2000; BRUSTOLIN, et al., 2012) os quais podem ser analisados quanto a intensidade em parâmetros “ausente”, “leve”, “moderado” e “grave” (BRUSTOLIN, et al., 2012; QIU et al., 2007).

Do mesmo modo, foram realizados estudos avaliando o processo de reepitelização de feridas cutâneas. Esta análise foi realizada por meio de análise da espessura do novo epitélio utilizando método estereológico com contagem de pontos nas intersecções de uma grade (BABAEI et al., 2013; GANJALI et al., 2013) ou por meio de medidas diretas da espessura (HU et al., 2011). Também foi utilizado o método que identifica quanto tempo é necessário para o completo fechamento da ferida, mas também foi observada atividade proliferativa deste (SANTRAM e SINGHAI, 2011). Já a contração da ferida foi analisada utilizando papel transparente traçado com a ferida (1 mm<sup>2</sup>) (MEKONNEN et al., 2013; LIU et al., 2010).

### 3.5 *Casearia sylvestris* Swartz

*Casearia sylvestris* Swartz (Figura 4) está classificada na tribo *Samydeae*, família *Salicaceae* e ordem *Malpighiales* (CHASE et al., 2002; SOLTIS et al., 2000; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003).

É uma espécie vegetal arbórea ou arbustiva com ampla distribuição no Brasil (desde a região do Rio Tapajós, no Estado do Amazonas, até o Estado do Rio Grande do Sul). Conhecida popularmente em nosso país como: guaçatonga, guaçatunga, vaçatonga, cafezinho-do-mato, café-silvestre, erva-de-bugre, chá-de-bugre, erva-de-lagarto, pau-de-lagarto, língua-de-lagarto, café-bravo, café-do-diabo (ABSY; SCAVONE, 1973; CAMINHOÁ, 1877; CORREA, 1975; HOEHNE, 1939; LORENZI; MATOS, 2002; SCAVONE et al., 1979; SILVA, 1926). Possui amplo uso tradicional no Brasil, sendo utilizada principalmente como cicatrizante no tratamento de feridas, úlceras, gastrites, picadas de cobras, antitérmico, etc. Extratos de suas folhas apresentaram ações anti-inflamatória e cicatrizante em ensaios farmacológicos (FERREIRA, et al., 2011).

**Figura 4:** *Casearia sylvestris* Swartz: indivíduo adulto e detalhe de folhas e flores.



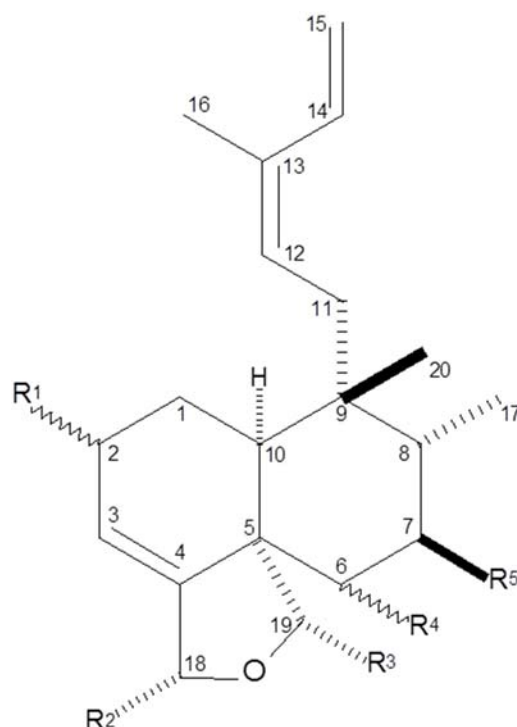
Quimicamente as espécies do gênero *Casearia* (cerca de 160 espécies distribuídas nos trópicos e subtrópicos) acumulam metabólitos secundários tais como flavonoides, taninos, lignanas, esteroides, cumarinas, amidas, compostos fenólicos e terpenóides, em especial diterpenos clerodânicos (VIEIRA JUNIOR, 2010).

Metabólitos secundários isolados e/ou identificados em *C. sylvestris* incluem monoterpenos e sesquiterpenos componentes do óleo essencial das folhas (SANTOS, 2008; SCHNEIDER et al., 2006), *nor*-isoprenóides (SANTOS, 2008;

WANG et al., 2009a) triterpenos, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido vanílico, lapachol (RASLAN et al., 2002), flavonoides (RASLAN et al., 2002; JUNGES; SCHENKEL; SIMÕES, 1985), neolignananas (WANG, et al., 2010), derivados do ácido elágico com ação inibitória sobre o veneno de *Bothrops jararacuçu* (SILVA et al., 2006a), ésteres derivados do ácido gálico (IGDE e MGDE) que apresentaram, além da atividade antimicrobiana já citada, ação antitumoral (DA SILVA et al., 2009).

Diversos diterpenos clerodânicos e *ent*-kauranos foram isolados de *C. sylvestris*, dentre os quais 28 diterpenos clerodânicos típicos do gênero *Casearia*: casearinas A-X (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2010; WANG et al., 2009b;) e caseargrewiina F (SANTOS et al., 2010), isolados de folhas ; casearvestrinas A-C, isoladas de folhas e ramos (OBERLIES et al., 2002); *rel*-19S-acetoxi-18*R*-butanoiloxi-18,19-epoxi-6S-hidroxi-2*R*-(2-metilbutanoiloxi)-5*S*,8*R*,9*R*,10*S*-cleroda-3,13(16),14-trieno, isolado das raízes (ESPÍNDOLA et al. 2004). Alguns destes diterpenos exibiram atividade citotóxica em células tumorais, antiulcerogênica, tripanossomicida e antifúngica (ITOKAWA et al., 1990; OBERLIES et al., 2002; SANTOS, 2008; SANTOS et al., 2010). Alguns diterpenos clerodânicos (Figura 5 e Tabela 1) apresentaram atividade antiulcerogênica (SANTOS, 2008).

**Figura 5:** Estrutura química geral de diterpenos clerodânicos presentes em espécies de *Casearia*. Na Tabela 1 são relacionados os nomes e substituintes para os diterpenos com ação antiulcerogênica.



**Tabela 1:** Exemplos de diterpenos clerodânicos típicos em espécies de *Casearia* onde, os ligantes R1 a R5 referem-se a substituintes da estrutura representada na Figura 5.

| SUBSTÂNCIA       | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | R <sup>4</sup> | R <sup>5</sup> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| casearina B      | OMe            | OAc            | OAc            | OAc            | OBu            |
| casearina D      | OH             | OBu            | OAc            | OH             | OBu            |
| casearina J      | OMe            | OBu            | OAc            | OH             | OBu            |
| casearina X      | OBu            | OBu            | OAc            | OH             | H              |
| caseargrewiina F | OBu            | OAc            | OAc            | OH             | H              |

A tabela 2 resume algumas informações de estudos farmacológicos pré-clínicos, realizados com extratos, frações ou substâncias isoladas da planta. Mesmo não sendo definitivos, seus dados sugerem um forte reflexo das informações etnofarmacológicas nas atividades biológicas observadas.

**Tabela 2:** Atividades biológicas das diferentes partes de *C. sylvestris*.

| PARTE DA PLANTA | ATIVIDADE BIOLÓGICA                                                                         | DERIVADO VEGETAL OU SUBSTÂNCIA                                                                           | REFERÊNCIA                                                                                                               |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Folhas secas    | Antitumoral                                                                                 | Casearinas (A-R)<br>Casearvestrinas (A-C)<br>Óleo essencial<br>Casearinas B, D, L, O, X e caseargreina F | Itokawa et al. (1990);<br>Morita et al. (1991)<br>Oberlies et al. (2002),<br>Silva et al. (2008)<br>Santos et al. (2010) |
|                 | Antiviral contra <i>Herpes simplex</i>                                                      | Extrato etanólico                                                                                        | Camargo et al. (1993).                                                                                                   |
|                 | Anti-inflamatório                                                                           | Infusão<br>Decocção<br>Óleo essencial                                                                    | Ruppelt et al. (1990)<br>Sassioto et al. (2004)<br>Esteves et al. (2005)                                                 |
|                 | Antifúngico                                                                                 | Casearinas G, S e T<br>Casearvestrinas A, B e C                                                          | Carvalho et al. (1998)<br>Oberlies et al. (2002)                                                                         |
|                 | Inibição da fosfolipase A <sub>2</sub>                                                      | Extrato aquoso<br>Extrato aquoso                                                                         | Borges et al. (2000)<br>Cavalcante et al. (2007)                                                                         |
|                 | Antiúlcera                                                                                  | Extrato hidroalcoólico<br>Extrato hidroalcoólico<br>Óleo essencial                                       | Basile et al. (1990)<br>Sertié et al. (2000)<br>Esteves et al. (2005)                                                    |
|                 | Antioxidante                                                                                | Extrato aquoso                                                                                           | Menezes et al. (2004)                                                                                                    |
|                 | Contra <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> | Extratos hexânico e etanólico                                                                            | Mesquita et al. (2005);<br>Mesquita et al. (2007)                                                                        |
|                 | Analgésico                                                                                  | Extrato hidroalcoólico                                                                                   | Mattos et al. (2007)                                                                                                     |
|                 | Hipotrigliceridemiante                                                                      | Extrato hidroalcoólico                                                                                   | Werle et al. (2009)                                                                                                      |
| Caule           | Contra <i>Aedes aegypti</i>                                                                 | Extrato hexânico                                                                                         | Rodrigues et al. (2006)                                                                                                  |
|                 | Contra <i>Plasmodium falciparum</i>                                                         | Extrato hexânico                                                                                         | Mesquita et al. (2007)                                                                                                   |
|                 | Analgésica                                                                                  | Infusão (casca e folhas)                                                                                 | Ruppelt et al. (1990)                                                                                                    |
| Raiz            | Contra <i>Trypanosoma cruzi</i>                                                             | Diterpeno clerodânico                                                                                    | Espíndola et al. (2004)                                                                                                  |
|                 | Contra <i>Leishmania donovani</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Plasmodium falciparum</i> | Extratos hexânico e etanólico                                                                            | Mesquita et al. (2005);<br>Mesquita et al. (2007)                                                                        |

Várias pesquisas sobre *C. sylvestris* relatam, para o extrato ou substâncias isoladas, ação inibitória de enzimas fosfolipase A<sub>2</sub> de venenos de cobras e de algumas toxinas (SILVA, et al., 2006a; RASLAN et al., 2002), antiulcerogênica (ESTEVES et al., 2005; SERTIÉ, 2000), anti-hiperlipidêmica (SCHOENFELDER, et al., 2008), antimutagênica em baixa concentração e mutagênica em alta concentração (OLIVEIRA, et al., 2009), antimicrobiana (SILVA, et al., 2008), anticolinesterásica (SILVA, et al., 2006) e anti-inflamatória observada no óleo das folhas (ESTEVES et al., 2005).

Existem evidências farmacológicas sobre o efeito anti-inflamatório de extrato de folhas de *C. sylvestris*. Os extratos aquosos de folhas e de cascas produziram em camundongos significativo efeito analgésico, avaliado pelo número de contorções

abdominais e, anti-inflamatório, avaliado em modelos de difusão do azul de Evans para a cavidade peritoneal e de edema de pata (PEREIRA et al., 1992; RUPPELT et al., 1990). A atividade anti-inflamatória também foi demonstrada pelo método do azul de Evans em ratos (SILVA et al., 2004). SASSIOTO et al. (2004) concluíram que a cronologia do processo de reparação óssea em defeitos ósseos preenchidos com matriz óssea desvitalizada em ratos foi retardada pela utilização do decocto de *C. sylvestris*, relacionando este efeito com a atividade anti-inflamatória de metabólitos secundários que promovem a inibição da síntese de prostaglandinas produzindo os efeitos analgésicos e anti-inflamatórios, diminuindo o número de macrófagos, fibroblastos, fibras colágenas e, conseqüentemente, inibindo a osteogênese. Em alguns modelos de inflamação induzidos por carragenina, o óleo essencial obtido das folhas de *C. sylvestris* inibiu a formação do edema de pata. Neste modelo é proposto um bloqueio de mediadores da cascata inflamatória do ácido aracdônico e inibição da atividade catalítica da cicloxigenase, comparável a propriedade da indometacina (inibidora de COX não seletiva e não esteroideal). Por outro lado, eles não interferem na permeabilidade vascular, devido provavelmente a sua falha em antagonizar mastócitos e/ou degranular basófilos e liberar substâncias farmacológicas ativas (histaminas e serotonina) (FERREIRA et al., 2011). Segundo Albano et al. (2013), o extrato hidrialcoólico inibiu a migração celular de leucócitos em modelo de pleurisia e também a atividade enzimática das metaloproteases e fosfolipase A<sub>2</sub> envolvidas no mecanismo do processo inflamatório provocado pela indução por carragenina em modelo de edema de pata em ratos.

Cabe também ressaltar que os diterpenos clerodânicos do tipo das casearinas esculentina A e B, isolados de *C. esculenta*, inibiram citocinas envolvidas no processo inflamatório. Eles apresentaram ações citotóxica em células tumorais e anti-inflamatória e sua patente foi depositada na Europa por uma empresa farmacêutica (AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH, 1999).

Na avaliação de propriedades cicatrizantes das folhas de *C. sylvestris*, observou-se que o processo cicatricial evoluiu mais rapidamente nos animais tratados com o extrato etanólico 95% ou com a pomada (PEG) acrescida de extrato hidroalcoólico (GOMES et al., 2005; SCAVONE et al., 1979). Camargo et al. (1996) avaliaram a ação do extrato hidroalcoólico (2:1, v/v) de folhas em lesão subcutânea em camundongos, observando que os animais tratados com o extrato apresentaram redução significativa da fase aguda do processo inflamatório seguida de

intensificação e prolongamento de eventos típicos da fase regenerativa (proliferação de fibroblastos, fibrócitos e vasos capilares neoformados). Pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) depositaram uma patente de fitoterápicos à base de extratos de *C. sylvestris* para o tratamento do herpes cuja ação pode estar relacionada ao seu efeito cicatrizante (CURY, 2005).



# MATERIAIS E MÉTODOS

*Claude Pierri*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais, reagentes e equipamentos

**Balança analítica:** Marte<sup>®</sup> modelo AY220 (máx 220g; min 0,01g; d = 0,0001g).

**Balança com infravermelho:** LP11 - METTLER<sup>®</sup>.

**Balança semi-analítica:** Gehaka<sup>®</sup> modelo BG 200 (máx 200 g; min 0,025 g; d= 0,001g).

**Cartucho para extração em fase sólida (*clean-up*):** Phenomenex<sup>®</sup> modelo Strata<sup>™</sup> C18 - E (15 x 10 mm; 55 µm).

**Coluna cromatográfica de bancada:**

- coluna de vidro com 5,0 cm de diâmetro interno com saída para sistema de sucção ("vácuo").

**Coluna cromatográfica CLAE:**

- Hypersil Gold<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm x 5 µm).

**Cromatografia em camada delgada:**

- placas em alumínio cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) (20 x 20 cm) com indicador de fluorescência em 254 nm. As placas foram ativadas por 1 hora em estufa à 110° C.

**Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (Shimadzu<sup>®</sup> Prominence, modo analítico):**

- Bomba quaternária modelo LC-20AT, injetor modelo SIL-20A, Forno de coluna modelo CTO-20A, detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A, módulo de comunicação modelo CBM-20A, desgaseificador modelo DGU-20A 5, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> de 6 pórticos.

**Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (Shimadzu<sup>®</sup>, modo analítico):**

- Bomba quaternária modelo LC-10AD, detector UV-VIS modelo SPD-10A, módulo de comunicação modelo SCL-10A, desgaseificador modelo DGU-14A, injetor manual Rheodyne<sup>®</sup> de 6 pórticos.

**Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu<sup>®</sup> UV Spectrophotometer UVProbe 2.42)**

**Espectrômetro de ressonância magnética nuclear:** Espectrômetro Bruker 7,0 Tesla operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e a 75 MHz para <sup>13</sup>C, com sonda dual <sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H de 5 mm.

**Espectrômetro de ressonância magnética nuclear:** Espectrômetro Varian Inova 7,0 Tesla operando a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , com sonda direta multinuclear (BB/1H) de 5mm.

**Estufa de secagem e esterilização:**

- modelo 320 SE - Fanem<sup>®</sup>.

**Fases estacionárias para cromatografia em coluna:**

- a)  **sílica gel:** 60-200  $\mu\text{m}$ ; Merck<sup>®</sup>;
- b)  **carvão ativado em pó:** Labsynth<sup>®</sup> Produtos para Laboratórios Ltda;
- c)  **sílica C-18:** 40-60  $\mu\text{m}$ ; LiChroprep<sup>®</sup> RP-18 Merck<sup>®</sup>;
- d)  **sílica gel:** 40-60  $\mu\text{m}$ /poro 60 Å; Aldrich<sup>®</sup>; 220 g.

**Moinho de facas:**

- modelo TE 148 - Tecnal<sup>®</sup>

**Mufla:**

- modelo M2 BRAVAC<sup>®</sup>

**Rota evaporador:**

- IKA-DEST modelo KV 05S3, com banho de aquecimento Quimis<sup>®</sup>, banho ultratermostatizado (refrigeração) Quimis<sup>®</sup> modelo Q214M3;

**Tamisador vibratório** - Produtest<sup>®</sup>

**Tamises** - Telatest<sup>®</sup>

**Solventes:**

- a) **CCDC, CC, EFS:** solventes grau P.A. marcas Qhemis<sup>®</sup> e Synth<sup>®</sup>;
- b) **Análises por CLAE (incluindo pré-tratamento da amostra):** solventes grau cromatográfico (J. T. Baker<sup>®</sup>);
- c) **Água ultrapura:** obtida a partir de purificador Milli Q Synergy<sup>®</sup>;

**Ultrassom:**

- Unique<sup>®</sup>, modelo USC – 2800, frequência 40KHz.

## 4.2 Material vegetal

### 4.2.1 Obtenção da matéria-prima vegetal

As folhas de *C. sylvestris* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP. Sua exsicata está depositada no herbário "Maria Eneida P. Kaufmann" do Instituto Botânico do Estado de São Paulo sob o número de espécime AGS 102 (S 21.81466, W 48.20215).

#### **4.2.2 Preparo do material vegetal**

A secagem do material vegetal foi realizada em estufa com circulação de ar a 40° C por 7 dias. O material vegetal seco foi fragmentado em moinho de facas e armazenado sob refrigeração até a extração.

#### **4.3 Ensaios físico-químicos de qualidade**

Foram utilizadas metodologias de controle de qualidade para drogas vegetais conforme técnicas Farmacopeicas (Farmacopéia Brasileira, 2010; British Pharmacopoeia, 2010) e não Farmacopeicas (COSTA, 1994; VOIGT; BORNSCHEIN, 1982). Os parâmetros a seguir foram determinados.

##### **4.3.1 Perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)**

A droga vegetal seca e triturada, contendo cerca de 4,0 g exatamente pesados, foi submetida a aquecimento (120° C) através de radiação infravermelha pelo período de 70 min. Após este período foi feita medida da massa. Os resultados foram expressos através da relação entre a massa inicial e final da droga vegetal em porcentagem (% p/p), através da média de três determinações (VOIGT; BORNSCHEIN, 1982).

##### **4.3.2 Teor de cinzas totais**

Os cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em mufla a 450° C por 30 min, resfriados em dessecador (15 min) e suas massas (tara) foram determinadas em balança analítica. Adicionou-se cerca de 1,0 g exatamente pesados da droga vegetal pulverizada no interior de cada cadinho, pesado em balança analítica, distribuindo uniformemente a amostra. Os cadinhos foram mantidos em chapa elétrica à 110° C até que a droga vegetal atingisse o estado de carvão e, posteriormente, foram submetidos à calcinação em mufla à temperatura de 450° C por 4 h. Os cadinhos foram resfriados a temperatura ambiente em dessecador com sílica gel durante 30 min e, em seguida, pesados. Repetiu-se o procedimento até massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga vegetal (% p/p) e representa a média de três determinações (metodologia baseada na Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.3.3 Teor de cinzas insolúveis em ácido

As cinzas totais obtidas no item 4.3.2 foram fervidas em chapa elétrica à 110° C por 5 min com 25 mL de ácido clorídrico 10% (p/v) nos cadinhos originais cobertos com vidro de relógio. Após, os vidros de relógio foram lavados com água deionizada quente, recolhendo-se o resíduo no próprio cadinho. O conteúdo de cada cadinho foi filtrado em papel de filtro isento de cinzas e lavado com água quente até o filtrado se mostrar límpido e neutro (papel indicador universal). O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido novamente para seu respectivo cadinho e, a seguir, seco em chapa elétrica quente. Após este procedimento, os cadinhos contendo o papel de filtro com resíduo foram colocados em mufla para incineração a cerca de 500° C. Os cadinhos foram resfriados a temperatura ambiente em dessecador com sílica gel durante 30 min e, em seguida, pesados. Repetiu-se o procedimento até massa constante. O resultado foi expresso em porcentagem em peso de cinza na droga vegetal (% p/p) e representa a média de três determinações (metodologia baseada na Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.3.4 Determinação da fração extraível em etanol 96°GL

Foram pesados cerca de 4,0 g da droga vegetal seca e pulverizada. Em seguida, submeteu-se à maceração com 100 mL de etanol e agitação ocasional durante 6 h e repouso ao abrigo da luz por 18 h. Filtrou-se rapidamente a solução extrativa. Transferiu-se 25 mL do filtrado para um pesa filtro (previamente tarado) e evaporou-se o excesso de solvente em banho-maria até a secura. Terminou-se de secar em estufa 105° C por 6 h, resfriou-se por 30 min em dessecador contendo sílica gel e pesou-se novamente. O teor de extrativos foi calculado a partir da relação entre a massa do resíduo seco obtido e a massa de droga vegetal utilizada em porcentagem (% p/p) através da média das três determinações realizadas (Farmacopeia Brasileira, 2010).

#### 4.3.5 Análise granulométrica do pó

Cerca de 25 g do pó de folhas moídas e secas de *C. sylvestris*, foram exatamente pesados, e submetidos à passagem forçada por vibração, através de tamises com abertura de malhas correspondentes a 0,125; 0,177; 0,420; 0,840; 1,00 mm e coletor, utilizando tamisador vibratório, na escala dez do aparelho, durante 30 min. Após este processo, as frações foram retiradas dos tamises e do coletor e

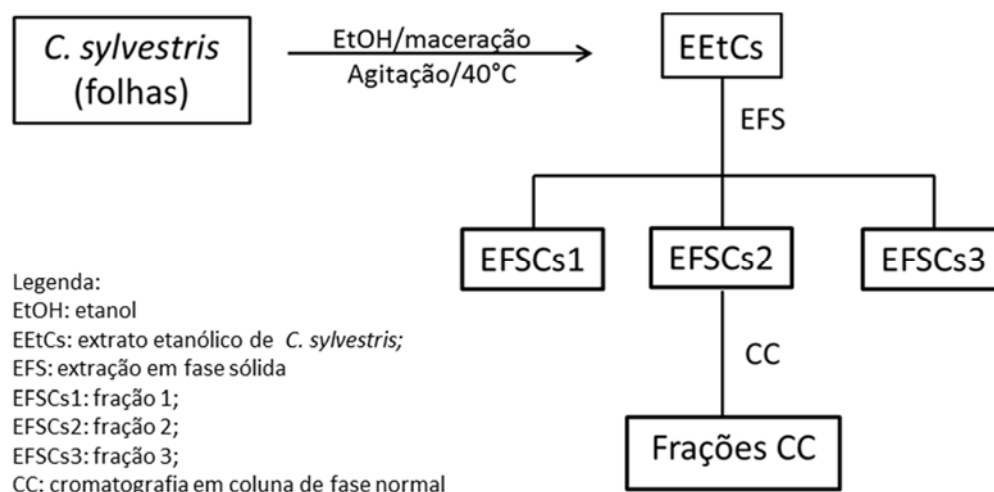
pesadas. Este procedimento foi realizado em quintuplicata. Para os estudos de passagem e retenção a partir da quantidade de pó de folhas recolhida de cada tamis, foram elaboradas planilhas no software Excel®, onde foram calculadas as frequências percentuais cumulativas. A realização desta análise foi baseada na Farmacopeia Brasileira (2010) com o objetivo de determinar a granulometria do pó de folhas secas moídas de *C. sylvestris*.

#### 4.4 Obtenção do extrato

O extrato foi obtido a partir de folhas secas e moídas de *C. sylvestris* (massa total: 2,0 Kg), utilizando-se maceração com agitação ocasional à 40° C e etanol (volume total: 24 L) como líquido extrator na proporção (1:12;g/mL), durante 7 dias. A extração foi realizada em 4 etapas contendo 500 g de folhas secas para 6 L de etanol cada uma. A solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, concentrada em evaporador rotativo, seca sob fluxo de ar em capela e, antes de sua utilização nos ensaios, em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida. O extrato bruto concentrado foi armazenado em frasco de vidro fechado em geladeira. O método de extração proposto é baseado no trabalho de doutorado de Santos (2008), que através de CLAE-DAD determinou um teor de cerca de 19% (p/p) de diterpenos clerodânicos (marcadores químicos) no extrato etanólico de folhas, que apresentou significativa ação antiulcerogênica em ratos.

##### 4.4.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* por extração em fase sólida (EFS)

Foi realizada uma extração em fase sólida (EFS) com 20,0 g de extrato etanólico seco de folhas de *C. sylvestris* (Figura 6). As condições cromatográficas basearam-se no trabalho de SANTOS (2008). O extrato foi misturado com a fase estacionária (1:1, p/p) e aplicado em coluna de vidro contendo sílica gel (60-200 µm) e carvão ativo em pó na proporção 1:1 (p/p) (20 x 5 cm). A eluição ( $V_{\text{eluyente}} = 700,0$  mL) foi realizada sob vácuo com os seguintes eluentes: 1) hexano/acetato de etila 95:05 (v/v) (fração EFSCs1); 2) acetato de etila (fração EFSCs2); 3) metanol (fração EFSCs3). As frações foram concentradas em evaporador rotativo e, em seguida, secas sob fluxo de ar em capela e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida.

**Figura 6:** Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris*.

#### 4.4.2 Análises cromatográficas do extrato EEtCs e frações EFSCs

##### 4.4.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A análise por cromatografia em camada delgada do extrato e das frações EFSCs (5,0 mg/mL, acetato de etila ou metanol) foi desenvolvida com placas de alumínio (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®) com indicador de fluorescência (254 nm), utilizando como eluente hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:02 (v/v) e anisaldeído sulfúrico (estufa 110° C, 10 min) como revelador. Foram utilizados como padrões os diterpenos caseargrewiina F, casearinas B e X (1,0 mg/mL, acetato de etila). Distância total de eluição (D): 18 cm. Os padrões foram purificados e identificados nos laboratórios do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química-UNESP pelo Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos no seu trabalho de doutorado, sob a orientação do Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro.

##### 4.4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

As amostras analisadas foram EEtCs e EFSCs2. Foram utilizados como padrões os diterpenos clerodânicos (item 4.4.2.1) casearina X, B e caseargrewiina F, na concentração de 1,0 mg/mL (metanol).

O pré-tratamento das amostras incluiu uma extração em fase sólida com sílica de fase reversa (Phenomenex® Strata™ C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), solubilizando-se as amostras (extrato: **7,3 mg**; EFSCs2: **8,9 mg**) em 1,0 mL de metanol/água

98:02 (v/v) e usando como eluente metanol/água (98:02, v/v, 4,0 mL), seguida de filtração em membrana (0,22  $\mu$ m, PVDF Millipore®), secagem (dessecador com sílica gel sob pressão reduzida) e solubilização em 1,0 mL metanol.

As análises foram desenvolvidas em equipamento do tipo CLAE-DAD utilizando coluna de fase reversa (Hypersil Gold®, C18, 250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), gradiente linear com metanol:acetonitrila:água variando da proporção de 22:44:34 para 47:53:00 (v/v/v) em 42 min e, em seguida, isocraticamente com 47:53:00 (v/v/v) por 5 min; vazão de 0,8 mL/min; detecção: 190-700 nm.; volume de injeção 20  $\mu$ L.

A identificação de diterpenos do tipo das casearinas no extrato etanólico e fração EFSCs2 baseou-se na comparação dos  $t_R$  e na sobreposição dos espectros de absorção no UV com os padrões. Além disso, os espectros no UV obtidos para todos os picos das amostras foram utilizados na identificação de diterpenos do tipo das casearinas segundo abordagem descrita em Carvalho et al. (2009).

Para a análise quantitativa da caseargrewiina F e de diterpenos do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F foram utilizadas soluções de caseargrewiina F nas concentrações de 0,035; 0,070; 0,140; 0,280 e 0,560 mg/mL para obtenção de uma curva analítica.

#### **4.4.3 Fracionamento de EFSCs2 por CC de fase normal**

4,0 g de EFSCs2 (Figura 5) foram solubilizados no eluente inicial (20,0 mL) e aplicados em coluna de vidro contendo sílica gel (20 x 5 cm; 40-60  $\mu$ m/poro: 60 Å). A eluição ( $V_{\text{eluente}} = 800,0$  mL; exceto fração  $V_m = 300,0$  mL) foi realizada sob pressão como segue: 1. Hex/AcOEt /i-PrOH 85:14:01 (fração  $V_m$  e frações CCCs1-3); 2. 78:20,5:1,5 (frações CCCs4-13); 3. (76:22,4:1,6) (frações CCCs14-23); 4. (73:25,2:1,8) (frações CCCs24-33); 5. (68:29,9:2,1) (frações CCCs34-43); 6. (60:37,2:2,7) (frações CCCs44-52); 7. AcOEt/MeOH 1:1 (frações 53-55). Volume de coleta das frações:  $V_m = 300,0$  mL; CCCs1-3 = 250,0 mL; CCCs4-47 e CCCs49-53 = 80,0 mL; CCCs48 e CCCs54-55 = 250 mL.

##### **4.4.3.1 Análises cromatográficas das frações CCCs**

###### **a) CCD**

Todas as frações obtidas por CC foram submetidas a análises por CCD para avaliação da separação e comparação dos perfis cromatográficos e, em seguida, as que apresentaram mesmo perfil químico foram reunidas.

As análises por CCD das frações CCCs1-55 foram desenvolvidas em placas de alumínio (20 x 20 cm) cobertas com sílica gel (Sigma-Aldrich®) com indicador de fluorescência (254 nm), utilizando como eluente hexano/acetato de etila/isopropanol 70:28:02 (v/v) e anisaldeído sulfúrico (estufa 110° C, 10 min) como revelador. Distância total de eluição (D): 18 cm. Para as frações de CCCs16-54 foi utilizada um segundo eluente (demais condições cromatográficas idênticas): hexano/acetato de etila/isopropanol 60:37,3:2,7 (v/v).

#### **b) CLAE-UV**

O pré-tratamento das amostras incluiu uma extração em fase sólida com sílica de fase reversa (Phenomenex® Strata™ C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), solubilizando-se as amostras (1,0-5,0 mg) em 1,0 mL de metanol/água 98:02 (v/v) e usando como eluente metanol/água (98:02, v/v, 4,0 mL), seguida de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®) e secagem (dessecador com sílica gel sob pressão reduzida). As amostras foram solubilizadas em volume de metanol suficiente para obter-se uma concentração de cerca de 1,0 mg/mL.

As frações CCCs reunidas foram analisadas por CLAE-UV, para determinarmos o perfil das amostras. Condições de análise: coluna de fase reversa (Hypersil Gold®, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), sistema isocrático com metanol:água 70:30 (v/v), em 42 min; vazão 0,7 mL/min; detecção em 235 nm; volume de injeção foi de 20 µL (SANTOS, 2008).

#### **c) Técnicas espectrofotométricas utilizadas na determinação estrutural da substância isolada na fração CCCs11**

Os espectros de RMN unidimensionais e os mapas de contorno bidimensionais foram obtidos a 300 MHz para <sup>1</sup>H e a 75 MHz para <sup>13</sup>C em um Espectrômetro Bruker 7,0 Tesla, operando com gradiente de pulso. Utilizou-se piridina-d5 como solvente e piridina como referência interna. Os espectros no UV foram obtidos (MeOH) num Espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu® UV Spectrophotometer UVProbe 2.42).

#### **d) Quantificação da casearina J no extrato EEtCs**

A amostra EEtCs analisada (6,25 mg) foi submetida a um pré-tratamento que incluiu uma extração em fase sólida com sílica de fase reversa (Phenomenex®

Strata™ C18-E; 15 x 10 mm; 55 µm), solubilizando-se a mesma em 1,0 mL de metanol/água 98:02 (v/v) e usando como eluente metanol/água (98:02, v/v, 4,0 mL), seguida de filtração em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®), secagem (dessecador com sílica gel sob pressão reduzida) e solubilização em 1,0 mL metanol.

As análises foram desenvolvidas em equipamento do tipo CLAE-UV utilizando coluna de fase reversa (Hypersil Gold®, C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm), gradiente linear com metanol:acetonitrila:água variando da proporção de 22:44:34 para 47:53:00 (v/v/v) em 42 min e, em seguida, isocraticamente com 47:53:00 (v/v/v) por 5 min; vazão de 0,8 mL/min; detecção em 235 nm.; volume de injeção 20 µL.

Para a construção da curva analítica utilizamos como padrão soluções metanólicas de casearina J em concentrações crescentes (0,034; 0,063; 0,125; 0,250 e 0,500 mg/mL).

A identificação da casearina J no extrato etanólico baseou-se na comparação dos  $t_R$  e na sobreposição dos espectros de absorção no UV com o padrão.

## 4.5 Ensaios biológicos

### 4.5.1 Ensaios de atividade anti-inflamatória

Os trabalhos foram submetidos para o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, sob o parecer favorável protocolo CEUA/FCF/CAR nº 10/2012 para execução dos ensaios para atividade anti-inflamatória aguda (edema de pata) e crônica (artrite). A estruturação da proposta foi realizada conforme os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

#### 4.5.1.1 Animais para o modelo de edema de pata

Foram utilizados ratos Wistar (250-280g) sendo 6 animais por grupo experimental: Grupo Controle (controle negativo), Grupos Experimentais (extrato etanólico seco, frações de diterpenos e substâncias purificadas), Grupo controle Positivo (indometacina). Os ratos foram mantidos em condições ambientais do biotério, com temperatura controlada de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  e ciclo circadiano de 12 h, em caixas plásticas (50 x 40 x 20) com o máximo de 6 animais por caixa, iniciando o período de luz às 7:00 h. Os animais receberam alimento e água *ad libitum*.

#### **4.5.1.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória aguda do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *C. sylvestris* (modelo de edema de pata)** (baseado em WINTER, RISLEY & NUSS, 1962)

Os experimentos de inflamação aguda foram realizados seguindo o modelo de edema de pata, em que se induziu a formação de exsudato inflamatório com a carragenina 200µg / pata.

O grupo controle negativo recebeu por via subplantar o agente químico irritante, carragenina, na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda. O extrato etanólico (EEtCs), as frações (EFSCs1 e EFSCs2), os diterpenos (CasB e CasgwF) e a indometacina (controle positivo) foram administrados por via oral (gavagem) a outros grupos de animais, 60 min antes da carragenina. Na execução dos experimentos, as amostras testadas tiveram como veículo a mistura tween 80 8% e carboximetilcelulose (CMC) 1%. As doses iniciais para o extrato (EEtCs) e indometacina foram 1, 10 e 100 mg/kg p.c. animal. As doses da fração de diterpenos (EFSCs1 e EFSCs2) foram 10 e 50 mg/kg p.c. animal e de substâncias purificadas (caseargrewiina F e casearina B) foram 0,5; 2,5 e 5,0 mg/kg p.c. animal, respectivamente.

O desenvolvimento do edema da pata direita e esquerda foi avaliado em milímetros com o auxílio de um espessímetro medido nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção subplantar de carragenina. Os resultados foram expressos pela medida das patas antes (tempo 0) e após os tratamentos. Após 7 h do início do experimento, os animais foram mortos com CO<sub>2</sub>.

#### **a) Análise estatística**

As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey. Para tal utilizou-se o *software* InStat3 (GraphPad, San Diego, CA, USA) admitindo níveis de significância mínimos de  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

#### **b) Teste de gastrotoxicidade**

A ulcerogênese gástrica foi verificada nos mesmos animais dos grupos utilizados para o modelo de edema de pata.

Após morte com CO<sub>2</sub>, os animais tiveram seus estômagos removidos, abertos no sentido da maior curvatura e lavados com salina. A mucosa exposta foi

observada através de um microscópio-estereoscópio Leica MZAPO, quanto a coloração e integridade. No caso da existência de lesões, estas foram contadas e medidas através do programa LIDA user, obtendo-se o número de ulcerações com diferentes graus de lesão, seguindo o índice de ulcerogênese gástrica (I.U.G.), que obedece a critérios numéricos para a classificação das lesões da mucosa gástrica (CIOLI et al., 1974; DARLING et al, 2004):

**Grau 1:** lesões < 1,5 mm

**Grau 2:** lesões de 1,5 à 2,5 mm

**Grau 3:** lesões de 2,5 à 3,5 mm

**Grau 4:** lesões de 3,5 à 4,5 mm

**Grau 5:** lesões > 4,5 mm

#### **4.5.1.3 Animais para o modelo anti-artrite reumatoide**

Foram utilizados ratos Wistar machos (300-350 g) sendo 6 animais por grupo experimental: Grupo Controle Negativo (sem artrite), Grupos Experimentais (com artrite sem tratamento; com artrite tratado com EECs 100 mg/Kg p.c. animal) e Grupo Controle Positivo (com artrite tratado com dexametasona 1 mg/Kg p.c. animal). Os animais foram mantidos em condições ambientais do biotério, com temperatura controlada de  $24 \pm 1^\circ \text{C}$  e ciclo circadiano de 12 h, em caixas plásticas (50 x 40 x 20 cm), com o máximo de 6 animais por caixa, iniciando o período de luz as 7:00 h. Os animais receberam alimento e água *ad libitum*.

#### **4.5.1.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória crônica do extrato etanólico de *C. sylvestris* através de modelo anti-artrite reumatóide (baseado em TRENTAN et al., 1977)**

Este ensaio foi realizado em colaboração o posdoutorando Dr. Ednir de Oliveira Vizioli, sob supervisão da Profa. Dra. Chung Man Chin do Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

Foi utilizado como agente sensibilizante a collagenase tipo II, dissolvida em 0,1 N de ácido acético na concentração de 1 mg/ mL e emulsionado em concentração de 1:1 (v/v) do adjuvante completo de Freund que contém *Mycobacterium butyricum* na concentração de 0,5 mg/ mL. O processo foi realizado

com a administração de 1 mL intradérmico do agente sensibilizante divididos em quatro sítios de aplicação no dorso dos animais.

A avaliação dos animais ocorreu de acordo com PHILIPPE et al., 1997, desde o momento da indução, considerado o dia 0 (**D0**). A fase inicial foi considerada entre os dias 0 a 4 (**D0-D4**), fase de instalação da doença, nos dias 5 a 9 (**D5-D9**), a fase sistêmica, entre os dias 10 e 14 (**D10-D14**) e a fase artrítica, crônica, no 15<sup>o</sup> dia da indução (**D15**).

Após o estabelecimento da fase inflamatória crônica (**D15**), o tratamento foi realizado com anti-inflamatório esteroidal (AIE), dexametasona (1 mg/Kg), via oral (gavagem) por 10 dias, considerado a terapêutica preconizada nos estudos da artrite reumatoide (AR) (CADER et al., 2011) e o extrato de *Casearia sylvestris* Swartz (100 mg/ Kg), via oral (gavage) por 10 dias.

Os parâmetros como lesão articular e redução de peso foram pontuados seguindo critérios de escalonamento (SEIDAL et al., 1997):

- 0 = sem inchaço/ manutenção do peso;
- 1 = pouco eritema/ redução do peso;
- 2 = maciço eritema e pouco edema/ redução de 5% do peso;
- 3 = maciço eritema e extensivo edema/ redução de 5-10% do peso.

Outros critérios foram avaliados como a deambulação e a febre. Ao término do experimento (**D25**) as patas foram amputadas e os órgãos dissecados para análise histopatológica no Instituto de Patologia Cirúrgica e Citopatologia Dr. Nicolino Lia Neto em Araraquara.

#### **4.5.2 Ensaio de atividade cicatrizante**

Os trabalhos foram submetidos para o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Maringá – UEM – PR (CEEAA-UEM), local onde foram realizados os ensaios de cicatrização em Março de 2013, sob parecer favorável nº 067/2013. A estruturação da proposta foi realizada conforme os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

##### **4.5.2.1 Animais**

Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério

setorial do Departamento de Ciências Morfofisiológicas por 3 dias antes do procedimento experimental para habituação sob as seguintes condições: temperatura controlada de  $22 \pm 1^\circ \text{C}$  e ciclo circadiano de 12 horas, iniciando o período de luz as 7:00 horas e recebendo alimento e água *ad libitum*.

#### **4.5.2.2 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e substância isolada de *C. sylvestris***

Os animais (n=40) foram anestesiados com uma associação de xilazina (0,1mL/100g) e ketamina (0,1mL/100g) para a retirada manual dos pelos (epilação) do dorso próxima a região cervical. Após a epilação, foram feitas duas demarcações paralelas uma a outra, com o auxílio de um delimitador metálico de  $1\text{cm}^2$ . A seguir a pele demarcada foi excisionada e as feridas foram lavadas com solução salina.

Imediatamente após a excisão as feridas do lado direito de cada animal foram diariamente tratadas com gelcreme de *C. sylvestris* (n=20) (Anexo 18A) ou gelcreme de caseargrewiina F (n=20) (Anexo 18B) e as feridas do lado esquerdo, consideradas controle, foram tratadas com a base do gelcreme (Anexo 18C).

Os animais foram mortos 4, 7, 10, 14 dias após a excisão (n=5/tempo/gelcreme), sendo que, duas horas antes foram injetados, por via endovenosa (veia peniana) 0,5 mg/kg de sulfato de vincristina (Dabaz<sup>®</sup> -TEUTO) para bloquear células epiteliais em metáfase. Todas as injeções foram feitas no mesmo horário. Em seguida foi realizada a excisão para o estudo histológico e físico-químico.

Os tecidos provenientes das feridas cutâneas foram coletados e transferidos para frascos contendo paraformaldeído 4% mantidos por 24h no mesmo. Posteriormente, procedeu-se a análise macroscópica identificando-se a área de ferida e seccionando-se o tecido no sentido longitudinal de modo que a mesma fosse dividida exatamente no ponto central, propiciando duas metades iguais. Os tecidos fixados foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e, posteriormente, diafanizados com concentrações crescentes de xilol em álcool. Em seguida, foram embebidos em parafina ( $58-60^\circ \text{C}$ ) e produzidos cortes histológicos de 5 a 7  $\mu\text{m}$ ; na sequência, foram desparafinizados e corados em Hematoxilina e Eosina (HE).

Todas as análises histomorfométricas foram realizadas no microscópio ótico Nikon eclipse TS100 e *software* de análises de imagens digitais Infinity Analyse, Lumenera Corporation, versão 5.0.3.

Para análise do processo de reepitelização avaliamos, a partir das bordas da ferida, os seguintes parâmetros: índice mitótico, espessura, perímetro e área do epitélio.

#### **a) Índice mitótico**

O índice mitótico é definido como a média da somatória de figuras mitóticas identificadas em dez campos consecutivos em aumento de 400x (KIM et al., 2007). Foram contadas as células epiteliais (queratinócitos) bloqueadas em metáfase, após injeção de sulfato de vincristina, nas camadas basal e supra basal do epitélio neoformado, em cortes corados com HE. Segundo Hoffman (1947), considerado um parâmetro importante na identificação de processos proliferativos.

#### **b) Espessura do epitélio**

A espessura do epitélio foi medida em objetiva de 200x no mínimo três pontos distintos (início, centro e ponta) e, nos casos que o processo de reepitelização havia ultrapassado um campo de 200x, realizamos medidas subsequentes para obter a média de espessura nos diferentes pontos. Estas medidas foram realizadas em ambas as bordas da ferida.

#### **c) Perímetro e área do epitélio**

O perímetro e a área de reepitelização e foram calculados delimitando, digitalmente, a reepitelização em aumentos de 200x.

#### **d) Tratamento estatístico**

A análise dos dados foi realizada em comparação entre os grupos, dois a dois. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade de D'Agostinho & Person. Caso os dados apresentassem distribuição normal foi realizado o teste *t* de amostras pareadas. Caso não apresentasse distribuição normal foi realizado o teste Wilcoxon ou teste de Mann Whitney.

An oil painting of a plant, possibly a corn cob, with several green leaves and a central white, textured element. The painting is signed 'Claude Pierri' in the bottom right corner.

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

Claude Pierri

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Material vegetal

#### 5.1.1. Preparo do material vegetal

Após a coleta as folhas foram secas e moídas. A finalidade da secagem é a retirada da água contida no material vegetal, deste modo, impedindo o crescimento microbiano e possíveis reações de degradação (hidrólise). A umidade residual depende do tipo de órgão que constitui este material. A secagem se caracteriza pela exposição a temperaturas relativamente baixas (inferiores a 60° C), com longo tempo de contato (geralmente 7 dias). Independente de como é realizada, a secagem propicia a redução de peso e volume facilitando a moagem do material, acondicionamento e armazenamento. No caso da *C. sylvestris* foi utilizado estufa 40° C por 7 dias. De acordo com BANDEIRA (2004), a estabilização prévia à secagem não interfere no teor de diterpenos clerodânicos nos extratos obtidos de folhas. Do mesmo modo, a secagem à sombra nas mesmas condições de temperatura não produz diferenças no teor destas substâncias. Com o auxílio de um moinho de facas realizamos a moagem do material vegetal devidamente seco.

### 5.2 Ensaio Físico-Químicos de Qualidade

Os ensaios físico-químicos de qualidade realizados na droga vegetal e nos extratos são de extrema importância para o futuro desenvolvimento de um produto farmacêutico a base de uma droga vegetal. Esta questão inclui rigoroso acompanhamento nas diferentes etapas de desenvolvimento e produção, desde a coleta do material vegetal até o produto final. No presente trabalho foram realizados estes ensaios com a finalidade de comparar com alguns dados já existentes de acordo com LUZ et al. (1998) e estabelecer alguns parâmetros que ainda não se encontram na literatura.

#### 5.2.1 Perda por dessecação em balança com infravermelho (INFRATEST)

Mesmo submetido ao processo de secagem, o material vegetal apresenta certa quantidade de água retida no interior de suas células, valor este que é preciso saber para conhecer se suas condições de preparo e conservação foram boas. A água residual encontrada na droga vegetal seca está relacionada com seu correto armazenamento o que pode acarretar na perda do material por contaminação

microbiana ou degradação enzimática de seus constituintes químicos (SIMÕES et al, 2007). A determinação da perda por dessecação do pó das folhas de *C. sylvestris* foi realizada em balança com infravermelho à temperatura de 120° C, com leitura após 70 minutos. Dos resultados obtidos, foram calculadas a porcentagem de água retida em cada amostra de droga vegetal seca e moída. A perda de umidade (média de 3 determinações) foi de **9,5% (p/p)**. O limite máximo de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al, 2007), onde concluiu-se que o valor encontrado está dentro do parâmetro estabelecido. Com este resultado, em armazenamento adequado, é possível manter a qualidade da droga vegetal evitando contaminação e decomposição dos constituintes químicos evitando a decomposição por hidrólise e reações enzimáticas.

### 5.2.2 Teor de cinzas totais

O teor de cinzas totais é composto pelo resíduo não volátil, isento de carbono, resultante da combustão das substâncias orgânicas. Originárias dos constituintes minerais e dos organo-metálicos integrantes das plantas podendo também ser substâncias de origem terrosa aderida na mesma (SIMÕES et al, 2007; VIGO, et al., 2004).

As cinzas totais, dentro de certos limites, nos informam o grau de pureza e identificação da droga vegetal. Neste experimento foi obtido um valor de **7,9% (p/p)** (média de 3 determinações) para cinzas totais, semelhante ao valor encontrado por LUZ et al. (1998) que foi de 8,0%.

### 5.2.3 Teor de cinzas insolúveis em ácido

O teor de cinzas insolúveis em ácido (cinzas não fisiológicas) é composto pelo resíduo não volátil e de origem inorgânica, isento de carbono, originário geralmente de contaminação por terra ou areia da planta (SIMÕES et al, 2007; VIGO, et al., 2004). Dentro de certos limites as cinzas insolúveis em ácido constituem um índice de pureza, sendo assim necessário estabelecer uma variação dentro do qual se considere o teor aceitável.

O teor de cinzas insolúveis em ácido obtido (média de 3 determinações) foi de **0,74% (p/p)**; o valor especificado para *Casearia sylvestris* encontrado por LUZ et al. (1998) foi de 0,48%.

#### 5.2.4 Determinação da fração extraível em etanol 96°GL

Nesta técnica foi avaliada apenas a quantidade (massa) de substâncias totais que podem ser extraídas aplicando-se o método da maceração e tendo o álcool como líquido extrator, e não tem relação com a quantidade de princípios ativos contidos na planta ou no extrativo obtido. A análise foi determinada com a droga vegetal seca e pulverizada obtida a partir de folhas de *C. sylvestris* e o resultado obtido foi de **7,2 % (p/p)** de fração extraível. Como não existe valor para *C. sylvestris* na literatura, os resultados obtidos neste trabalho tornam-se importantes no estabelecimento de parâmetros de qualidade para esta droga vegetal.

#### 5.2.5 Análise granulométrica do pó

A análise granulométrica do material moído é um importante parâmetro, pois, estabelece valores que influenciam diretamente sobre a eficiência do processo extrativo (SONAGLIO et al., 2007). O grau de divisão de pós é expresso em referência à abertura nominal da malha do tamis utilizado (Farmacopéia Brasileira, 1988).

Os resultados da avaliação granulométrica estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:** Análise granulométrica das folhas secas e moídas de *C. sylvestris*.

| Tamanho de malha (mm) | Amostra (g) |        |        |        |        | Média  |
|-----------------------|-------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       | 1           | 2      | 3      | 4      | 5      |        |
| <b>1,000</b>          | 0,045       | 0,010  | 0,018  | 0,046  | 0,049  | 0,034  |
| <b>0,840</b>          | 0,835       | 0,959  | 1,072  | 0,985  | 0,839  | 0,938  |
| <b>0,420</b>          | 13,928      | 13,868 | 14,137 | 13,880 | 13,790 | 13,921 |
| <b>0,177</b>          | 7,685       | 7,738  | 7,508  | 7,744  | 7,813  | 7,698  |
| <b>0,125</b>          | 0,980       | 0,927  | 0,882  | 1,060  | 1,119  | 0,994  |
| <b>Coletor</b>        | 1,109       | 1,248  | 0,965  | 1,038  | 1,091  | 1,090  |

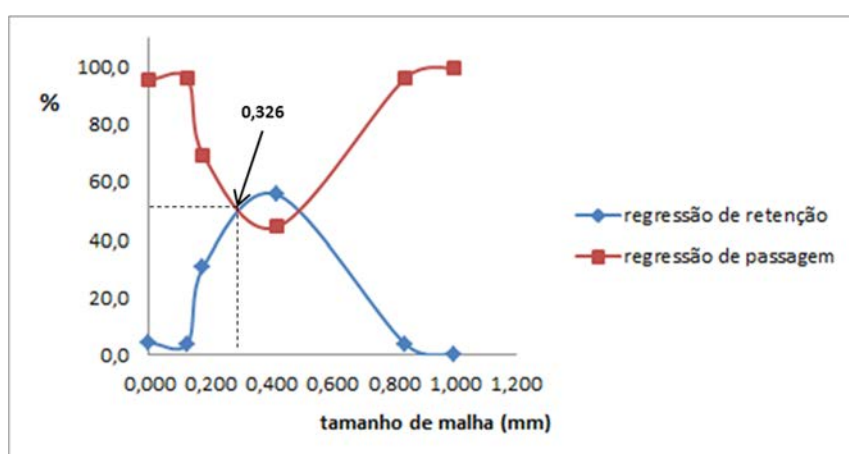
A análise dos resultados expressos na Tabela 3 é demonstrada na Figura 7, onde o diâmetro médio de partícula **0,326 mm** foi calculado através da equação a seguir:

$$\text{Equação (1)} \quad d = \frac{\sum(\%retida)(\text{tamanho médio})}{100},$$

onde, (d) diâmetro médio de partícula (ALLEN et al., 2007) e tamanho médio refere-se a abertura média das malhas.

O valor do diâmetro médio das partículas é determinado pelo ponto de encontro da curva de regressão de passagem com a curva de regressão de retenção (Figura 7).

**Figura 7:** Tamanho de partícula média das folhas secas e pulverizadas de *C. sylvestris*. Média de 5 determinações.



### 5.3 Obtenção do Extrato

O extrato foi obtido a partir de folhas pulverizadas de *C. sylvestris*. Ao se trabalhar com drogas vegetais, deve-se ter conhecimento das melhores condições que levarão a uma eficaz extração das substâncias. De acordo com o solvente empregado na extração determina-se a qualidade da solução extrativa (SIMÕES et al., 2007). No caso, utiliza-se um método já proposto baseado no trabalho de doutorado de Santos (2008), como descrito anteriormente no item 4.3. A massa de extrato seco obtida foi calculada baseada no ensaio de perda por dessecação do extrato concentrado e foi de 236,75 g. O rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal foi de **11,8 % (p/p)**, onde, comparado a resultados existentes na literatura (SANTOS, 2008 – 7,5% maceração à quente; SANTOS, 2001 - 6,5% sonicação; MORITA et al., 1991- 7,0% maceração à quente; ITOKAWA et al., 1990 - 20,4% maceração à quente), mostrou-se satisfatório. Este valor estimado de rendimento mostra-se coerente quando comparado a determinação da fração

extraível em etanol (**7,2 %; p/p**) apresentado no item 5.2.4, pois as condições de extração não foram as mesmas. Na primeira utilizamos aquecimento e o tempo de extração foi maior (40° C/ 7dias); no segundo caso, a extração ocorreu a frio pelo período de 24 h.

### **5.3.1 Fracionamento do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* por extração em fase sólida (EFS)**

Alguns métodos encontrados na literatura para o fracionamento de extratos de *C. sylvestris* são desvantajosos, pois apresentam muitas etapas, utilizam solventes clorados, além de apresentarem muitos interferentes nas frações obtidas (como clorofila e carotenóides) (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS, 2001). O método adaptado de SANTOS (2008) e TININIS (2006) possibilitou a otimização do fracionamento, sem as desvantagens citadas, obtendo-se frações de composição química distinta em apenas uma etapa.

No fracionamento do extrato etanólico de *C. sylvestris* foram obtidas as seguintes massas: EFSCs1= **0,773 g** (3,9%), EFSCs2= **5,936 g** (29,6%); EFSCs3= **3,123 g** (15,6%).

### **5.3.2 Análise cromatográfica do extrato etanólico EEtCs e frações EFSCs**

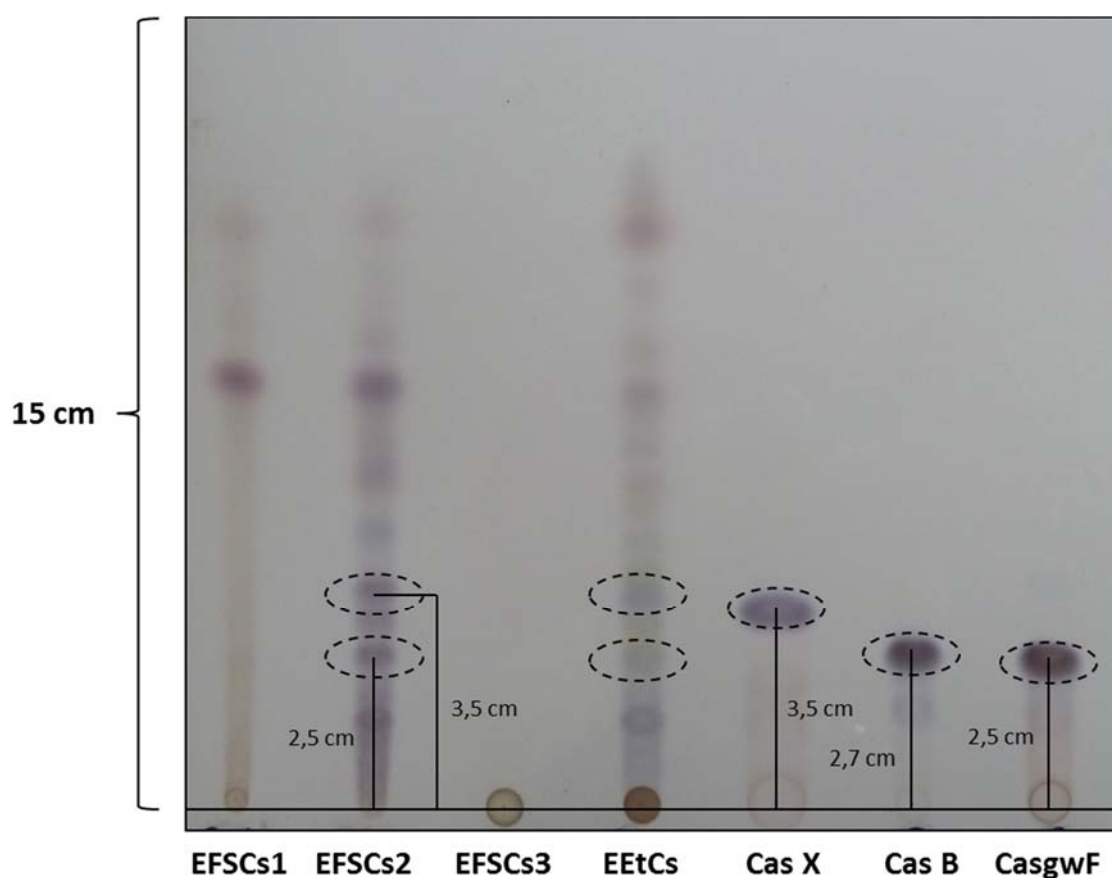
#### **5.3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A técnica de CCD separa e permite identificar as substâncias presentes no extrato vegetal e suas frações. As fases móvel e estacionária são selecionadas em função da planta estudada e tipo de extrato. A identificação se dá através da comparação dos valores dos  $R_f$  (fator de retenção: quociente entre a distância percorrida pela substância e a distância percorrida pela fase móvel) e coloração das manchas dos padrões (marcadores) e amostras aplicadas.

Na realização da análise foram aplicadas as seguintes amostras nesta respectiva ordem: fração EFSCs1, fração EFSCs2, fração EFSCs3, extrato etanólico (EEtCs), além dos padrões casearinas X, B e caseargrewiina F. As principais manchas foram marcadas (Figura 8), calculando-se os fatores de retenção ( $R_f$ ) através da equação:

$$\text{Equação (2)} \quad R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{distancia percorrida pelo fase móvel}}$$

**Figura 8:** Cromatoplaça (sílica gel) das frações **EFSCs1**, **2**, **3** e extrato etanólico (**EEtCs**) (5,0 mg/mL, metanol) e padrões de diterpenos: casearina X (**cas X**), B (**cas B**) e caseargrewiina F (**casg F**) (1,0 mg/mL, metanol).



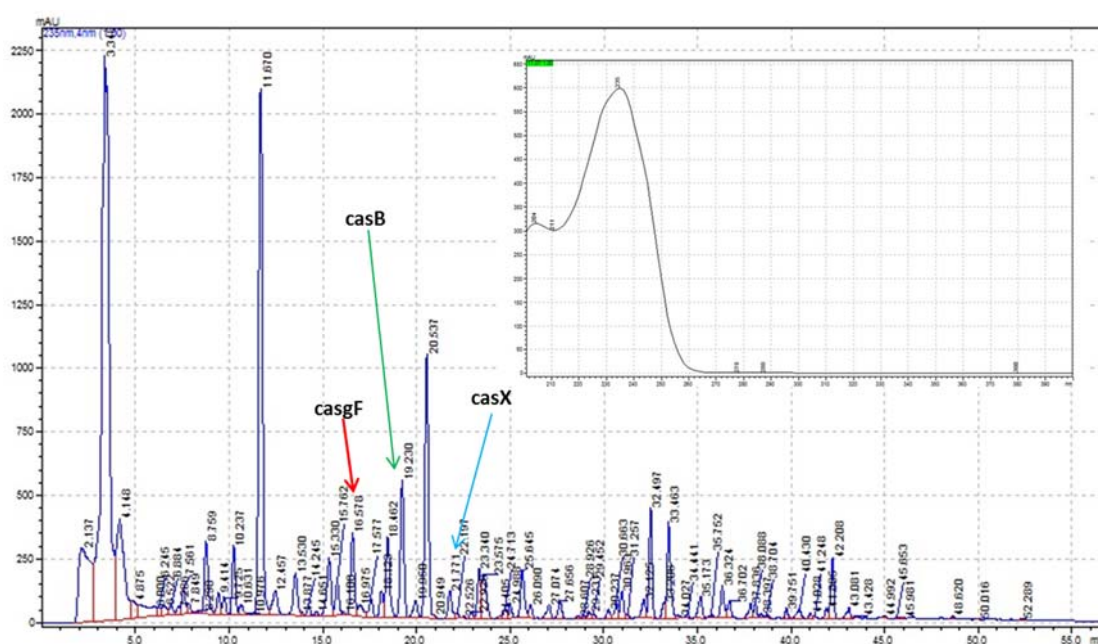
Os valores de  $R_f$  obtidos para casearina X, casearina B e caseargrewiina F foram, respectivamente, 0,23, 0,18 e 0,17. Analisando as amostras (Figura 8) observamos manchas na fração EFSCs2 e no extrato etanólico EEtCs com valores de  $R_f$  de 0,23 e 0,17, o que demonstra a presença dos diterpenos clerodânicos casearina X e caseargrewiina F na fração acetato de etila (EFSCs2) e no extrato etanólico. Nenhuma substância da fração metanólica (EFSCs3) eluiu nas condições de análise utilizadas. Estes resultados sugerem que os diterpenos clerodânicos do extrato etanólico foram concentrados na fração EFSCs2.

### 5.3.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

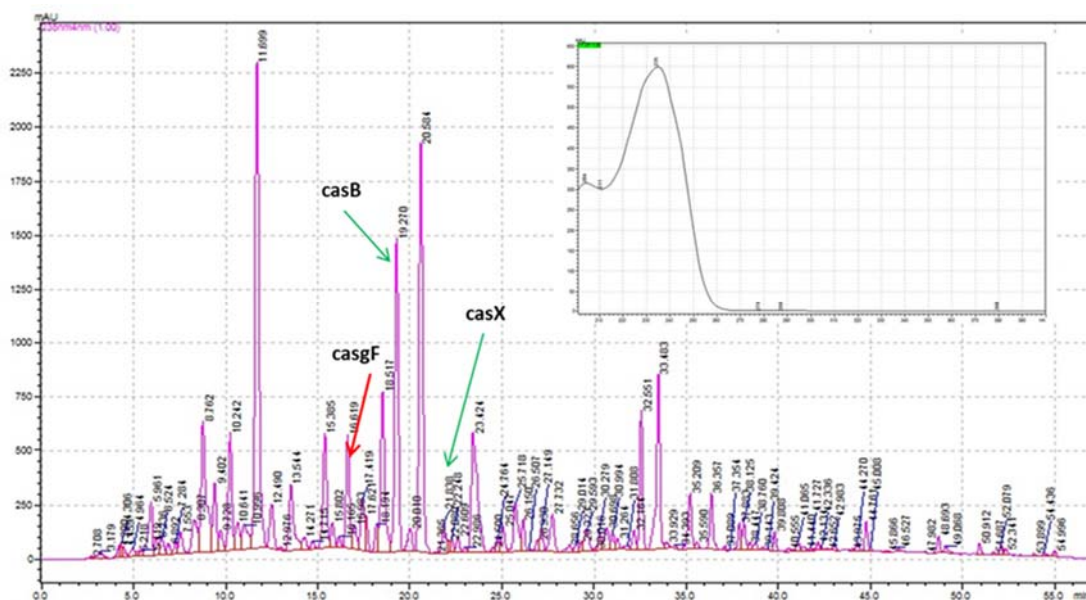
Os diterpenos do tipo das casearinas apresentam dois padrões diferentes de ligação dupla conjugada na cadeia lateral (C11-C16): C12(Z ou E)/C14 ou C13(16)/C14 e seus espectros no UV apresentam  $\lambda_{\max} = 221-228$  ou  $231-238$  nm,

respectivamente (CARVALHO et al., 2009; ESPÍNDOLA et al., 2004; ITOKAWA et al., 1990). Isto sugere que os picos com espectro no UV com  $\lambda_{\text{max}} = 221\text{-}228$  ou  $231\text{-}238$  nm são diterpenos do tipo das casearinas. Além disso, cinco diterpenos do tipo das casearinas foram isolados e identificados no extrato das folhas de *C. sylvestris* e seus picos apresentaram  $t_R$  na faixa de 10-30 min, nas mesmas condições de CLAE (SANTOS, 2008). Os diterpenos clerodâncos foram identificados através da análise dos espectros no UV obtidos por CLAE-DAD tanto no extrato EEtCs como na fração EFSCs2. Através destas análises realizou-se a identificação de padrões (casearina B, X e caseargrewiina F) pela comparação do tempo de retenção ( $t_R$ ) e espectros no UV. Nas figuras 9, 10, 11, 12 e 13 encontram-se os cromatogramas do EEtCs, EFSCs2, caseargrewiinaF, casearina X e casearina B, repectivamente.

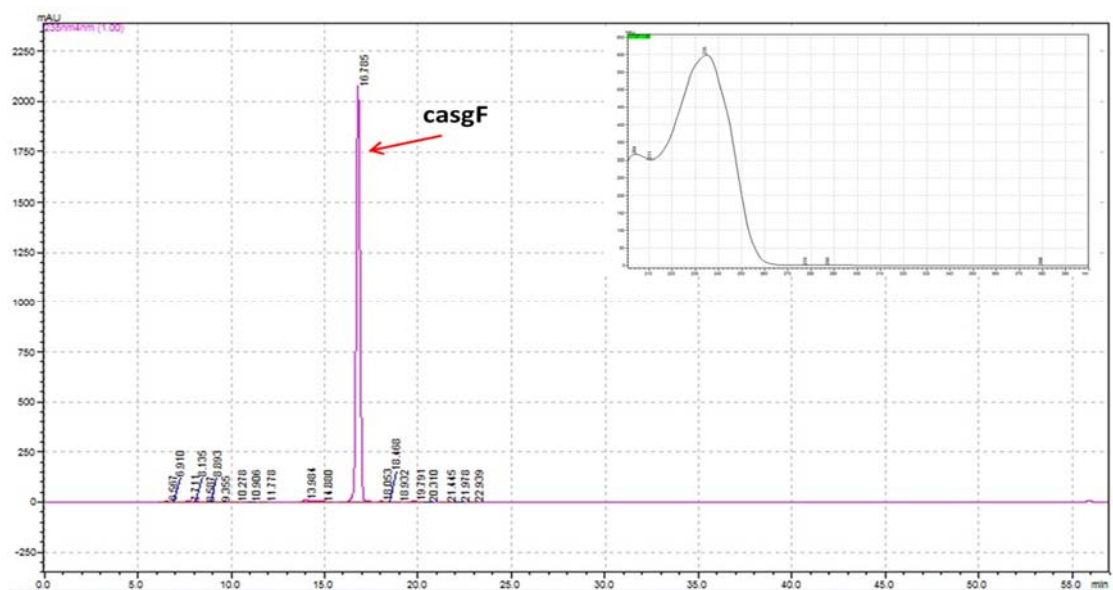
**Figura 9:** Cromatograma do EEtCs e espectro no UV da caseargrewiina F. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.



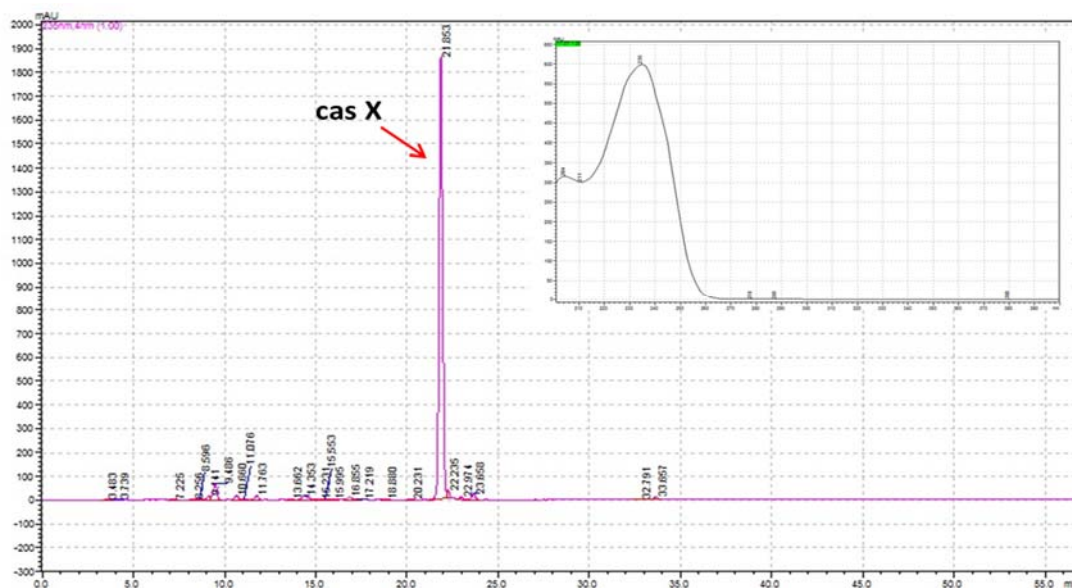
**Figura 10:** Cromatograma da fração EFSCs2 e espectro no UV da caseargrewiina F. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.



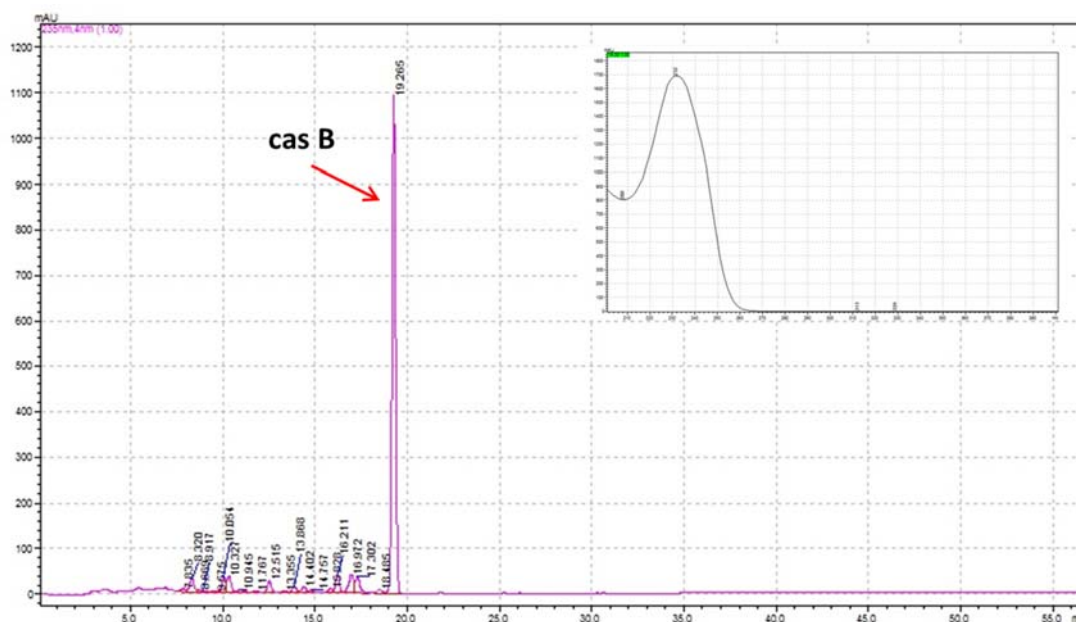
**Figura 11:** Cromatograma do padrão de caseargrewiina F e seu espectro no UV. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.



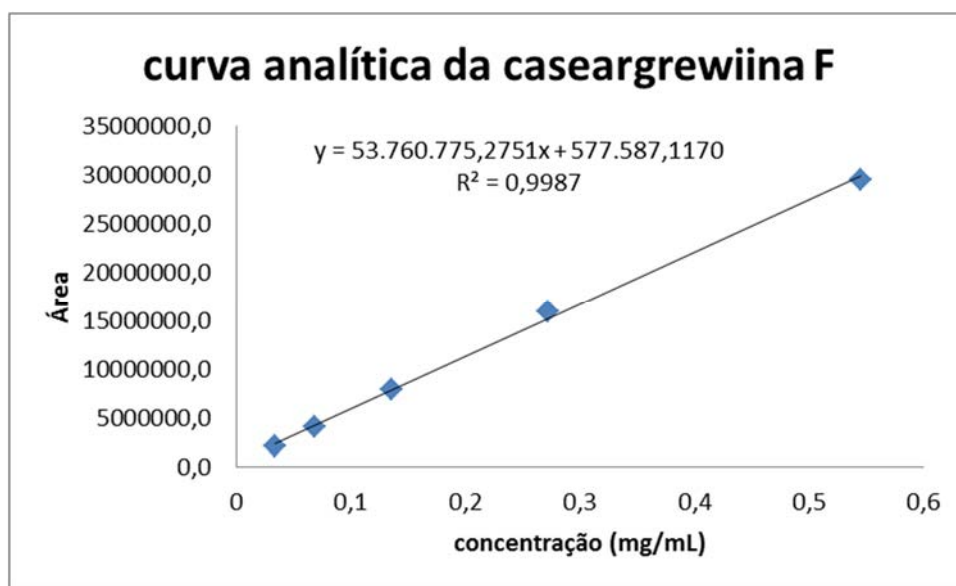
**Figura 12:** Cromatograma do padrão de casearina X e seu espectro no UV. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.



**Figura 13:** Cromatograma do padrão de casearina B e seu espectro no UV. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.



A curva analítica da caseargrewiina F (Figura 14) foi construída a partir de suas concentrações versus valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 4). As concentrações das soluções padrões de caseargrewiina F foram corrigidas considerando-se sua pureza média cromatográfica (97,2%).

**Figura 14:** Curva analítica para solução padrão de caseargrewiina F em metanol.

Equação (3): \_\_\_\_\_, onde  $r^2 = 0,9987$ .

**Tabela 4:** Dados das análises em CLAE-DAD da caseargrewiina F para a construção da curva analítica.

| Concentração<br>inicial (mg/mL) | $t_R^1$ (min) | Área dos picos <sup>1</sup> | Pureza <sup>1,2</sup> (%) | Concentração<br>corrigida <sup>3</sup><br>(mg/mL) |
|---------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|
| 0,035                           | 16,8          | 2090560,0                   | 97,1                      | 0,034                                             |
| 0,070                           | 17,4          | 4161704,5                   | 97,3                      | 0,068                                             |
| 0,140                           | 17,0          | 7910669,0                   | 97,3                      | 0,136                                             |
| 0,280                           | 16,7          | 15882679,0                  | 97,3                      | 0,272                                             |
| 0,560                           | 16,8          | 29559941,0                  | 97,4                      | 0,545                                             |

<sup>1</sup>média de 3 análises

<sup>2</sup>pureza cromatográfica calculada a partir da porcentagem relativa da área do pico da caseargrewiina F em relação à área total dos picos, para cada análise.

<sup>3</sup>concentração de caseargrewiina F calculada considerando-se o valor médio de sua pureza cromatográfica (97,2%).

A quantificação de diterpenos do tipo das casearinas em relação à casergrewiina F foi realizada considerando-se os picos dos cromatogramas com banda no espectro no UV semelhante à observada para estas substâncias (Figura 8), com  $\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235$  nm, sendo que não foram observadas bandas com  $\lambda_{\text{máx}} = 221\text{-}228$  nm. Devido à dificuldade em obterem-se padrões cromatográficos dos

diversos diterpenos clerodânicos em folhas de *C. sylvestris* (cerca de 30), um deles foi selecionado como marcador para quantificar os diterpenos do tipo das casearinas. Portanto, utilizamos a soma das áreas de todos os picos com uma banda com  $\lambda_{\text{máx}} = 231\text{-}235$  nm para o cálculo da concentração no extrato de diterpenos do tipo das casearinas. A partir da equação da reta (Equação 3) da curva analítica e dos dados obtidos da análise do extrato etanólico (EEtCs) e fração (EFSCs2) em triplicata (Tabela 5 e Figuras 9 e 10) calcularam-se as concentrações de caseargrewiina F e de diterpenos do tipo das casearinas expressos como caseargrewiina F no EEtCs e EFSCs2, cujos valores foram **27,4%** e **50,6%**, respectivamente. As porcentagens de caseargrewiina F calculada no EEtCs e na EFSCs2 foram **1,1** e **1,4** %, respectivamente.

**Tabela 5:** Dados obtidos na quantificação de diterpenos do tipo casearinas em relação à casergrewiina F no extrato etanólico EEtCs e fração EFSCs2.

| Amostra | Massa inicial (mg) | Área total <sup>1</sup> | % diterpenos (p/p) | Área <sup>1</sup> Casgw F | t <sub>R</sub> (min) <sup>1</sup> CasgwF | % CasgwF (p/p) |
|---------|--------------------|-------------------------|--------------------|---------------------------|------------------------------------------|----------------|
| EEtCs   | 7,3                | 106970025               | 27,4               | 4621870                   | 16,55                                    | 1,1            |
| EFSCs2  | 8,9                | 240274256               | 50,6               | 7183455                   | 16,61                                    | 1,4            |

<sup>1</sup>média de 3 análises (desvio padrão); área total de picos de diterpenos do tipo das casearinas

### 5.3.3 Fracionamento de EFSCs2 por CC de fase normal

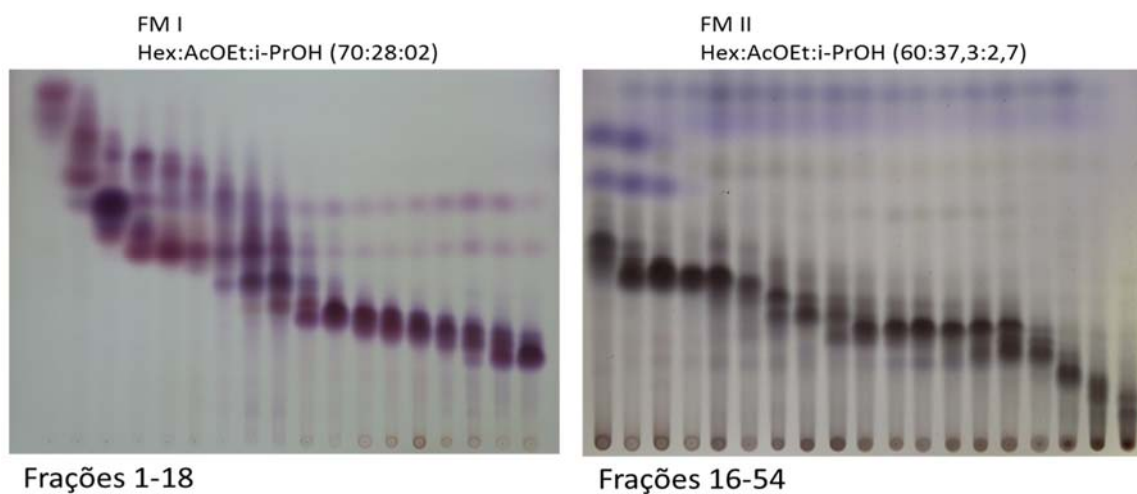
Todas as frações obtidas de EFSCs2 por CC de fase normal foram analisadas por CCD e reunidas segundo semelhança do perfil cromatográfico. O balanço das massas de cada fração está representado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Dados obtidos das massas de cada fração (mg) e suas respectivas porcentagens em EFSCs2.

| CCCs        | m (mg)        | %            |
|-------------|---------------|--------------|
| 1           | 137,3         | 3,43         |
| 2           | 93,4          | 2,34         |
| 3           | 262,5         | 6,56         |
| 4           | 42,7          | 1,07         |
| 5           | 44,8          | 1,12         |
| 6           | 36,2          | 0,91         |
| 7           | 101,2         | 2,53         |
| 8           | 229,8         | 5,75         |
| 9           | 138,4         | 3,46         |
| 10          | 105,0         | 2,63         |
| 11          | 145,4         | 3,64         |
| 12          | 112,0         | 2,80         |
| 13          | 91,8          | 2,30         |
| 14          | 74,6          | 1,87         |
| 15          | 60,6          | 1,52         |
| 16          | 61,8          | 1,55         |
| 17          | 69,6          | 1,74         |
| 18          | 94,5          | 2,36         |
| 19          | 97,4          | 2,44         |
| 20          | 78,2          | 1,96         |
| 21          | 61,2          | 1,53         |
| 22          | 44,0          | 1,10         |
| 23          | 36,0          | 0,90         |
| 24          | 38,4          | 0,96         |
| 25          | 31,3          | 0,78         |
| 26          | 32,6          | 0,82         |
| 27          | 45,4          | 1,14         |
| 28          | 41,5          | 1,04         |
| 29          | 43,9          | 1,10         |
| 30          | 41,9          | 1,05         |
| 31          | 33,8          | 0,85         |
| 32          | 39,4          | 0,99         |
| 33          | 43,6          | 1,09         |
| 34          | 52,4          | 1,31         |
| 35          | 56,3          | 1,41         |
| 36          | 72,4          | 1,81         |
| 37          | 81,5          | 2,04         |
| 38          | 64,3          | 1,61         |
| 39          | 57,0          | 1,43         |
| 40          | 60,5          | 1,51         |
| 41          | 67,4          | 1,69         |
| 42          | 62,6          | 1,57         |
| 43          | 50,6          | 1,27         |
| 44          | 42,2          | 1,06         |
| 45          | 44,3          | 1,11         |
| 46          | 48,5          | 1,21         |
| 47          | 46,5          | 1,16         |
| 48          | 154,9         | 3,87         |
| 49          | 39,3          | 0,98         |
| 50          | 34,2          | 0,86         |
| 51          | 29,4          | 0,74         |
| 52          | 26,4          | 0,66         |
| 53          | 134,5         | 3,36         |
| 54          | 79,0          | 1,97         |
| 55          | 28,2          | 0,71         |
| <b>Soma</b> | <b>3899,0</b> | <b>97,47</b> |

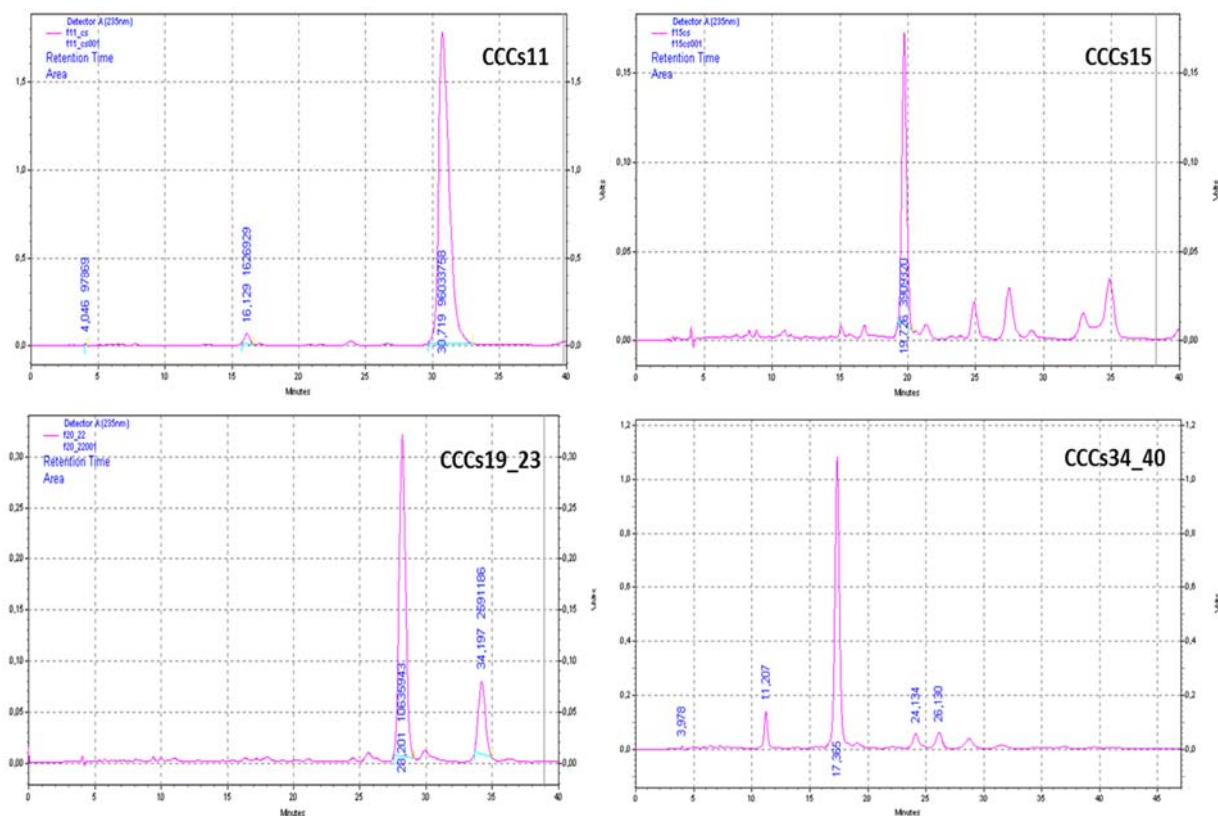
Nas condições de análise pré-estabelecidas, a comparação das cromatoplas das frações CCCs1-54 (Figura 15) verificou-se que as manchas apresentaram perfil cromatográfico simples (a maioria com 1 a 3 manchas principais).

**Figura 15:** Cromatoplaça (sílica gel) das frações CCCs1-54 em duas fases móveis distintas: CCCs1-18 (FM I: hexano:acetato de etila:isopropanol 70:28:02) e CCCs16-54 (FM II: hexano:acetato de etila:isopropanol 60:37,3:2,7).



A análise dos cromatogramas (Figuras 16) permitiu concluir que muitas destas frações constituem-se de misturas de 1 a 3 picos ou de substâncias semi-purificadas, mostrando-se adequadas para separação em CLAEprep.

**Figura 16:** Cromatogramas das frações CCCs nas condições descritas no item 4.4.3.



#### 5.3.4 Determinação estrutural da substância purificada CCCs11

Os dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  da fração CCCs11 (Tabela 7) foram coerentes com os obtidos para a casearina J por Morita et al. (1991). A casearina J foi obtida como um pó branco. Seu espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 31 sinais similares àqueles já relatados na literatura para outras casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2010). As multiplicidades de sinais dos carbonos foram determinadas com base na análise dos espectros DEPT 135 e 90. Todos os espectros de RMN obtidos são apresentados nos Anexos 4 a 17.

A banda de absorção com  $\lambda_{\text{max}}$  em 235 nm no espectro no UV (Anexo 1) é característica do dieno conjugado da cadeia lateral das casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2010), cuja presença foi confirmada pelos sinais observados na região olefínica do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostrando os acoplamentos *cis/trans* dos hidrogênios da ligação dupla terminal monosubstituída [ $\delta$  5,10 (*d*,  $J = 11,1$  Hz; H-15<sub>a</sub>), 5,25 (*d*,  $J = 17,2$  Hz; H-15<sub>b</sub>)] com o hidrogênio vicinal [ $\delta$  6,68 (*dd*,  $J = 17,2$  e 11,1 Hz; H-14)], além de outro sinal em  $\delta$  5,55 (*d*,  $J = 9,0$  Hz; H-12) que pôde ser atribuído ao hidrogênio da ligação dupla trissubstituída do dieno conjugado. A estrutura parcial formada pela cadeia lateral ligada em C-9 foi confirmada pelas correlações observadas no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-12 e H-11, C-13/C-16 e H-12, C-16 e H-14, C-13 e H-15, e C-13 e H-16 e, bem como pelas correlações do mapa de contornos COSY apresentadas na Tabela 7. A configuração *Z* da ligação dupla em C-12 foi determinada com base no efeito nuclear Overhauser (NOESY2D) observado entre H-16 [ $\delta$  1,73 (*sl*)] e H-12 [ $\delta$  5,55 (*d*;  $J = 9,0$  Hz)].

**Tabela 7:** Dados espectrométricos de RMN obtidos para a **casearina J** a 300 MHz para  $^1\text{H}$  e a 75 MHz para  $^{13}\text{C}$ , em piridina- $d_5$ .

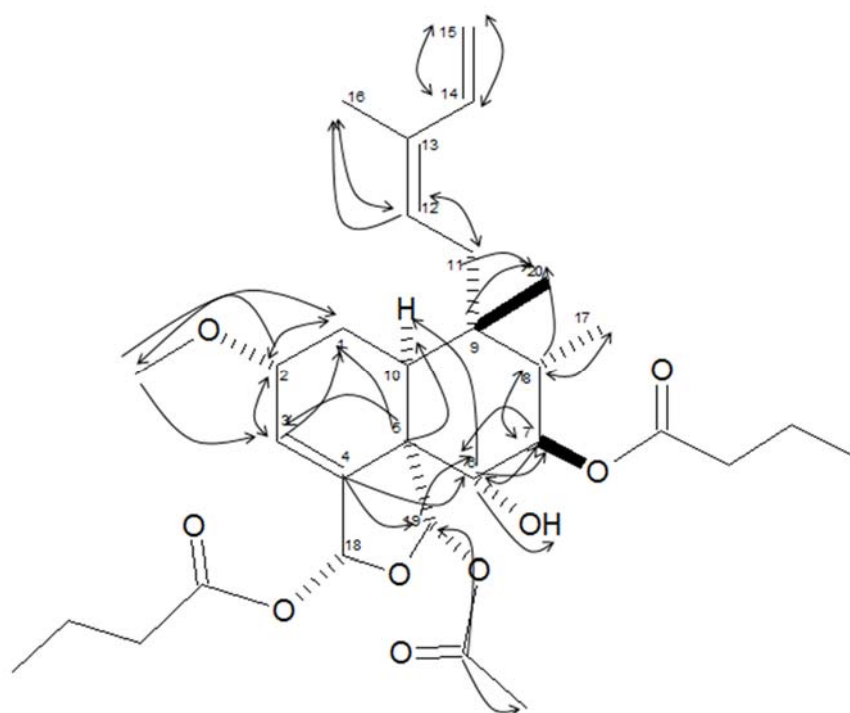
| C   | $\delta^{13}\text{C}^*$ | $\delta^1\text{H } J(\text{Hz})^*$           | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H } J(\text{Hz})$                      | HETCOR-LR        | COSY               | NOESY                    |
|-----|-------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------|------------------|--------------------|--------------------------|
| 1   | 25,6                    | -----                                        | 26,7 <i>t</i>         | 2,2 <i>m</i> ( $\alpha$ )<br>2,0 <i>m</i> ( $\beta$ ) | -----            | 3,98               | 2,78; 3,98<br>3,98; 4,26 |
| 2   | 72,6                    | 3,90 <i>sl</i>                               | 73,4 <i>d</i>         | 3,98 <i>tl</i> (4,2)                                  | 2,00; 3,40       | 2,00; 6,38         | 2,0; 2,2; 3,40; 6,38     |
| 3   | 123,5                   | 6,08 <i>dl</i> (3,9)                         | 123,7 <i>d</i>        | 6,38 <i>dl</i> (3,3)                                  | 2,20             | 3,98               | 3,40; 3,98; 7,42         |
| 4   | 142,9                   | -----                                        | 144,6 <i>s</i>        | -----                                                 | 4,26; 7,24       | -----              | -----                    |
| 5   | 53,8                    | -----                                        | 55,0 <i>s</i>         | -----                                                 | 2,20; 2,78; 6,38 | -----              | -----                    |
| 6   | 75,2                    | 3,65 <i>d</i> (11,0)                         | 74,8 <i>d</i>         | 4,26 <i>d</i> (10,5)                                  | 2,78; 5,64; 8,80 | 5,64               | 2,0; 8,80                |
| 7   | 75,4                    | 4,98 <i>t</i> (11,0)                         | 76,5 <i>d</i>         | 5,64 <i>t</i> (10,5)                                  | 4,26             | 2,05; 4,26         | 1,92; 7,24               |
| 8   | 41,1                    | -----                                        | 41,9 <i>d</i>         | 2,05 <i>m</i>                                         | 0,97             | 1,04; 5,64         | -----                    |
| 9   | 39,4                    | -----                                        | 40,3 <i>s</i>         | -----                                                 | 0,97             | -----              | -----                    |
| 10  | 35,8                    | 2,22 <i>dd</i> (2,3;13,3)                    | 37,1 <i>d</i>         | 2,78 <i>dd</i> (13,2; 3,0)                            | -----            | -----              | 2,0; 2,2; 3,40; 5,55     |
| 11  | 30,3                    | 2,51 <i>dd</i> (16,2; 9,1)                   | 31,1 <i>t</i>         | 1,98 <i>m</i><br>2,67 <i>dd</i> (16,2; 9,0)           | 0,97             | 2,67<br>1,98; 5,55 | -----<br>1,04            |
| 12  | 125,8                   | 5,28 <i>dl</i> (5,2)                         | 127,7 <i>d</i>        | 5,55 <i>d</i> (9,0)                                   | 1,73             | 1,73; 2,67         | 1,73; 2,78               |
| 13  | 133,9                   | -----                                        | 135,7 <i>s</i>        | -----                                                 | -----            | -----              | -----                    |
| 14  | 133,4                   | 6,62 <i>dd</i> (11,0;17,1)                   | 134,4 <i>d</i>        | 6,68 <i>dd</i> (17,2; 11,0)                           | -----            | 5,10; 5,25         | 5,10                     |
| 15  | 114,6                   | 5,11 <i>d</i> (11,0)<br>5,20 <i>d</i> (17,1) | 114,9 <i>t</i>        | 5,10 <i>d</i> (11,1)<br>5,25 <i>d</i> (17,2)          | -----            | 6,68               | 6,68<br>1,73             |
| 16  | 20,2                    | 1,79 <i>sl</i>                               | 20,6 <i>q</i>         | 1,73 <i>sl</i>                                        | -----            | 5,55               | 5,25; 5,55               |
| 17  | 11,1                    | 0,92 <i>d</i> (7,2)                          | 11,9 <i>q</i>         | 1,04 <i>d</i> (6,9)                                   | 0,97             | 2,05               | 2,67; 3,40               |
| 18  | 95,6                    | 6,73 <i>t</i> (1,7)                          | 97,3 <i>d</i>         | 7,42 <i>t</i> (1,6)                                   | -----            | -----              | 6,38                     |
| 19  | 97,5                    | 6,56 <i>s</i>                                | 99,3 <i>d</i>         | 7,24 <i>sl</i>                                        | 4,26             | -----              | 5,64                     |
| 20  | 25,4                    | 0,87 <i>s</i>                                | 26,1 <i>q</i>         | 0,97 <i>s</i>                                         | -----            | -----              | -----                    |
| OMe | 57,0                    | 3,43 <i>s</i>                                | 57,1 <i>q</i>         | 3,40 <i>s</i>                                         | 2,20; 6,38       | -----              | 1,04; 2,78; 3,98; 6,38   |
| OAc | 21,3                    | 1,98 <i>s</i>                                | 22,0 <i>q</i>         | 1,92 <i>s</i>                                         | -----            | -----              | 1,04; 5,55; 7,24; 8,80   |
| OAc | 169,0                   | -----                                        | 169,9 <i>s</i>        | -----                                                 | 1,92; 7,24       | -----              | -----                    |
| OBu | 13,5                    | 0,94 <i>t</i> (7,4)                          | 14,0 <i>q</i>         | 0,83 <i>t</i> (7,5)                                   | -----            | 1,60; 2,35         | 1,60; 2,35               |
| OBu | 13,7                    | 0,96 <i>t</i> (7,4)                          | 14,3 <i>q</i>         | 0,89 <i>t</i> (7,5)                                   | -----            | 1,60; 2,35         | 1,60; 2,35               |
| OBu | 18,3                    | -----                                        | 19,0 <i>t</i>         | 1,60 <i>m</i>                                         | -----            | 0,83;0,89;<br>2,35 | 0,83/0,89; 2,35          |
| OBu | 18,6                    | -----                                        | 19,3 <i>t</i>         | 1,60 <i>m</i>                                         | -----            | 0,83;0,89;<br>2,35 | 0,83/0,89; 2,35          |
| OBu | 36,3                    | -----                                        | 36,9 <i>t</i>         | 2,35 <i>m</i>                                         | -----            | 0,83;0,89;<br>1,60 | 0,83/8,89; 1,60          |
| OBu | 36,4                    | -----                                        | 37,0 <i>t</i>         | 2,35 <i>m</i>                                         | -----            | 0,83;0,89;<br>1,60 | 0,83/8,89; 1,60          |
| OBu | 172,8                   | -----                                        | 173,6 <i>s</i>        | -----                                                 | -----            | -----              | -----                    |
| OBu | 174,3                   | -----                                        | 173,8 <i>s</i>        | -----                                                 | -----            | -----              | -----                    |
| OH  | -----                   | -----                                        | -----                 | 8,80 <i>s</i>                                         | -----            | -----              | 1,92; 4,26               |

\*Dados de RMN da casearina J obtidos em  $\text{CDCl}_3$  à 400e 100 MHz, respectivamente para  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (MORITA et al., 1991).

A estrutura decalínica (anéis A e B, C-1 a C-10) também foi confirmada a partir de correlações observadas nos mapas de contorno HETCOR-LR e COSY (Tabela 7 e Figura 17), além da comparação com dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura (MORITA et al., 1991). Outro sinal de hidrogênio olefínico em  $\delta$  6,38 (*dl*,  $J = 3,3$  Hz; H-3) foi atribuído à ligação dupla em C-3 ( $\delta$  123,7 *d*), também característica das casearinas (CARVALHO et al., 1998; ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SANTOS et al., 2007). Na região de menor frequência de absorção dos espectros de

RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135, 6 sinais foram atribuídos a metilas, sendo: 2 do anel decalínico, nas posições 8 [ $\delta$ 11,9 (*q*; C-17)] e 9 [ $\delta$ 26,1 (*q*; C-20)]; 1 da cadeia lateral [ $\delta$  20,6 (*q*; C-16)]; 2 dos grupos butanoato [ $\delta$  14,0 (*q*) e 14,3 (*q*)]; e 1 do grupo acetato [ $\delta$ 22,0 (*q*)].

**Figura 17:** Estrutura química da casearina J e principais correlações observadas nos mapas de contornos COSY (setas duplas) e HETCOR LR (setas simples).



Os sinais de carbonos metínicos oxigenados em  $\delta$ 97,3 (*d*; C-18) e 99,3 (*d*; C-19), além de 2 hidrogênios em  $\delta$ 7,24 (*sl*; H-19) e 7,42 (*t*,  $J = 1,6$  Hz; H-18) indicaram a existência do sistema diacetálico no anel C. Os sinais nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$ 169,9 (*s*), 173,6 (*s*) e 173,8 (*s*) sugerem a presença de 1 grupo acetato e 2 grupos butanoato na estrutura química (Tabela 7). A correlação observada no mapa de contornos HETCOR-LR (Figura 17) entre H-19 [ $\delta$ 7,24 (*sl*; H-19)] e a carbonila do grupo acetato [ $\delta$  169,9 (*s*)] definiu a posição deste substituinte. Os sinais nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  em  $\delta$ 74,8 (*d*, C-6) e  $\delta$ 4,26 (*d*,  $J = 10,5$  Hz; H-6), respectivamente, indicaram a presença de um grupo hidroximetínico na molécula, sendo a presença da hidroxila ligada a C-6 confirmada pelas correlações observadas nos mapas de contornos HETCOR-LR, entre C-6 [ $\delta$  74,8 (*d*)] e o hidrogênio da hidroxila [ $\delta$  8,80 (*s*)], e COSY entre H-6 [ $\delta$  4,26 (*d*,  $J = 10,5$  Hz)] e o hidrogênio da

hidroxila [ $\delta$  8,80 (s)] (Tabela 7 e Figura 17). Os sinais observados nos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  em  $\delta$  57,1 (q) e 3,40 (s), respectivamente, foram atribuídos a uma metoxila ligada a C-2, conforme confirmado pela correlação observada no mapa de contornos HETCOR-LR entre C-2 [ $\delta$  73,4 (d)] e os hidrogênios da metoxila [ $\delta$  3,40 (s)]. Os grupos butanoatos foram atribuídos aos carbonos metínicos oxigenados restantes com sinais em  $\delta$  97,3 (d; C-18) e  $\delta$  76,5 (d; C-7). As correlações observadas nos mapas de contornos HETCOR-LR e COSY permitiram a inequívoca atribuição dos grupos substituintes para a casearina J.

A estereoquímica relativa dos 8 centros estereogênicos foi determinada a partir dos valores de  $\delta$  obtidos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , dos valores de  $J$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) e das correlações observadas no experimento de NOESY2D (Tabela 7). A configuração *cis* na junção dos anéis A e B pôde ser deduzida a partir do valor de  $\delta$  26,1 observado para a metila em C-20, conforme descrito na literatura (KHAN et al., 1990b; MANABE; NISHINO, 1986; VIJAYAKUMAR et al., 2002). Os deslocamentos químicos de C-5 e C-10 ( $\delta$  55,0 e 37,1, respectivamente) foram semelhantes aos descritos para as casearinas e compostos análogos (ITOKAWA et al., 1990; MORITA et al., 1991; SHEN et al., 2004a; SHEN et al., 2004b). Além disso, os valores de  $J = 3,0$  e  $13,2$  Hz para  $\delta$  2,78 (*dd*) sugerem que H-10 possui orientação  $\alpha$ -axial. Finalmente, o efeito nuclear Overhauser (NOESY2D) entre H-10 e H-12 indicou a mesma orientação  $\alpha$  para a cadeia lateral em C-9.

Em geral, diterpenos *cis*-clerodânicos sem substituintes nas posições C-7, C-8, C-10, C-11 e C-12 apresentam valores para Me-17 e Me-20 com relação *trans* em torno de  $\delta$  15,0 e 26,0, respectivamente (ETSE et al., 1989; KANOKMEDHAKUL et al., 2005; NOGUEIRA et al., 2001), enquanto para a configuração *cis* os valores observados são de cerca de  $\delta$  16,0 e 18,0, respectivamente (BILLET et al., 1976; BLÄS; ZAPP; BECKER, 2004; GEIS et al., 1999; SANTOS et al., 2007). As casearinas já isoladas apresentaram valores de cerca de  $\delta$  11,0 e 26,0 para C-17 e C-20 e a absorção em menor frequência observada para C-17 pode ser explicada pelo efeito  $\gamma$  de blindagem produzido pelo substituinte oxigenado presente em C-7 sobre a metila C-17. No caso da casearina J, as absorções em  $\delta$  16,1 e 25,5 (Me-17 e Me-20, respectivamente) indicam relação *trans* entre estas metilas.

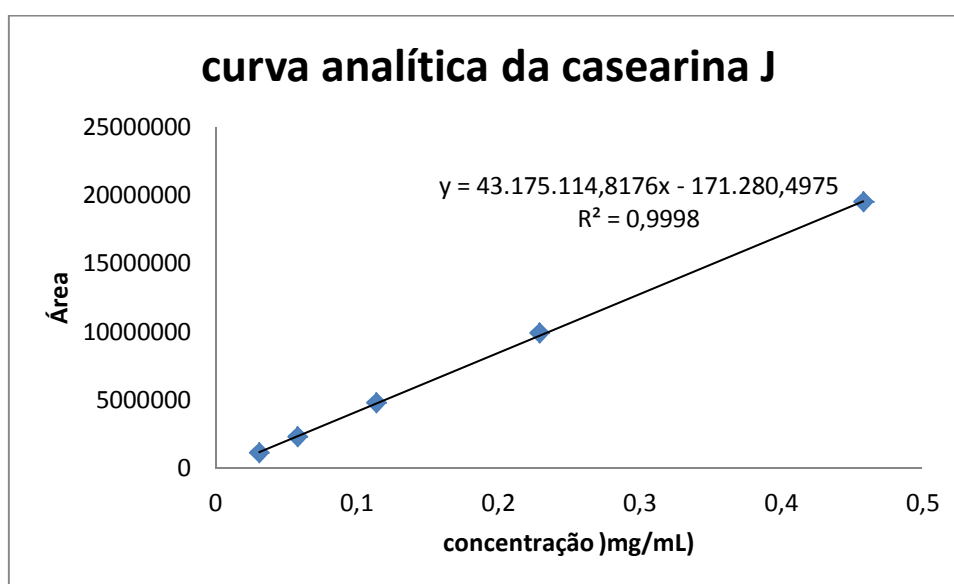
O valor de  $\delta$  73,4 para o carbono oximetínico C-2 e a constante de acoplamento observada para o hidrogênio alílico H-2 [ $\delta$  3,98 (*tl*,  $J = 4,2$  Hz)] são

consistentes com a orientação  $\beta$ -pseudoequatorial de H-2 (ESPÍNDOLA et al., 2004; KANOKMEDHAKUL et al., 2005). Adicionalmente, o efeito nuclear Overhauser observado (NOESY2D) entre H-2 e H-1 $_{\beta}$  [ $\delta$  2,0 (m)], e H-6 e H-1 $_{\beta}$  sugere que estes hidrogênios possuem mesma orientação ( $\beta$ ). Segundo Guittet et al. (1988) nos diterpenos do tipo das casearinas o acoplamento homoolílico ( $^5J$ ) entre H-18 [ $\delta$  7,42 (t,  $J = 1,6$  Hz)] e H-2 necessita de certa sobreposição dos orbitais  $\pi$  da ligação dupla com os orbitais 1s dos átomos de H, o que indica orientação  $\beta$  para H-18; sendo assim, o grupo butanoato ligado a C-18 possui orientação  $\alpha$ . Finalmente, o efeito nuclear Overhauser entre H-19 e H-7 confirmou a orientação  $\alpha$  para o grupo acetato em C-19.

### 5.3.5 Quantificação da casearina J no extrato EEtCs

A curva analítica da casearina J (Figura 18) foi construída a partir de suas concentrações versus valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 8). As concentrações das soluções padrões foram corrigidas considerando-se sua pureza média cromatográfica (91,5%), que foi calculada a partir da área do pico da casearina J no cromatograma em relação à área total dos picos (Anexo 2).

**Figura 18:** Curva analítica para solução padrão de casearina J em metanol.



**Tabela 8:** Dados das análises em CLAE-UV da casearina J para a construção da curva analítica.

| Concentração inicial (mg/mL) | t <sub>R</sub> <sup>1</sup> (min) | Área dos picos <sup>1</sup> | Concentração corrigida <sup>2</sup> (mg/mL) |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------------|
| 0,034                        | 19,63                             | 1104895,7                   | 0,031                                       |
| 0,063                        | 19,46                             | 2277595,7                   | 0,058                                       |
| 0,125                        | 19,56                             | 4777521,5                   | 0,114                                       |
| 0,250                        | 19,67                             | 9888138,0                   | 0,229                                       |
| 0,500                        | 19,64                             | 19521297,0                  | 0,458                                       |

<sup>1</sup>média de 3 análises;<sup>2</sup>concentração de casearina J calculada considerando-se o valor médio de sua pureza cromatográfica (91,5%).

A média dos valores das áreas dos picos com t<sub>R</sub> igual ao da casearina J no cromatograma do extrato EEtCs (Anexo3) aplicada na equação do gráfico (Figura 18), forneceu um valor de **2,35%** (p/p) de casearina J no extrato analisado (Tabela 9).

**Tabela 9:** Dados obtidos na quantificação da casearina J no extrato EEtCs.

| Amostra | Massa inicial (mg) | t <sub>R</sub> (min) casearina J | Área <sup>1</sup> | % casearina J (p/p) |
|---------|--------------------|----------------------------------|-------------------|---------------------|
| EEtCs   | 6,25               | 19,53                            | 6186020,2         | 2,35                |

<sup>1</sup>média de 3 análises.

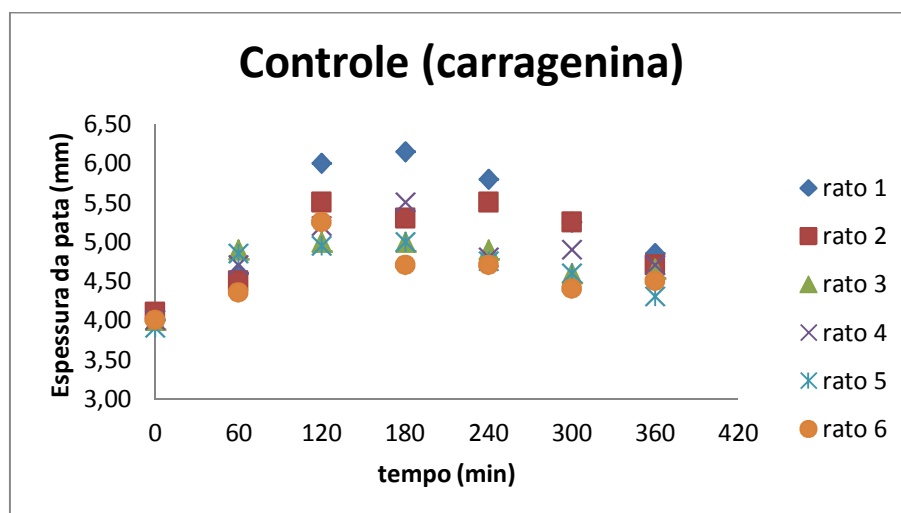
## 5.4 Ensaios Biológicos

### 5.4.1 Avaliação da atividade anti-inflamatória aguda do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *C. sylvestris* utilizando o modelo de edema de pata (baseado em WINTER et al., 1962)

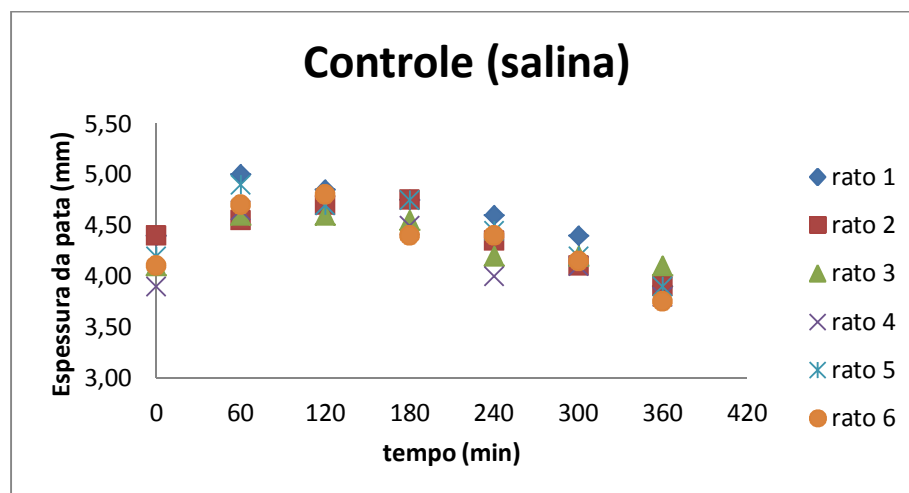
Em uma primeira análise exploratória das medidas da espessura das patas pudemos observar, ao longo do tempo, a formação do exsudato inflamatório das mesmas em todos os animais do grupo controle carragenina (n= 6) através de uma análise longitudinal dos dados. A injeção subplantar de carragenina nas patas direitas dos ratos causou edema significativo quando comparada ao t=0 e aos animais que receberam somente injeção subplantar de solução salina (Figura 19) da 1<sup>a</sup> até a 5<sup>a</sup> hora. Por outro lado, todos os animais do grupo controle salina que

receberam o mesmo volume de solução salina (Figura 20) não apresentaram inchaço significativo.

**Figura 19:** Análise longitudinal do grupo controle que recebeu injeção subplantar de solução de carragenina (0,1 mL/pata).

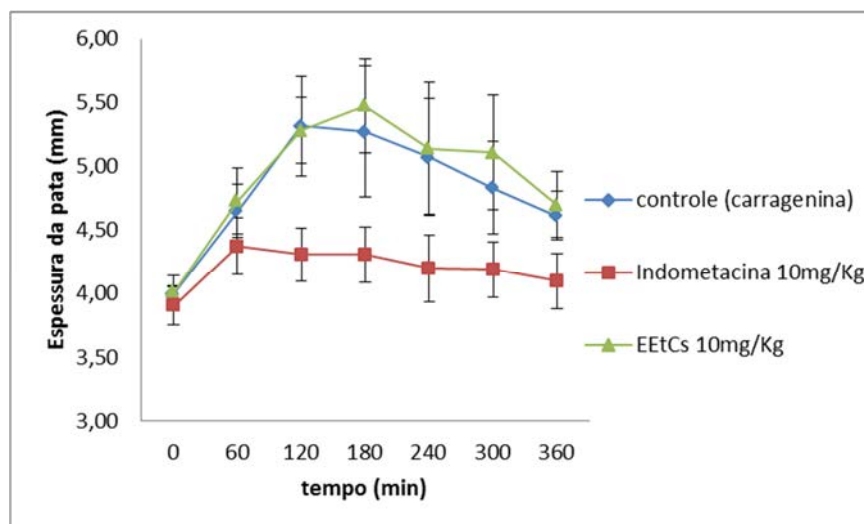


**Figura 20:** Análise longitudinal do grupo controle que recebeu injeção subplantar de solução salina (0,1 mL/pata).

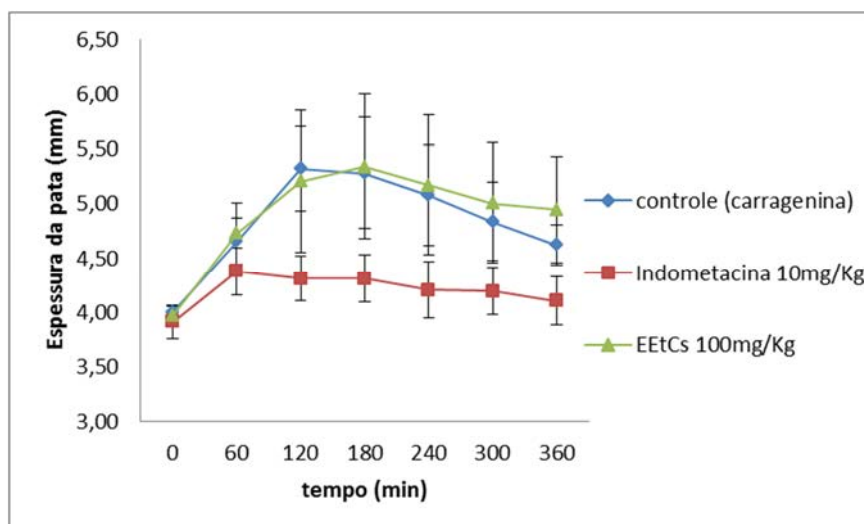


A seguir as Figuras 21 e 22 apresentam duas diferentes doses de extrato que foram testadas: EEtCs 10 e 100mg/Kg. Porém, nenhuma delas apresentou significativa redução da inflamação quando comparadas ao AINE de referência, Indometacina (10mg/Kg) e ao grupo controle (carragenina).

**Figura 21:** Efeito da administração de EEtCs (10mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



**Figura 22:** Efeito da administração de EEtCs (100mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



Os valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) estão expressos na Tabela 10 como média  $\pm$  erro padrão.

**Tabela 10:** Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média  $\pm$  erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, EEtCs 10 e 100mg/Kg.

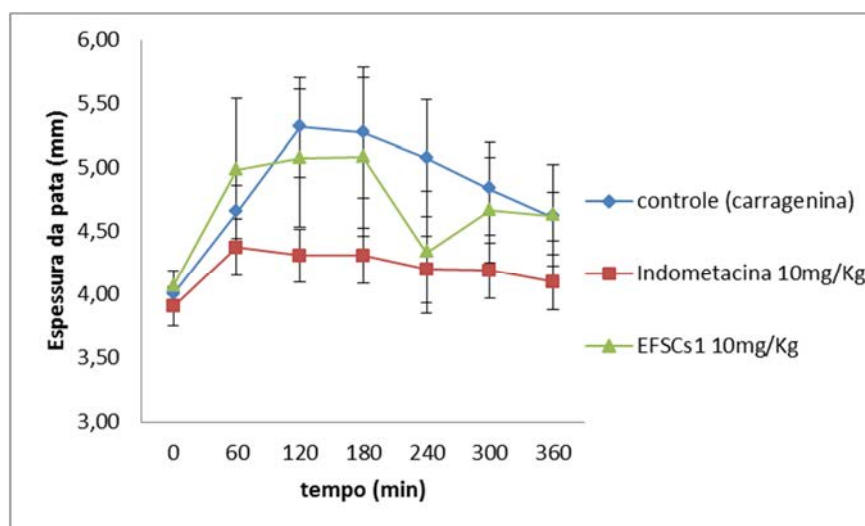
| Espessura média da pata (mm) $\pm$ Erro Padrão |                      |                      |                 |                 |
|------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|-----------------|
| Tempo (min)                                    | Controle carragenina | Indometacina 10mg/Kg | EEtCs 10mg/Kg   | EEtCs1 100mg/Kg |
| 0                                              | 4,00 $\pm$ 0,06      | 3,91 $\pm$ 0,15 *    | 4,02 $\pm$ 0,13 | 3,97 $\pm$ 0,08 |
| 60                                             | 4,65 $\pm$ 0,21      | 4,38 $\pm$ 0,22 *    | 4,73 $\pm$ 0,26 | 4,73 $\pm$ 0,28 |
| 120                                            | 5,32 $\pm$ 0,39      | 4,31 $\pm$ 0,21 *    | 5,28 $\pm$ 0,26 | 5,20 $\pm$ 0,65 |
| 180                                            | 5,28 $\pm$ 0,51      | 4,31 $\pm$ 0,22 *    | 5,48 $\pm$ 0,37 | 5,33 $\pm$ 0,66 |
| 240                                            | 5,08 $\pm$ 0,46      | 4,20 $\pm$ 0,26 *    | 5,14 $\pm$ 0,52 | 5,17 $\pm$ 0,64 |
| 300                                            | 4,83 $\pm$ 0,36      | 4,19 $\pm$ 0,22 *    | 5,11 $\pm$ 0,45 | 5,00 $\pm$ 0,55 |
| 360                                            | 4,62 $\pm$ 0,19      | 4,10 $\pm$ 0,22 *    | 4,70 $\pm$ 0,26 | 4,94 $\pm$ 0,49 |

\*valores significativos para  $p < 0,05$  em relação ao controle (carragenina).

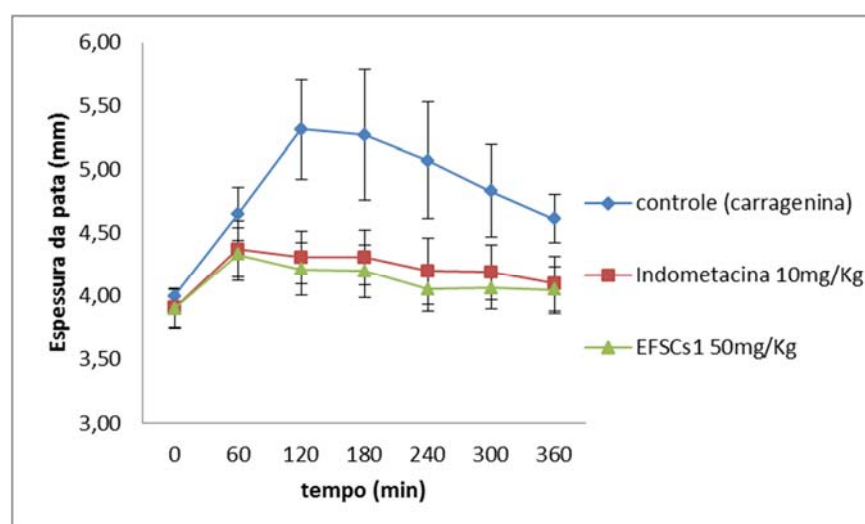
As mesmas comparações foram realizadas em relação aos grupos EFSCs1 e EFSCs2 (10 e 50mg/Kg) (Figuras 23, 24, 25 e 26); CasgwF e CasB nas doses de 0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg (Figuras 27, 28, 29, 30, 31 e 32).

A seguir estão os gráficos referentes à avaliação anti-inflamatória realizada em animais dos grupos tratados com EFSCs1 nas doses de 10 e 50mg/Kg, respectivamente.

**Figura 23:** Efeito da administração de EFSCs1 (10mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



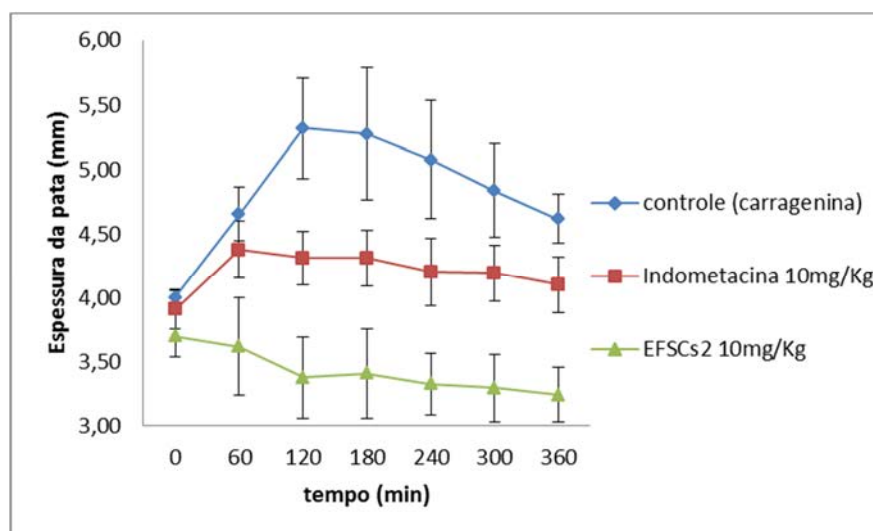
**Figura 24:** Efeito da administração de EFSCs1 (50mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



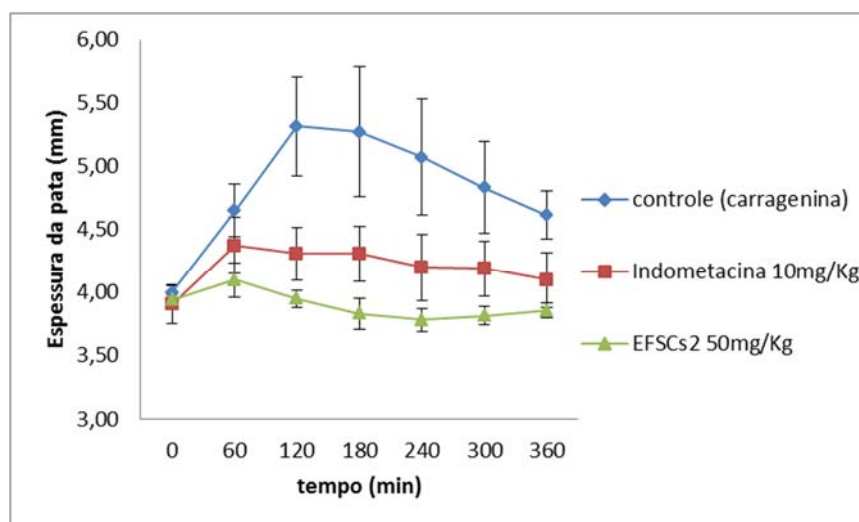
A fração EFSCs1 10mg/Kg (Figura 23) não apresentou resultados significativos em relação a diminuição do exsudato inflamatório quando comparada a ação anti-inflamatória da indometacina 10mg/Kg e ao controle (carragenina), mas

para EFSCs1 50mg/Kg (Figura 24) os valores apresentados foram estatisticamente iguais a ação anti-inflamatória apresentada pelo fármaco padrão.

**Figura 25:** Efeito da administração de EFSCs2 (10mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



**Figura 26:** Efeito da administração de EFSCs2 (50mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



Ao contrário do que nos revelou as doses testadas para o extrato e fração EFSCs1 10mg/Kg, a fração EFSCs2 exibiu atividade anti-inflamatória estatisticamente semelhante ao fármaco padrão, indometacina (Figuras 25 e 26). Os estudos revelam também que não há diferença estatística entre as doses testadas de EFSCs2 (10 e 50mg/Kg) com relação a diminuição do inchaço das patas. Mas, quando comparadas ao grupo controle (carragenina), os mesmos apresentam diferença estatística (Tabela 11).

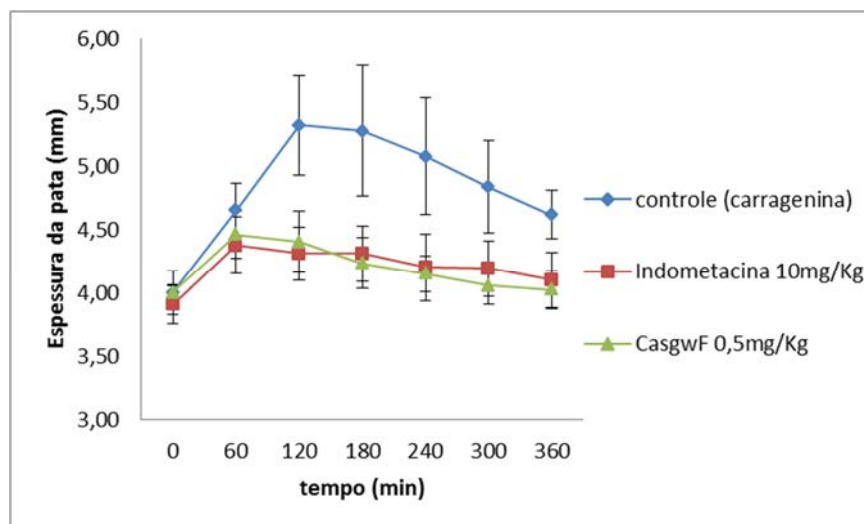
**Tabela 11:** Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média  $\pm$  erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, frações EFSCs1 e EFSCs2 10 e 50mg/Kg, respectivamente.

| Espessura média da pata (mm) $\pm$ Erro Padrão |                      |                      |                 |                  |                  |                  |
|------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|
| Tempo (min)                                    | Controle carragenina | Indometacina 10mg/Kg | EFSCs1 10mg/Kg  | EFSCs1 50mg/Kg   | EFSCs2 10mg/Kg   | EFSCs2 50mg/Kg   |
| 0                                              | 4,00 $\pm$ 0,06      | 3,91 $\pm$ 0,15 *    | 4,07 $\pm$ 0,12 | 3,90 $\pm$ 0,15* | 3,70 $\pm$ 0,16* | 3,94 $\pm$ 0,04* |
| 60                                             | 4,65 $\pm$ 0,21      | 4,38 $\pm$ 0,22 *    | 4,98 $\pm$ 0,56 | 4,33 $\pm$ 0,21* | 3,62 $\pm$ 0,38* | 4,10 $\pm$ 0,14* |
| 120                                            | 5,32 $\pm$ 0,39      | 4,31 $\pm$ 0,21 *    | 5,08 $\pm$ 0,54 | 4,22 $\pm$ 0,21* | 3,38 $\pm$ 0,32* | 3,95 $\pm$ 0,07* |
| 180                                            | 5,28 $\pm$ 0,51      | 4,31 $\pm$ 0,22 *    | 5,08 $\pm$ 0,62 | 4,20 $\pm$ 0,21* | 3,41 $\pm$ 0,35* | 3,83 $\pm$ 0,12* |
| 240                                            | 5,08 $\pm$ 0,46      | 4,20 $\pm$ 0,26 *    | 4,33 $\pm$ 0,48 | 4,06 0,18*       | 3,33 $\pm$ 0,24* | 3,78 $\pm$ 0,09* |
| 300                                            | 4,83 $\pm$ 0,36      | 4,19 $\pm$ 0,22 *    | 4,67 $\pm$ 0,41 | 4,07 $\pm$ 0,17* | 3,29 $\pm$ 0,26* | 3,82 $\pm$ 0,07* |
| 360                                            | 4,62 $\pm$ 0,19      | 4,10 $\pm$ 0,22 *    | 4,63 $\pm$ 0,40 | 4,05 $\pm$ 0,19* | 3,24 $\pm$ 0,21* | 3,86 $\pm$ 0,06* |

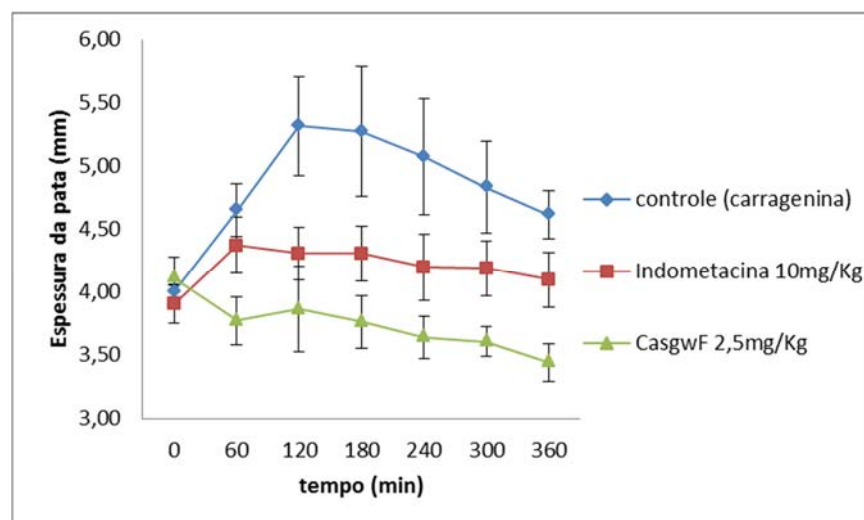
\*valores significativos para  $p < 0,05$  em relação ao controle (carragenina)

As figuras a seguir mostram as análises realizadas para as substâncias isoladas CasgwF e CasB nas mesmas doses de 0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg, respectivamente.

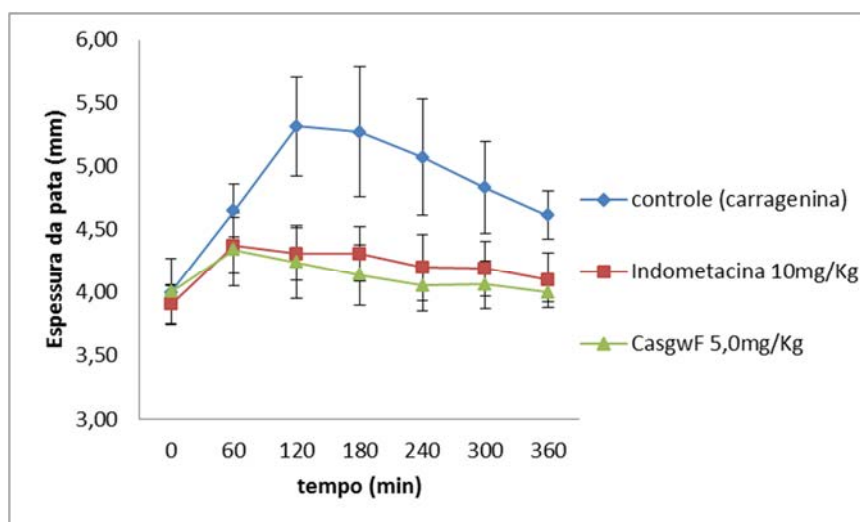
**Figura 27:** Efeito da administração de CasgwF (0,5mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



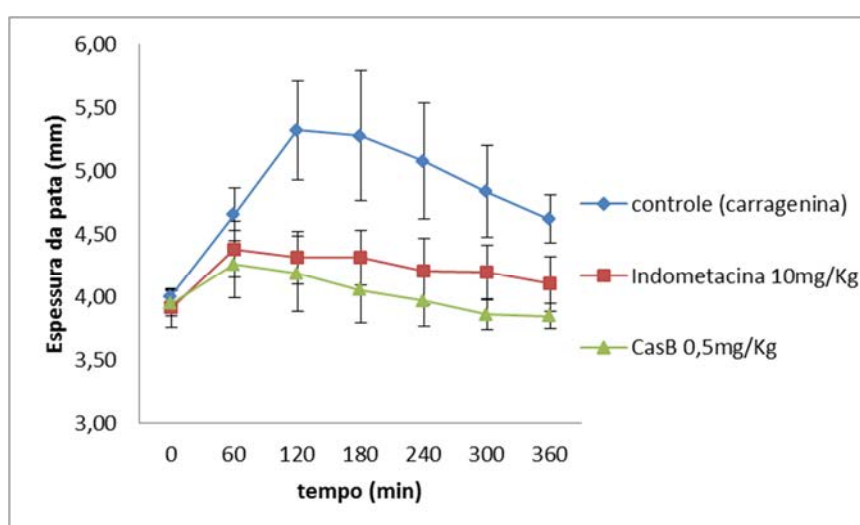
**Figura 28:** Efeito da administração de CasgwF (2,5mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



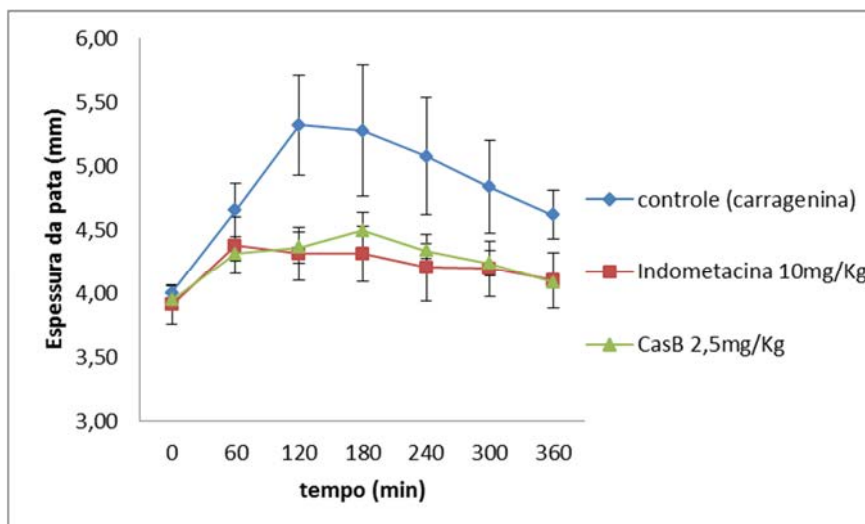
**Figura 29:** Efeito da administração de CasgwF (5,0mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p<0,05$ .



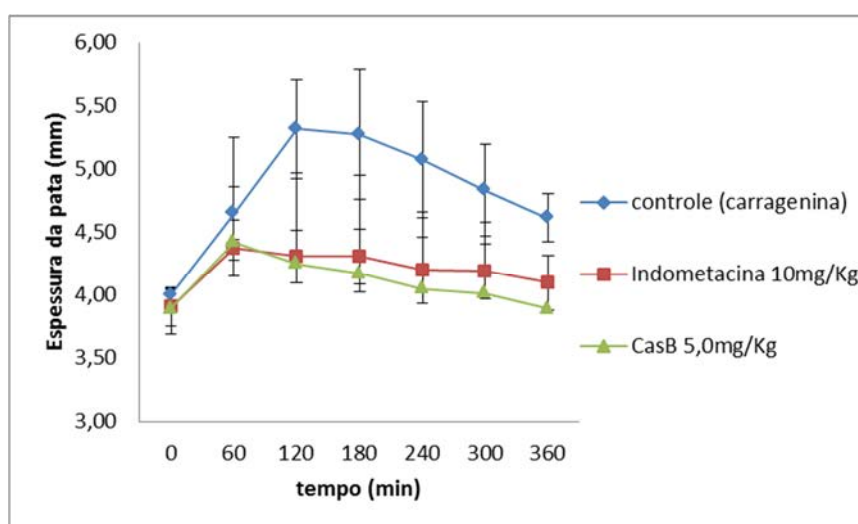
**Figura 30:** Efeito da administração de CasB (0,5mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p<0,05$ .



**Figura 31:** Efeito da administração de CasB (2,5mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6).



**Figura 32:** Efeito da administração de CasB (5,0mg/Kg, v.o.) e indometacina (10mg/Kg, v.o.), sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata) em ratos. Os resultados representam a variação do edema de pata, onde cada ponto é expresso como média  $\pm$  erro padrão da medida da pata direita (mm) (n= 6). Sendo  $p < 0,05$ .



Os valores obtidos para as substâncias isoladas CasgwF e CasB (Tabela 12) nas três dosagens testadas (0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg) revelaram atividade anti-inflamatória equivalente destas substâncias quando comparadas a indometacina 10mg/Kg, demonstrando o potencial anti-inflamatório da planta *Casearia sylvestris*

Swartz, considerando que estas duas substâncias foram identificadas no EEtCs e EFSCs2.

As diferentes doses testadas das substâncias isoladas não apresentaram diferenças estatísticas entre elas em relação à diminuição do inchaço das patas dos animais avaliados.

**Tabela 12:** Valores absolutos da espessura da pata direita do rato (mm) expressos como média  $\pm$  erro padrão para os grupos Controle (carragenina), Indometacina 10mg/Kg, CasgwF e CasB, ambas nas dosagens de 0,5; 2,5 e 5,0mg/Kg, respectivamente.

| Espessura média da pata (mm) $\pm$ Erro Padrão |                      |                      |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|------------------------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tempo (min)                                    | Controle carragenina | Indometacina 10mg/Kg | CasgwF 0,5mg/Kg  | CasgwF 2,5mg/Kg  | CasgwF 5,0mg/Kg  | CasB 0,5mg/Kg    | CasB 2,5mg/Kg    | CasB 5,0mg/Kg    |
| 0                                              | 4,00 $\pm$ 0,06      | 3,91 $\pm$ 0,15 *    | 4,00 $\pm$ 0,17* | 4,12 $\pm$ 0,16* | 4,01 $\pm$ 0,26* | 3,94 $\pm$ 0,10* | 3,94 $\pm$ 0,06* | 3,89 $\pm$ 0,15* |
| 60                                             | 4,65 $\pm$ 0,21      | 4,38 $\pm$ 0,22 *    | 4,46 $\pm$ 0,19* | 4,53 $\pm$ 0,19* | 4,34 $\pm$ 0,29* | 4,26 $\pm$ 0,27* | 4,31 $\pm$ 0,05* | 4,43 $\pm$ 0,83* |
| 120                                            | 5,32 $\pm$ 0,39      | 4,31 $\pm$ 0,21 *    | 4,40 $\pm$ 0,24* | 4,64 $\pm$ 0,34* | 4,24 $\pm$ 0,29* | 4,18 $\pm$ 0,30* | 4,36 $\pm$ 0,12* | 4,25 $\pm$ 0,72* |
| 180                                            | 5,28 $\pm$ 0,51      | 4,31 $\pm$ 0,22 *    | 4,23 $\pm$ 0,20* | 4,52 $\pm$ 0,21* | 4,14 $\pm$ 0,24* | 4,05 $\pm$ 0,26* | 4,49 $\pm$ 0,14* | 4,18 $\pm$ 0,78* |
| 240                                            | 5,08 $\pm$ 0,46      | 4,20 $\pm$ 0,26 *    | 4,15 $\pm$ 0,14* | 4,37 $\pm$ 0,17* | 4,06 $\pm$ 0,20* | 3,97 $\pm$ 0,20* | 4,34 $\pm$ 0,06* | 4,05 $\pm$ 0,61* |
| 300                                            | 4,83 $\pm$ 0,36      | 4,19 $\pm$ 0,22 *    | 4,06 $\pm$ 0,15* | 4,33 $\pm$ 0,12* | 4,07 $\pm$ 0,19* | 3,86 $\pm$ 0,12* | 4,24 $\pm$ 0,10* | 4,02 $\pm$ 0,56* |
| 360                                            | 4,62 $\pm$ 0,19      | 4,10 $\pm$ 0,22 *    | 4,03 $\pm$ 0,15* | 4,13 $\pm$ 0,15* | 4,00 $\pm$ 0,07* | 3,84 $\pm$ 0,10* | 4,08 $\pm$ 0,05* | 3,89 $\pm$ 0,43* |

\*valores significativos para  $p < 0,05$  em relação ao controle (carragenina)

Modelos experimentais usando a carragenina como agente inflamatório são amplamente utilizados para investigação da fisiopatologia da resposta inflamatória, como também para a caracterização de novas drogas anti-inflamatórias (WINTER et al., 1962; TOBACMAN, 2001). O edema de pata induzido por carragenina foi utilizado neste trabalho a fim de avaliar atividade anti-inflamatória do extrato etanólico, frações e substâncias isoladas de *C. sylvestris*.

O agente flogístico carragenina utilizado neste experimento, é um polissacarídeo sulfatado que desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia que se caracteriza por edema, sensibilidade a estímulos térmicos e mecânicos exacerbada em função de uma ação sequencial de vários mediadores (histamina, 5-hidroxitriptamina(5-HT), cininas e prostaglandinas), incluindo o sistema complemento (FERREIRA et al., 2004). Neste modelo pode ocorrer elevação dos níveis de COX-2, com um aumento concomitante da produção de prostaglandinas (NANTEL et al., 1999).

Os anti-inflamatórios, de uma maneira geral, apresentam limitações em relação a sua potência, eficácia e efeitos adversos. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), por exemplo, apresentam reações gastrointestinais adversas e os AINEs seletivos para COX-2 foram associados a alterações cardiovasculares (PARENTE, 2000; FIORUCCI et al., 2001). Os AIE, devido à ação comum aos esteroides, apresentam grandes problemas com seus efeitos adversos. No caso dos inibidores de citocinas ou moduladores (anti-IL-1 $\beta$  e anti-TNF- $\alpha$ ) a limitação é seu alto custo e a via de administração (subcutânea 2 x semana), fator limitante a adesão ao tratamento (CALIXTO et al., 2004).

Neste contexto, as indústrias buscam substâncias naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos.

Dados da literatura mostram que as plantas inibem, frequentemente, mais de uma via de ação melhorando a ação anti-inflamatória e diminuindo os efeitos adversos (SCHMITZ e BACHER, 2005). Isto pode ocorrer pelo simples fato da planta apresentar em sua constituição uma mistura de substâncias que podem agir sinérgica ou antagonicamente através de diferentes mecanismos de ação (CALIXTO et al., 2004).

#### **5.4.1.1 Teste de gastrotoxicidade**

Os estômagos dos animais tratados com extrato, frações e substâncias purificadas analisados macroscopicamente não apresentaram grau de lesão gástrica ao contrário dos animais tratados com indometacina no qual encontramos grau 5 (máximo) pelo índice de ulceração (Figura 33).

**Figura 33:** Fotografia dos estômagos dos ratos tratados e não tratados em aumento de 8 vezes em microscópio-estereoscópio Leica MZAPO. **(a)** Grupo Controle Negativo; **(b)** Grupo Indometacina 100 mg/Kg; **(c)** Grupo EEtCs 100 mg/Kg. Encontramos lesões com quadro hemorrágico em **(b)**. No detalhe está circulada a lesão hemorrágica provocada pela indometacina.



**Tabela 13.** Efeito ulcerogênico da indometacina.\*

| Composto                  | Número de úlceras | (Grau 1)               | (Grau 2)               | (Grau 3)             | (Grau 4)             | (Grau 5)             |
|---------------------------|-------------------|------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| indometacina (100 mg/ Kg) | 48 ± 11           | 37,6 ± 5,3<br>(78,3 %) | 1,4 ± 3,4<br>(2,9 %)   | 3,1 ± 6,1<br>(6,4 %) | 3,6 ± 4,2<br>(7,6 %) | 2,3 ± 2,1<br>(4,8 %) |
| indometacina (10 mg/ Kg)  | 29 ± 8            | 6 ± 1,05<br>(20,8 %)   | 11,7 ± 5,1<br>(40,2 %) | 11,3 ± 6,7<br>(39%)  | -                    | -                    |

\*Os extratos, frações e substâncias purificados não foram apresentados na tabela por não encontrarmos lesão macroscópica na mucosa gástrica.

#### 5.4.2 Avaliação da atividade anti-inflamatória crônica do extrato etanólico de *C. sylvestris* através de modelo anti-artrite reumatóide (baseado em TRENTAN et al., 1977)

O experimento observado em nosso laboratório com a utilização dos agentes irritantes articulares (colagenase tipo II e reagente completo de Freund) demonstrou reprodutibilidade do padrão de acometimento articular para o processo inflamatório crônico (modelo de artrite).

Em todos os animais que foram induzidos para o teste, quando comparado com as escalas qualitativas e quantitativas envolvidas na análise (controle térmico, padrão de deambulação, eritema/edema local e alteração da estrutura articular) encontramos valores de escalonamento máximo com pontuação de 3 para análise isolada da articulação mais afetada (SEIDEL, KECK & VETTER, 1997), sem redução de peso patológico.

Outra forma de avaliar a severidade gradual da doença (AR) nos ensaios pré-clínicos foi à utilização da somatória dos pontos nas patas acometidas, sendo os valores atribuídos de:

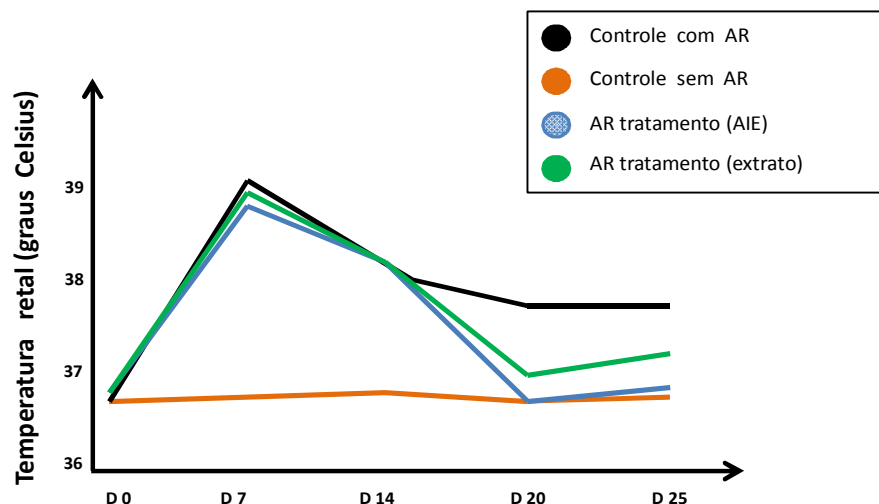
- 0 = nenhuma mudança;
- 1 = edema e eritema plantar;
- 2 = edema e eritema do membro;
- 3 = grave edema e eritema plantar;
- 4 = deformidade grave e incapacidade de usar o membro.

Com pontuação total não ultrapassando a atribuição igual a 16 para cada animal (KHALIFEH, 2008). Utilizando este critério nosso experimento recebeu pontuação média de 8, com predomínio da resposta inflamatória nas patas traseiras.

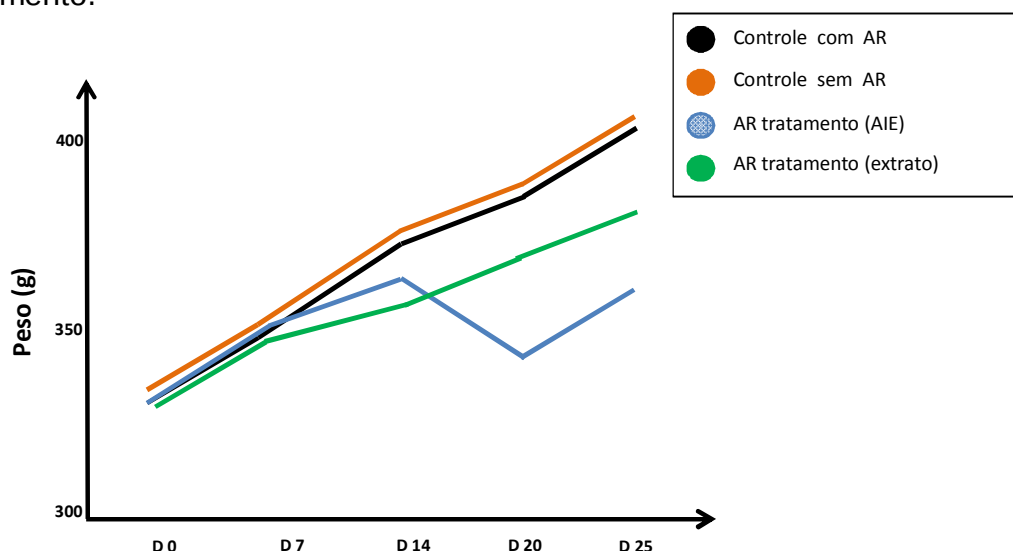
Os animais que em sua totalidade receberam a administração do agente irritante subcutâneo apresentaram febre após o dia de inoculação (**D0**), permanecendo em toda fase inicial (**D0-D4**), com redução ou ausência na fase de instalação (**D5-D9**). Picos febris retornaram no **D12** (fase sistêmica – **D10-D14**), e na fase artrítica (**D15-D25**) podemos observar a presença de febrícula no grupo de animais não tratados.

Quando utilizamos uma segunda intervenção no **D7** com os agentes irritantes (forma pela qual garantimos que todos os animais mantenham-se doentes), o controle térmico que deveria ser próximo do normal neste dia, devido a fase de instalação, se altera novamente com padrão febril devido ao novo estímulo inflamatório.

Os dados apresentados foram obtidos nos momentos pelo qual houve intervenção experimental seguindo uma sequência cronológica para o dia da inoculação do agente irritante (**D0**), no sétimo dia com o reforço da agressão (**D7**), no dia que antecede o tratamento (fase crônica **D14**), após 5 dias de tratamento (**D20**) e após 10 dias de tratamento (**D25**). Os resultados estão representados abaixo (Figura 34).

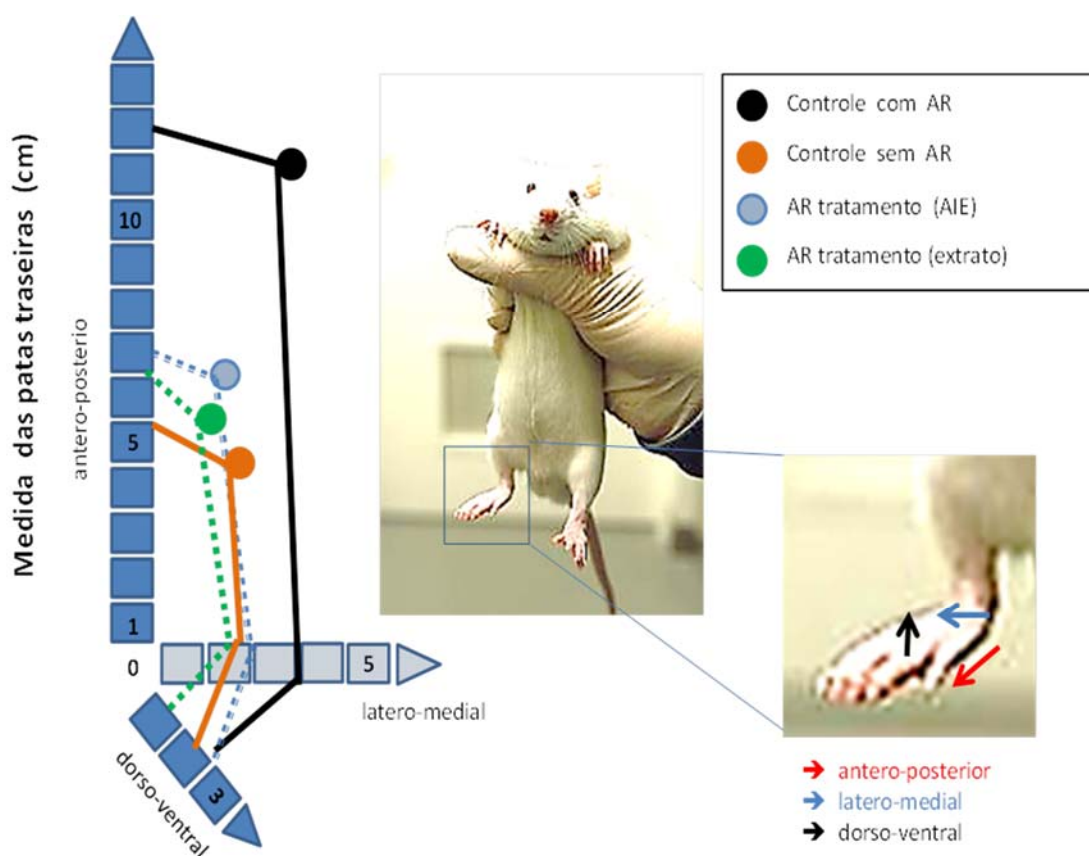
**Figura 34:** Temperatura retal dos ratos medida ao longo do experimento.

De acordo com a Figura 35, houve redução do peso corporal de 10 % no grupo tratado com AIE via oral, com pelo menos uma articulação afetada ao término do experimento. No grupo tratado com o extrato via oral houve redução do peso corporal de 5 %. No grupo controle negativo para a doença (ratos saudáveis) o peso corporal médio foi de 400 g tendo um ganho médio ao longo do experimento de 70 g, correspondente a 2,8 g / dia. No grupo controle positivo para a doença (ratos com AR) o peso corporal foi estatisticamente igual, sendo esperados os valores de redução de até 10 % pela própria evolução da doença.

**Figura 35:** Medida do peso corporal ao longo dos dias, demonstrando perda de até 10 % para o grupo tratado com AIE e 5 % para o grupo tratado com o extrato no final do experimento.

Para as alterações no peso / volume das patas (Figura 36), a dexametasona e o extrato testados foram efetivos tanto na interrupção do curso da doença quando administrados no início da indução com o agente irritante, como para reduzir o processo inflamatório crônico (**D15**) e consequente peso e o volume das patas, trazendo a condições próximas da normalidade.

**Figura 36:** Medida das patas traseiras ao final do experimento em cm (Dorso/Ventral [seta preta] x Latero/Medial [seta azul] x Antero/Posterior [seta vermelha]).

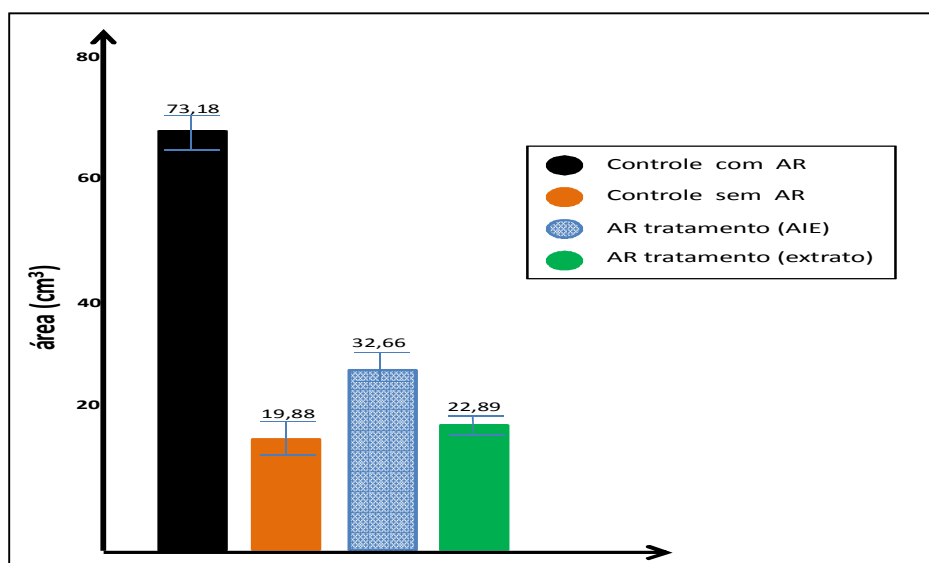


No processo de cronificação temos um remodelamento ósseo por ativação osteoclástica induzida pela presença de mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), e o fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) no intuito de reestabelecer o padrão ósseo-articular, porém, após a formação do *panus* inflamatório ocorre uma alteração irreversível da estrutura e relação óssea.

Temos um padrão de remodelamento ósseo que altera a relação articular tíbio-tarsal em maior amplitude no sentido antero-posterior e latero-medial, esta

última devido destruição óssea dos maléolos. Abaixo temos na Figura 37 a discriminação das áreas em  $\text{cm}^3$  visualizando a medida o volume das patas.

**Figura 37:** Medida da área das patas traseiras ao final do experimento em  $\text{cm}^3$  (Dorso/Ventral x Latero/Medial x Antero/Posterior) (\* $p < 0,05$  em relação ao controle positivo para a doença AR, \*\* $p < 0,05$  em relação ao controle negativo para a doença AR [ratos saudáveis] – ANOVA).



Na evolução da doença, o fluido inflamatório sinovial é rico em interleucina-12 (IL-12), IL-23, IL-6 e fator de crescimento transformante (TGF), e, como tal, promove a diferenciação de linfócitos T auxiliares 1 (Th1) e células Th17. As células T reguladoras, embora presentes, não podem exibir atividade de regulação capaz de vencer a cascata inflamatória (McINNES; SCHETT, 2007).

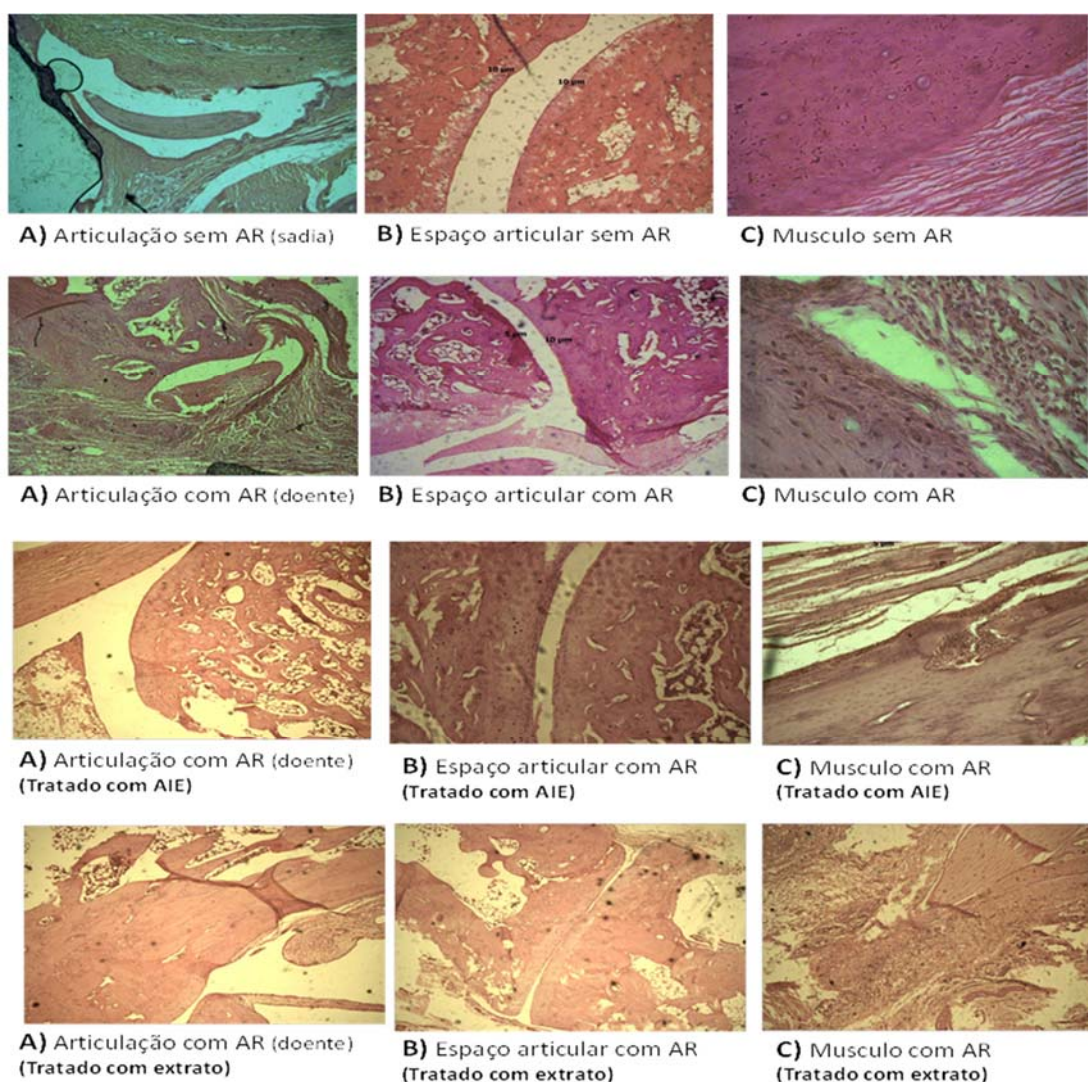
A evolução pode ser lenta ou rápida, e flutuar ao longo dos anos, em geral 10 % dos pacientes apresenta um início agudo com envolvimento poliarticular instalado dentre poucos dias, como a rigidez matinal, mas em ambos, os danos de maior extensão ocorrem entre os primeiros 5 anos (WEISBERG, 2006).

Em modelos de roedores, as células T reguladoras estão presentes em números elevados em articulações, enquanto que na doença de humano a contribuição relativa destes subconjuntos permanece desconhecida. As células T ativadas mediam a função efetora da doença AR por meio da libertação de citocinas, que promovem a ativação de leucócitos, células mesenquimais, células B e células T CD8+ efetoras da atividade citotóxica. Este processo também retro-alimenta a

ativação de macrófagos, fibroblastos e células endoteliais através do contato direto com células e fatores: estimulante de colônias; de necrose tumoral (TNF); interferon (IFN); osteopontina e receptor ativador do fator nuclear relacionado à célula B. (McINNES & SCHETT, 2007).

Para análise microscópica realizamos a parceria com o Instituto de Patologia Clínica (IPC) de Araraquara, no qual demonstrou um padrão de inflamação crônica nas patas analisadas, em comparação com os animais saudáveis. A seguir pode ser encontrado o perfil histopatológico de nosso experimento (Figura 38).

**Figura 38:** Fotografia dos cortes histológicos em HE, das patas traseiras, dos animais ao término do experimento em microscópio - Leica MZAPO. Aumento de 40 e 200x.



Podemos observar redução do espaço articular de 50 % dos animais doentes em relação aos sadios, e um reestabelecimento das proporções articulares para o grupo tratado com AIE de 80 % e de 75 % para o grupo tratado com o EEtCs (Figura 38-B).

A análise do tecido muscular revela atividade inflamatória crônica com células apresentando padrão morfológico de macrófagos e histiócitos tanto no grupo doente e em menor proporção ao grupo tratado com AIE. No grupo tratado com extrato observamos um padrão celular crônico com presença de células agudas, demonstrando tecido inflamatório crônico agudizado.

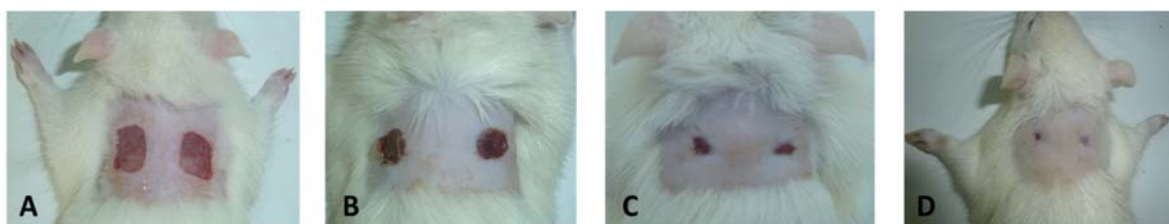
Podemos observar que o extrato apresentou papel importante como controlador da doença inflamatória crônica, não sendo evidenciada toxicidade nos órgãos analisados após término do experimento.

#### 5.4.3 Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e substância isolada de *C. sylvestris*

Avaliou-se a atividade cicatrizante do gelcreme EEtCs 2,0% e do gelcreme CasgwF 0,06% em feridas cutâneas de ratos, comparadas com as feridas controle tratadas com gelcreme base.

O exame macroscópico realizado após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com EEtCs e CasgwF apresentou, nas feridas controle (lado esquerdo), aspecto avermelhado e crostas úmidas. As feridas tratadas (lado direito) com o extrato e substância isolada apresentavam-se com crosta de coloração marrom escura, aparentemente seca. A Figura 39 ilustra o fechamento e o aspecto macroscópico da ferida em rato ao longo do tempo tratado com gelcreme de caseargrewiina F 0,06%.

**Figura 39:** Ferida no dorso de rato Wistar durante o tratamento. **Esquerda:** ferida tratada com gelcreme base; **direita:** gelcreme de caseargrewiina F 0,06%. **(A)** início do tratamento; **(B)** 7<sup>o</sup> dia de tratamento; **(C)** 10<sup>o</sup> dia de tratamento e **(D)** 14<sup>o</sup> dia de tratamento.



O aspecto irregular das bordas e região central das feridas dos grupos tratados e controle devem-se, provavelmente, devido à presença da crosta leucocitária coincidindo com as observações feitas por Contran (1989). Segundo este, um tecido ao sofrer agressões é isolado do meio ambiente após ser preenchido por coágulos, fibrina e exsudato, formando uma crosta.

A análise qualitativa do infiltrado inflamatório foi realizada classificando-o como: agudo (presença de neutrófilos), crônico (presença de células mononucleares) ou misto (presença de neutrófilos e células mononucleares). Também foi observada a intensidade do infiltrado inflamatório, sendo classificado em leve, moderado e intenso. Foram preparadas duas lâminas por animal para os grupos controle e tratado, contendo quatro cortes semi seriados cada uma.

A análise da resposta inflamatória observada ao longo do tempo nos grupos controle e tratado foi variável e não demonstrou um padrão consistente (Tabelas 14 e 15).

A análise estatística do tipo de resposta inflamatória observada não apresentou diferença estatística entre os grupos controle e Extrato 2%, mas a análise na intensidade da resposta inflamatória apresentou diferença estatística (teste de Mann-Whitney, amostra não pareada) entre os grupos controle e Extrato 2% apenas para o tratamento de 7 dias ( $p= 0,0172$ ). Entretanto, verificou-se uma tendência de cronificação e redução da intensidade da resposta inflamatória nos grupos tratados com gelcreme CasgwF 0,06%.

**Tabela 14:** Tipo e intensidade de inflamação para os animais do grupo controle (gelcreme base) e tratado (gelcreme Extrato 2%).

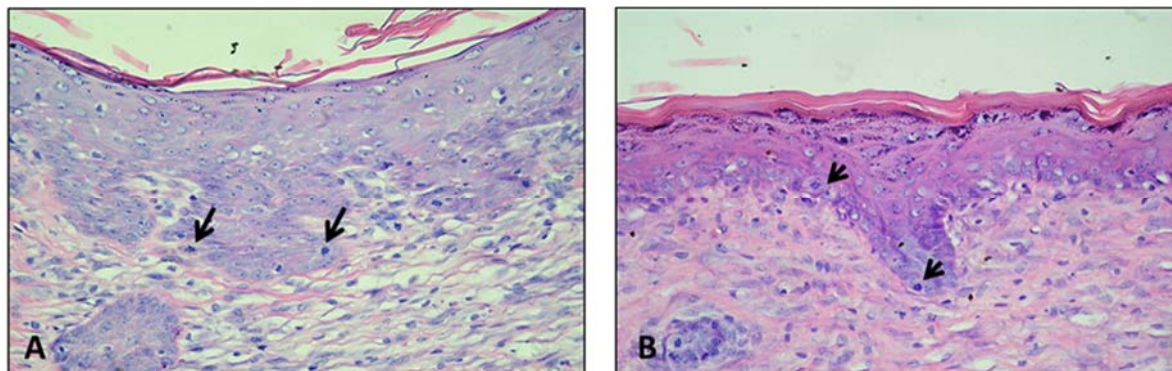
| GRUPO CONTROLE   | 4º DIA     |             | 7º DIA     |             | 10º DIA    |             | 14º DIA    |             |
|------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
|                  | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE |
| R1               | aguda      | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | forte       | crônica    | leve        |
| R1               | aguda      | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | forte       | crônica    | leve        |
| R2               | aguda      | moderada    | mista      | forte       | mista      | forte       | crônica    | leve        |
| R2               | aguda      | moderada    | mista      | forte       | mista      | forte       | crônica    | leve        |
| R3               | aguda      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    |
| R3               | aguda      | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    |
| R4               | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    |
| R4               | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    |
| R5               | mista      | leve        | crônica    | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | forte       |
| R5               | mista      | leve        | crônica    | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | forte       |
| GRUPO EXTRATO 2% | 4º DIA     |             | 7º DIA     |             | 10º DIA    |             | 14º DIA    |             |
|                  | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE |
| R1               | aguda      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | moderada    |
| R1               | aguda      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | moderada    |
| R2               | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | leve        |
| R2               | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | forte       | crônica    | leve        |
| R3               | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        |
| R3               | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        |
| R4               | aguda      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R4               | aguda      | moderada    | mista      | leve        | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R5               | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    |
| R5               | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    |

**Tabela 15:** Tipo e intensidade de inflamação para os animais do grupo controle (gelcreme base) e tratado (gelcreme CasgwF 0,06%).

| GRUPO CONTROLE     | 4º DIA     |             | 7º DIA     |             | 10º DIA    |             | 14º DIA    |             |
|--------------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|------------|-------------|
|                    | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE |
| R1                 | mista      | leve        | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        |
| R1                 | mista      | leve        | mista      | forte       | mista      | moderada    | crônica    | leve        |
| R2                 | mista      | leve        | crônica    | forte       | crônica    | forte       | crônica    | moderada    |
| R2                 | mista      | leve        | mista      | forte       | crônica    | forte       | crônica    | moderada    |
| R3                 | mista      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | leve        | crônica    | leve        |
| R3                 | mista      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | leve        | crônica    | leve        |
| R4                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | moderada    |
| R4                 | mista      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | forte       |
| R5                 | aguda      | moderada    | crônica    | forte       | mista      | leve        | crônica    | leve        |
| R5                 | aguda      | moderada    | crônica    | forte       | mista      | leve        | crônica    | leve        |
| GRUPO CasgwF 0,06% | 4º DIA     |             | 7º DIA     |             | 10º DIA    |             | 14º DIA    |             |
|                    | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE | INFLAMAÇÃO | INTENSIDADE |
| R1                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R1                 | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R2                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R2                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R3                 | mista      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R3                 | mista      | moderada    | mista      | forte       | crônica    | moderada    | crônica    | leve        |
| R4                 | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | moderada    |
| R4                 | aguda      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | moderada    |
| R5                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | leve        |
| R5                 | mista      | moderada    | mista      | moderada    | crônica    | leve        | crônica    | leve        |

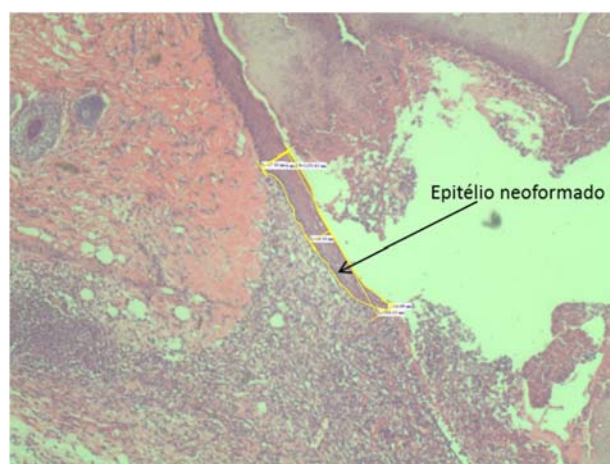
A Figura 40 ilustra a análise do índice mitótico onde as células bloqueadas em metáfase nas camadas basal e supra basal do epitélio neoformado foram contabilizadas.

**Figura 40:** Corte transversal da ferida cutânea no dorso do rato Wistar coradas em HE (aumento de 10x). As setas indicam células bloqueadas em metáfase na língua de reepitelização onde, **(A)**: grupo controle (gelcreme base); **(B)**: grupo tratado (gelcreme EEtCs 2% ou gelcreme CasgwF 0,06%).



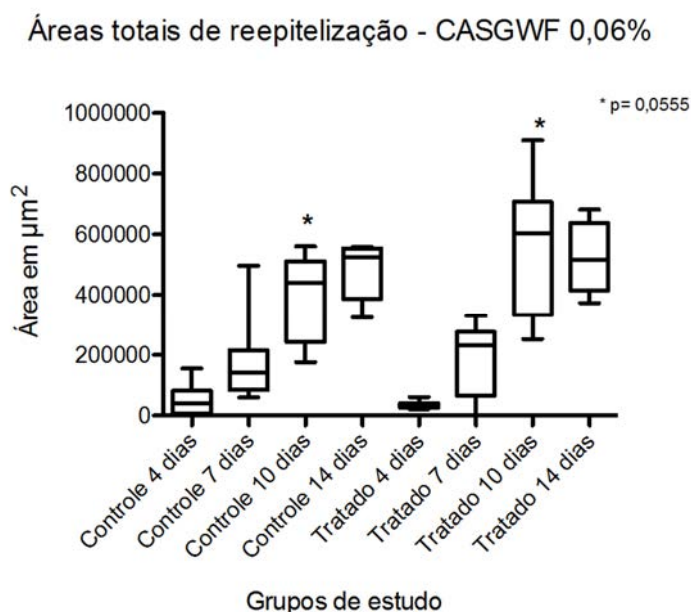
A Figura 41 ilustra como foram realizadas as medidas de espessura e perímetro do epitélio neoformado (língua de reepitelização).

**Figura 41:** Língua de reepitelização mostra como foram realizadas as medidas de espessura e perímetro do epitélio neoformado.



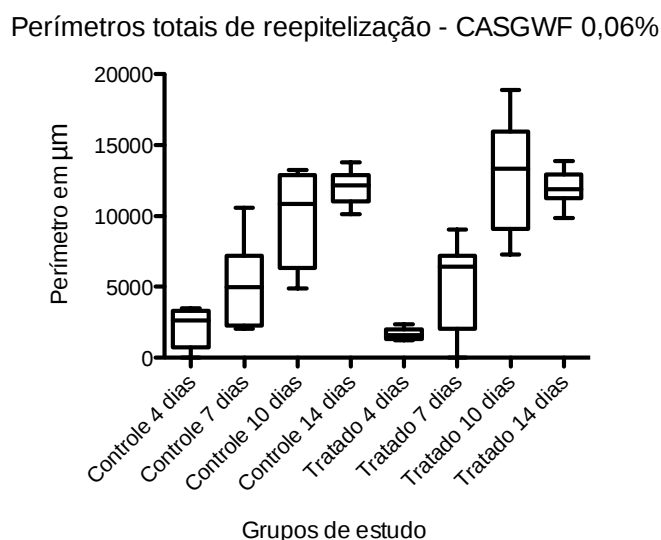
A Figura 42 descreve as médias das áreas de reepitelização ( $\mu\text{m}^2$ ) e seus respectivos desvios padrões além de permitir verificar a presença da mediana nos grupos controle e tratado com CasgwF 0,06%. Como pode ser observado, verificamos diferença estatística nas áreas de reepitelização no período de 10 dias, com o grupo tratado com CasgwF 0,06% apresentando maiores áreas de reepitelização.

**Figura 42:** Análise da área de reepitelização ( $\mu\text{m}^2$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Casgwf 0,06%.



Na análise do perímetro, embora se perceba na Figura 43 valores no período de 10 dias, esta diferença não foi significativa.

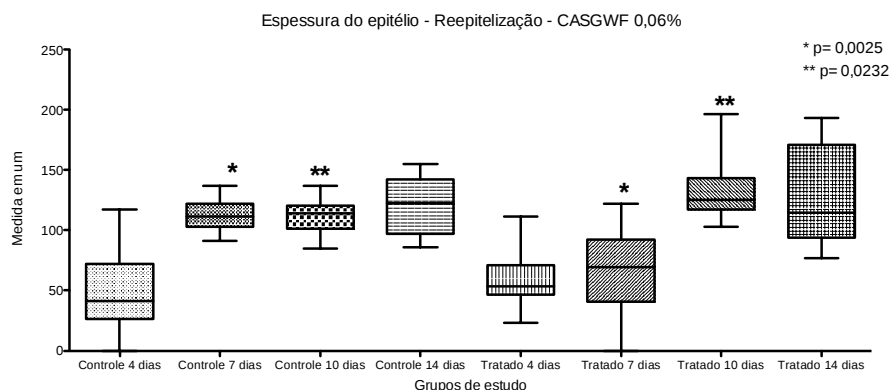
**Figura 43:** Análise do perímetro de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Casgwf 0,06%.



Quando analisamos a espessura da área de reepitelização em três pontos distintos, verificamos diferença estatística tanto no período de 7 quanto de 10 dias. Importante notar que o grupo tratado com Casgwf 0,06% apresentou médias de espessura menor do epitélio. De maneira interessante, quando analisamos a espessura

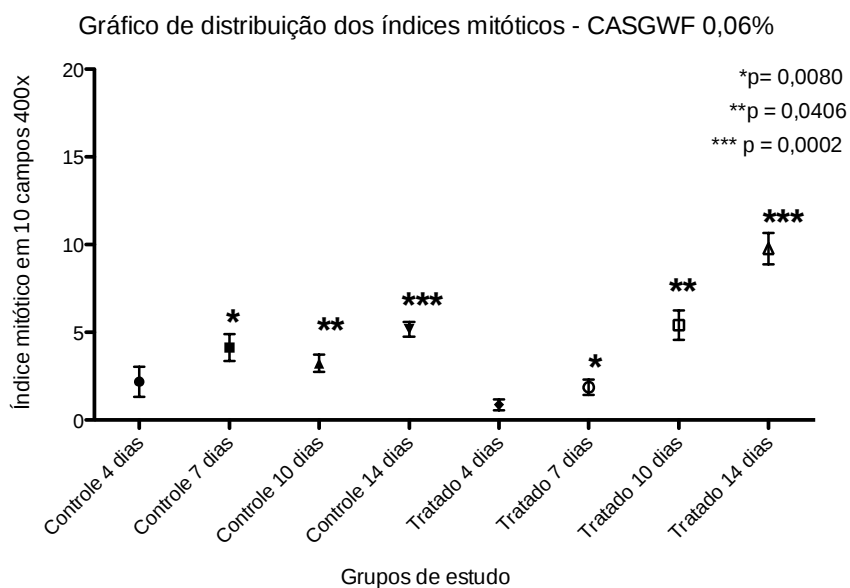
da área de reepitelização em três pontos distintos, verificamos diferença estatística tanto no período de 7 quanto no período de 10 dias. Também é importante notar que o grupo tratado com Casgwf 0,06% apresentou médias de espessura do epitélio menor no período de 7 dias e maior no período de 10 dias (Figura 44).

**Figura 44:** Análise da espessura de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Casgwf 0,06%.



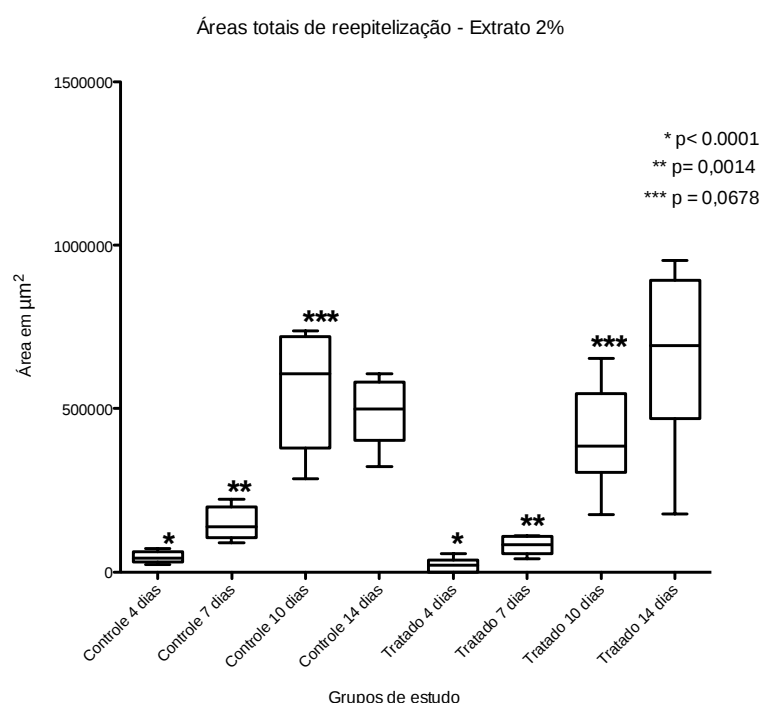
Do mesmo modo, quando analisamos o índice mitótico nos diferentes períodos de análise verificamos diferença estatística nos períodos de 7, 10 e 14 dias, com a importante verificação de que, no período de 7 dias o grupo controle apresentou maiores índices mitóticos e nos períodos de 10 e 14 dias o grupo tratado com Casgwf 0,06% apresentou maiores índices mitóticos (Figura 45).

**Figura 45:** Análise do índice mitótico realizada em 10 campos de 400x da ferida dos animais tratados com gelcreme CASGWF 0,06%.



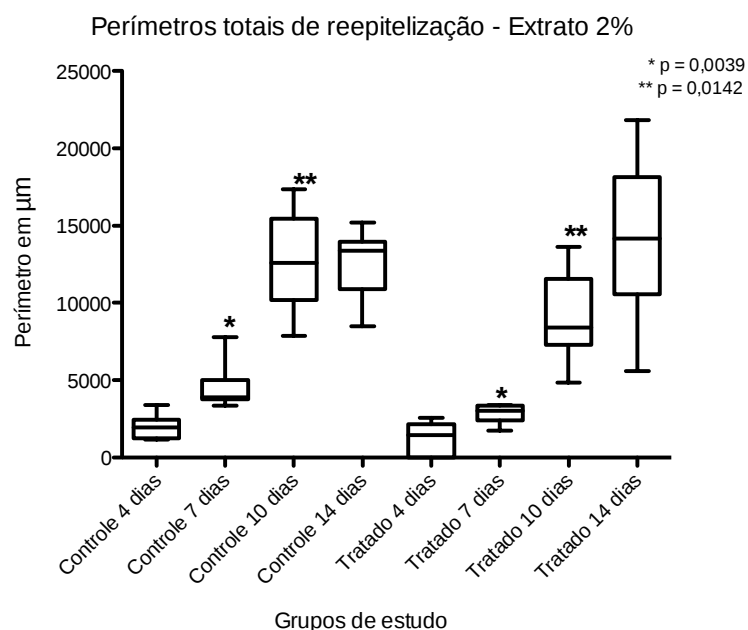
De maneira semelhante ao grupo anterior, a análise da área de reepitelização no estudo com o Extrato 2% demonstrou diferenças estatísticas com o grupo controle, neste caso de forma mais acentuada, podendo ser identificada diferença estatística desde o período de 4 dias de análise da área de reepitelização ( $\mu\text{m}^2$ ). Entretanto, nota-se que o efeito foi inverso, pois nos três períodos identificados com diferença estatística, verificou-se que o grupo controle apresentou maiores áreas de reepitelização (Figura 46).

**Figura 46:** Análise da área de reepitelização ( $\mu\text{m}^2$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Extrato 2%.



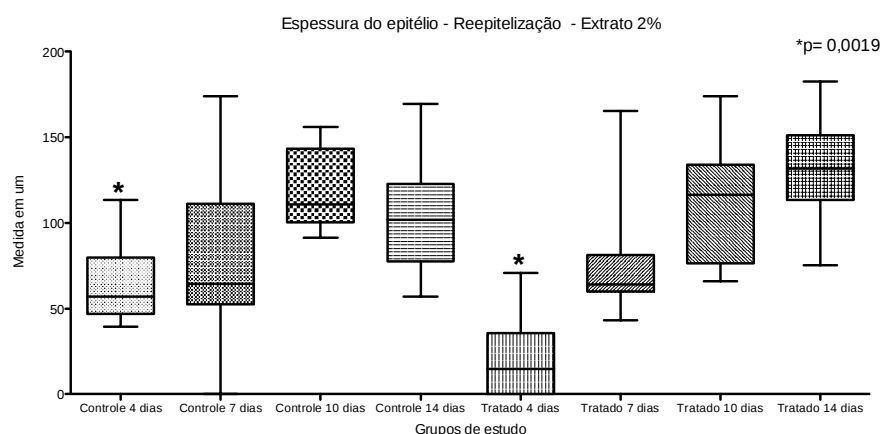
Também pudemos observar que, quando analisado o perímetro de reepitelização do grupo tratado com o Extrato 2%, este apresenta diferenças estatisticamente significantes nos períodos de 7 e 10 dias. Igualmente ao que foi descrito para a área, o grupo controle apresentou maiores perímetros que o grupo tratado com Extrato 2% (Figura 47).

**Figura 47:** Análise do perímetro de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Extrato 2%.



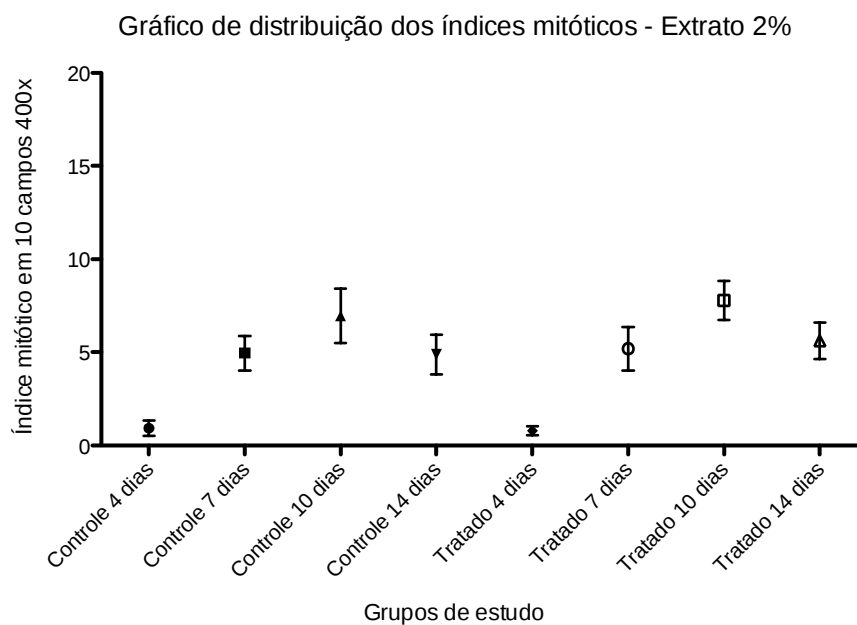
Do mesmo modo, mas agora identificada apenas no período de 4 dias de tratamento, verificou-se que o grupo controle apresenta maiores médias de espessura que o grupo tratado com Extrato 2% (Figura 48).

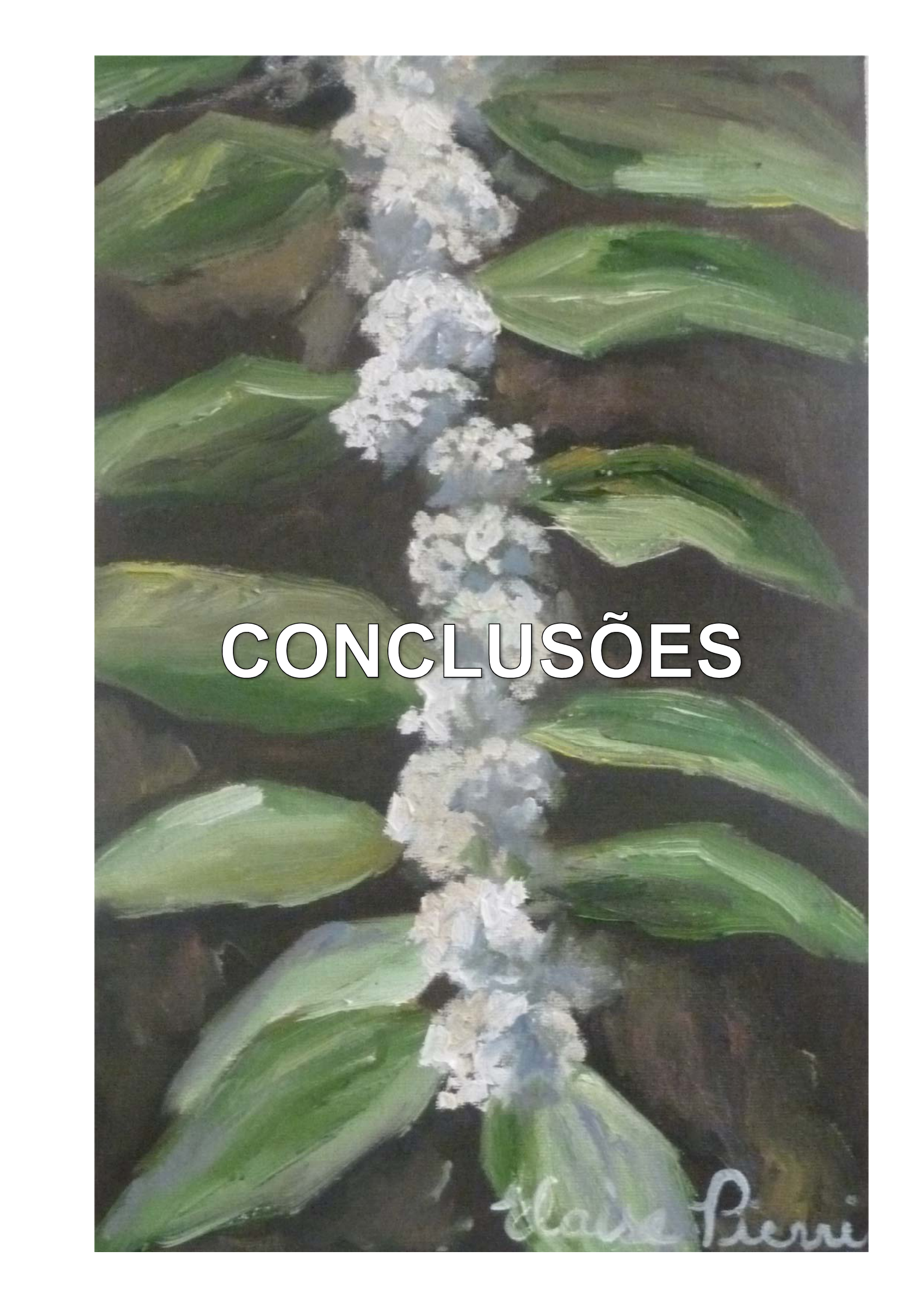
**Figura 48:** Análise da espessura de reepitelização ( $\mu\text{m}$ ) da ferida dos animais tratados com gelcreme Extrato 2%.



Entretanto, quando se analisa o índice mitótico dos dois grupos, não se verifica diferença estatística entre os mesmos (grupo controle e grupo Extrato 2%) (Figura 49).

**Figura 49:** Análise do índice mitótico realizada em 10 campos de 400x da ferida dos animais tratados com gelcreme Extrato 2%.





# CONCLUSÕES

Clara Pierre

## 6 CONCLUSÕES

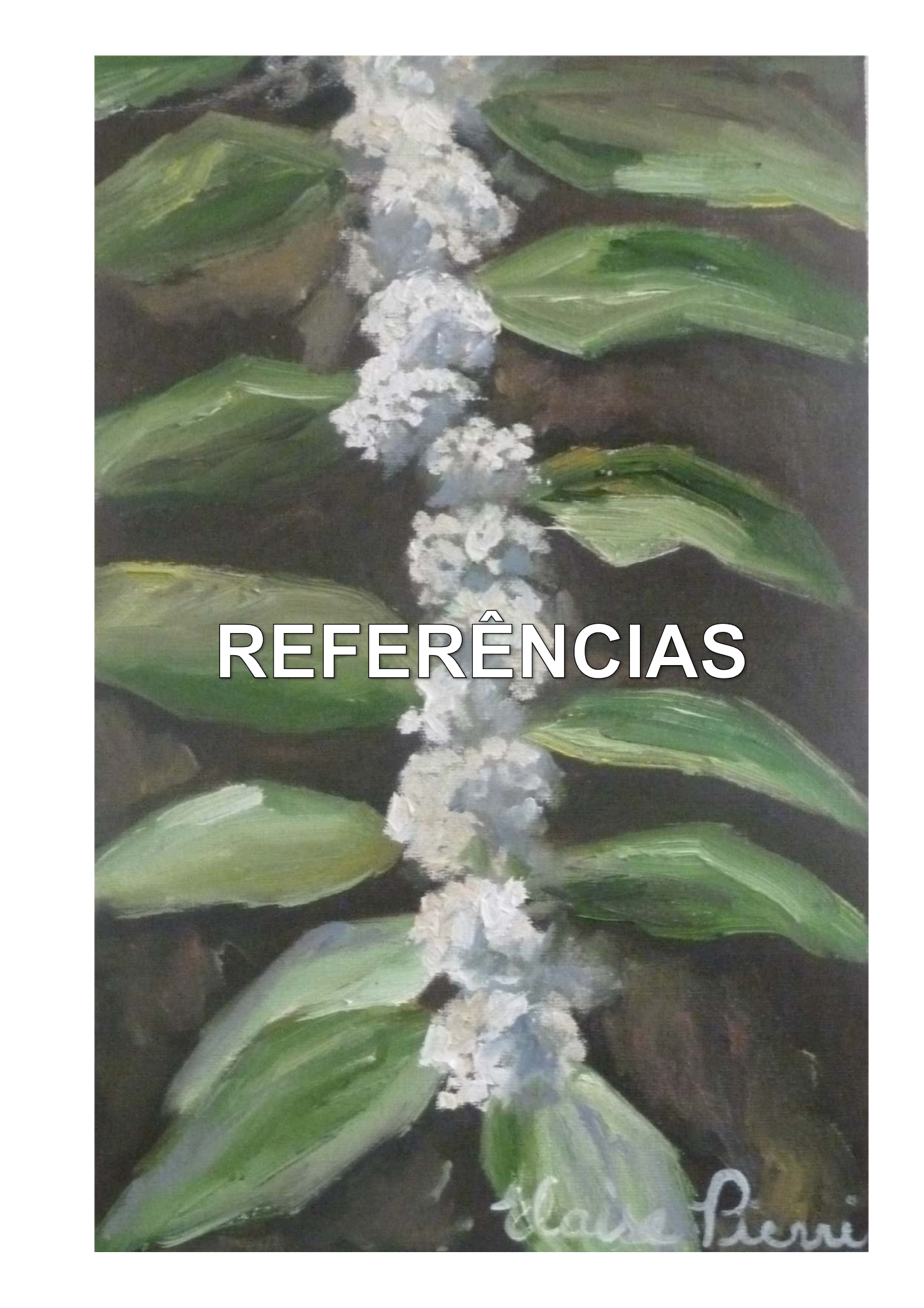
Mediante a proposta inicial deste trabalho os resultados obtidos permitiram concluir que, para a droga vegetal pulverizada constituída por folhas de *Casearia sylvestris* Swartz as metodologias empregadas para estabelecer parâmetros de qualidade, tais como: teor de umidade, teor de cinzas, teor de extrativos, análise granulométrica do pó, mostraram-se adequadas sendo que algumas sofreram adaptações. Baseado no trabalho de Santos (2008) o rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal foi de 11,8% semelhante a resultados encontrados na literatura. Ao fracionarmos o extrato etanólico obtivemos três frações com composição química distinta, onde somente a EFCs2 (fração acetato de etila) através dos valores de  $R_f$  indicou a presença de diterpenos do tipo clerodânico. A análise em CCD realizada para esta fração demonstrou a presença de casearina X, B e caseargrewiina F. Na quantificação por CLAE-DAD encontramos valores como 27,4 e 50,6% (p/p) para diterpenos clerodânicos do tipo casearinas no extrato e fração, respectivamente. Por CLAE-UV a caseargrewiina F foi quantificada resultando teores de 1,1 e 1,4% no extrato e fração, respectivamente.

As frações obtidas de EFSCs2 por CC de fase normal foram analisadas por CCD e reunidas segundo perfil cromatográfico e, em condições de análise pré-estabelecidas, verificou-se que as manchas apresentaram perfil cromatográfico simples (presença de 1 ou 2 manchas). Das análises em CLAE-UV do perfil destas frações concluimos que, algumas delas que apresentaram de 1 a 3 picos, mostraram-se adequadas para posterior separação em CLAEprep. Dentre elas, a fração CCCs11 (91,5% de pureza cromatográfica) foi submetida a análise por RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  onde identificamos a casearina J, conhecida na literatura. A casearina J foi quantificada no extrato EEtCs através de análise em CLAE-UV apresentando teor de 2,35%.

Para os ensaios biológicos a avaliação da atividade anti-inflamatória aguda apresentou resultados significativos em relação à indometacina e, tanto frações (EFSCs 1 e 2) e substâncias purificadas (Casgw F e Cas B) não apresentaram grau de lesão gástrica nos estômagos dos animais quando analisados macroscopicamente, ao contrário da indometacina que apresentou grau 5 (máximo) de lesão pelo índice de ulceração. Pode-se sugerir que os diterpenos clerodânicos sejam marcadores químicos para a atividade anti-inflamatória para a espécie *C sylvestris*, apesar dos dados sugerirem que outros metabólitos secundários possam

ser responsáveis por tal ação também. Na atividade anti-inflamatória crônica (artrite) o reestabelecimento das proporções articulares para o grupo tratado com AIE foi de 80 % e 75 % para o grupo tratado com o extrato (EEtCs) que apresentou papel importante de controlador da doença inflamatória crônica, não sendo evidenciada toxicidade nos órgãos analisados após término do experimento.

Para o tratamento de feridas cutâneas em rato Wistar a avaliação da atividade cicatrizante do gelcreme EEtCs 2% os resultados não foram muito promissores, embora para o grupo tratado com gelcreme de CasgwF 0,06% tenha apresentado relevância estatística, onde sugere-se que os diterpenos clerodânicos possam estar envolvidos na ação cicatrizante apresentada pela espécie.



# REFERÊNCIAS

Clare Pierre

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATANGELO, G. Growing interest in the medical world in the topics of wound healing and tissue repair. **Wound Repair and Regeneration**, v.4, n. 3, p. 309, 1996.

ABSY, M. L.; SCAVONE, O. Sobre a morfologia e anatomia da *Casearia sylvestris* Swartz. *Boletim de Zoologia e Biologia Marinha*, N.S., n.30, p. 641-676, 1973.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Determina a publicação da “Lista de Medicamento Fitoterápico de Registro Simplificado” junto a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de dezembro de 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução ANVISA n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 2010. 2010a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução ANVISA n. 14, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de abril de 2010. 2010b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC n. 48, de 16 de março de 2004. 2004a. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc\\_48\\_16\\_03\\_04\\_registro\\_fitoterápicos%20.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/rdc_48_16_03_04_registro_fitoterápicos%20.pdf). Acesso em: 03 de janeiro de 2013.

AGREN, M. Matrix metalloproteinases (MPPs) are required for re-epithelialization of cutaneous wounds. **Archives of Dermatological Research**, Minnesota, v. 291, p. 583-590, 1999.

ALBANO, M.N.; SILVEIRA, M.R.; DANIELSKI, L.G.; FLORENTINO, D.; PETRONILHO, F.; PIOVEZAN, A.P. Anti-inflammatory and antioxidante properties of hydroalcoholic crude extract from *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, p. 612-617, 2013.

ALLEN, L.V.; POPOVICH, N.G.; ANSEL, H.C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8ª Ed., Porto Alegre, 2007.

AMENI, A.Z. **Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos Wistar**. 2011. 93 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ANDRADE, A.G.; LIMA, C.F.; ALBUQUERQUE, A.K.B. Efeitos do laser terapêutico no processo de cicatrização das queimaduras: uma revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 9, n.1. p. 21-30, 2010.

- ANDRADE, A.M.; OLIVEIRA, J.P.R.; SANTOS, A.L.L.M.; FRANCO, C.R.P.; ANTONIOLLI, A.R.; ESTEVAM, C.S.; THOMAZZI, S.M. Preliminary study on the anti-inflammatory and antioxidant activities of the leave extract of *Hyptis fruticosa* Salzm. ex Benth., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n. 6, p. 962-968, Dez. 2010.
- APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D.A. Introduction of ciclooxigenase and nitric oxide synthase in inflammation. **Advances in Pharmacology**, New York, v.35, p. 27-78, 1996.
- ATHANASOPOULOS, A.N.; ECONOMOPOULOU, M.; ORLOVA, V.V.; SOBKE, A.; SCHNEIDER, D.; WEBER, H., et al. The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2720-2727, 2006.
- AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND GmbH (Germany). S. Bal-Tembe; K. E. K. S. Vijaya; D. V. Bhagwan; J. K. Sanjay. **Isolation of 18 $\beta$ ,19 $\beta$ -diacetoxy-18 $\beta$ ,19 $\beta$ -epoxy-3,13(16),14-clerodatrien-2-one (esculentin A) and 18 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -diacetoxy-18 $\alpha$ ,19 $\alpha$ -epoxy-3,12,14-clerodatrien-2 $\beta$ -isovaleryloxy-6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol (esculentin B) from the Samydaceae family, particularly *Casearia esculenta* and their medicinal use**. EP 0916663A1, 12 Nov. 1998, 19 May 1999.
- BABAEI, S.; BAYAT, M.; NOURUZIAN, M.;BAYAT, M. Pentoxifylline improves cutaneous wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 700, n. 1-3, p. 165-172, 2013.
- BACHI, E. M.; Ação anti-ulcera e cicatrizante de algumas plantas brasileiras, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 93-100, 1986.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de casearinas em *Casearia sylvestris***. 2004. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- BASILE, A. C.; SERTIÈ, J. A. A.; PANNIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*. I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.30, p.185-197, 1990.
- BHAR, R.; MAITI, S.K.; GOSWAMI, T.K.; PATRA, R.C., GARG, A.K.;CHHABRA, A.K. Effect of dietary vitamin C and zinc supplementation on wound healing, immune response and growth performance in swine. **The Indian Journal of Animal Sciences**, v. 73, p. 674–677, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRUSTOLIN, E.V.; SKARE, T.L.; NASSIF, P.A.; BIONDO-SIMÕES, M. de L.; et al. Wound healing under the effect of iodine cadexomer in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 27, n. 12, p. 874-879, 2012.

CADER, M.Z.; FILER, A.; HAZLEHURST, J.; PABLO, P.; BUCKLEY, C.D.; RAZA, K. Performance of the 2010 ACR/EULAR criteria for rheumatoid arthritis: comparison with 1987 ACR criteria in a very early synovitis cohort. **Annals of The Rheumatic Diseases**, v. 70, p. 949-955, 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor B (NF- B). **Planta Médica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

CAMARGO, F. G.; GOMES, E.; PANNUZIO, E.; BUENO, V. S. Uso tópico se extrato fluido de folha de guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz) topicamente em lesões de dermatite herpética. **LECTA**, v.11, p.1217, 1993.

CAMARGO, F. G.; PEREIRA, J. A.; BUENO, V. S.; GOMES, E.; ANDO, T. Ação do extrato alcoólico de guaçatonga diluído e tamponado em subcutâneo de camundongo – Parte II – Estudo ecológico. **LECTA**, v.14, n.1, p.61-86, 1996.

CAMINHOÁ, J.M. Elementos de botânica geral e médica. V. 3. Rio de Janeiro: Tipographia Nacional, 1877, 2600 p.

CARVALHO, E.S.; SANTOS, A.G.; CAVALHEIRO, A.J. Identificação de diterpenos clerodânicos em diferentes órgãos de *Casearia sylvestris* Swartz. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 277-284, 2009.

CLARK, R.A.F. Wound repair: overview and general considerations. In: **The molecular and cellular biology of wound repair** (Ed.) Clark, R.A.F. New York: Plenum Press Co., 1996, p. 3-50.

CARVALHO, P. R. F.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; KINGSTON, D. G. I.; BOLZANI, V. da S. Acetylated DNA-damage clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris*. **Phytochemistry**, v.49, n.6, p.1659-1662, 1998.

CHASE, M. W.; ZMARTZTY, S.; LLEDÓ, M. D.; WURDACK, K. J.; SWENSEN, S. M.; FAY, M. F. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. **Kew Bulletin**, n. 57, p. 141-181, 2002.

CHATTERJEE, S.; PRAKASH, T.; KOTRSHA, D.; RAO, N.R.; GOLI, D. Comparative efficacy of *Tagetes erecta* and *Centella asiatica* extracts on wound healing in albino rats. **Chinese Medicine**, v. 2, p. 138-142, 2011.

CIOLI, V.; PUTZOLU, S.; ROSSI, V.; CORZA, B.P.; CORRADINO, C. The role of direct tissue contact in the production of gastrointestinal ulcers by anti-inflammatory drugs in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 50, p. 283-289, 1979.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). **Robbins pathologic basis of disease**. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 3, p. 50-88.

CORREA, M. P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas*. Brasília: Ministério da Agricultura/IBDF, p. 514-516, 1975.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S.L. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1231, 1989.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 6 ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2000.

CSUPOR, D.; BLAZSÓ, G.; BALOGH, A.; HOHMANN, J. The traditional Hungarian medicinal plant *Centaurea sadleriana* Janka accelerates wound healing in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 193-195, 2010.

CURY, V. C. **Eficácia terapêutica da *Casearia sylvestris* sobre herpes labial e aplicabilidade em saúde coletiva**. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

DA SILVA, S.L.; CALGAROTTO, A.K.; CHAAR, J.S.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of ellagic acid derivatives isolated from *Casearia sylvestris* Sw aqueous extract with anti-PLA2 activity. **Toxicon**, v 52, n. 6, p. 655-666, 2008.

DA SILVA, S.L.; CHAAR, J.S.; YANO, T. Chemotherapeutic potencial of two gallic acid derivate compounds from leaves of *Casearia sylvestris* Sw (Flacourtiaceae). **European Journal of Pharmacology**. v. 608, p. 76-83, 2009.

DARLING, R.L.; ROMERO, J.J.; DIAL, E.J.; AKUNDA, J.K.; ANGENBACH, R.; LICHTENBERGER, L.M. The effects of aspirin on gastric mucosal integrity, surface hydrophobicity, and prostaglandin metabolism in cyclooxygenase knockout mice. **Gastroenterology**, v. 127, n. 1, p. 94-104, 2004.

DAUER, A.; METZNER, P.; SCHIMMER, O. Proanthocyanidins from the bark of *Hamamelis virginiana* exhibit antimutagenic properties against nitroaromatic compounds. **Planta Médica**, v. 64, n. 4, p. 324-327, 1998

DUWIEJUA, M.; ZEITLIN, I.J.; WATERMAN, P.G.; GRAY, A.I. Anti-inflammatory activity of *Polygonum bistorta*, *Guaiaecum officinale* and *Hamamelis virginiana* in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 46, n. 4, p. 286-290, 1994.

ELVIN-LEWIS, Memory. Should we be concerned about herbal medicines? **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdam, v. 75, p. 141-164, 2001.

ERDELMEIER, C.A.J.; CINATL, J.Jr.; RABENAU, H.; DOERR, H.W.; BIBER, A.; KOCH, E. Antiviral and antiphlogistic activities of *Hamamelis virginiana* bark. **Planta Médica**, v. 62, n. 3, p. 241-245, 1996

ESTEVES, I.; SOUZA, I. R.; RODRIGUES, M.; CARDOSO, L. G. V.; SANTOS, L. S.; SERTIÈ, J. A. A.; PERAZZO, F. F.; LIMA, L. M.; SCHNEEDORF, J. M.; BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C. T. Gastric antiulcer and anti-inflammatory activities of the essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 101, p. 191-196, 2005.

ESPÍNDOLA, L. S.; VASCONCELOS JUNIOR, J. R.; DE MESQUITA, M. L.; MARQUIE, P.; DE PAULA, J. E.; MAMBU, L.; SANTANA, J. M. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, n. 11, p. 1093-1095, 2004.

ETSE, J. T.; GRAY, A. I.; THOMAS, D. W.; WATERMAN, P. G. Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2489-2492, 1989.

Farmacopéia Brasileira, 5ª edição, v. I, p. 202, 2010.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds  $\alpha$ -humulene and (-)-trans caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228-236, 2007.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; FONTENELE, J. B.; PESSOA, O. D.L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, v.11, p. 315–322, 2004.

FERREIRA, P.M.P.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BARROS, F.W.A.; MARTINS, A.M.A.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SANTOS, A.G.; PESSOA, C. Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011.

FERREIRA, P.M.P.; SANTOS, A.G.; TININIS, A.G.; COSTA, P.M.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 188, p. 497-504, 2010.

FIORUCCI, S.; MELLI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 1433, 2001.

GANJALI, A.; SOTOUDEH, A.; JAHANSHAH, A.; TAKHTFOOLADI, M.A.; BAZZAZAN, A.; ROODBARI, N., et al. *Otostegia persica* extraction on healing process of burn wounds. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 407-411, 2013.

GARLICK, J.A.; TAICHMAN, L. Fate of human keratinocytes during reepithelialization in an organotypic culture model. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 70, n. 6, p. 916-924, 1994.

GARTNER, L.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia** – em cores. 2.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2003.

GIULIET, A. & E. FORERO. Workshop “Diversidade taxonômica e padrões de distribuição das angiospermas brasileiras-Introdução”. **Acta Botânica Brasílica**, v. 4, n. 1, p. 3-10, 1990.

GOMES, C. L. N.; MACIEL, M. C. G.; GUERRA, R. N. M.; ABREU-SILVA, A. L.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação do efeito cicatrizante da *Casearia sylvestris* Swartz (guaçatonga) em camundongos. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 3, n. 2, p. 48-55, 2005.

GOMES, C.S.; CAMPOS, A.C.L.; TORRES, O.J.M.; VASCONCELOS, P.R.L.; MOREIRA, A.T.R.; TENÓRIO, S.B.; TÂMBARA, E.M.; SAKATA, K.; MORAES JUNIOR, H.; FERRER, A.L. Efeito do extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21(Suplemento 2), 2006.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.; BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11<sup>th</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 2006.

GOTTLIEB, O.R.; BORIN, M.R. de M.B.; PAGOTTO, C.L.A. da C.; ZOCHER, D.H.T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

GRILLO, H.C.; POSTSAID, M.S.; Studies in wound healing. IV. Retardation of contraction by local irradiation, and observations relating to the origin of fibroblast in repair. **Annals of Surgery**, v. 154, p. 741-750, 1961.

GRINNELL, F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. **Journal Cell Science**, Colchester, v. 1, p. 1-5, 1992.

HABTERMARIAM, S. Hamamelitannin from *Hamamelis virginiana* inhibits the tumour necrosis factor- $\alpha$  (TNF) induced endothelial cell death *in vitro*. **Toxicon**, v. 40, p. 83-88, 2002.

HARTISCH, C.; KOLODZIEJ, H. Galloylhamamelosides and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 2590-2595, 1996.

HARTISCH, C.; KOLODZIEJ, H.; VON-BRUCHHAUSEN, F. Dual inhibitory activities of tannins from *Hamamelis virginiana* and related polyphenols on 5-lipoxygenase and lyso-PAF-acetyl-CoA acetyltransferase. **Planta Médica**, v. 63, n. 2, p. 106-110, 1997.

HOEHNE, F.C. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. São Paulo: Graphica, 1939.

HOFFMAN, J.G. Wright's Hypothesis: Its Relation to Volume Growth of Tissue Cells and Mitotic Index. **Science**, v. 106, n. 2754, p. 343-344, 1947.

HUGHES-FORMELLA, B.J.; BOHNSACK, K.; RIPPKE, F.; BENNER, G.; RUDOLPH, M.; TAUSCH, I.; GASSMUELLER, J. Anti-inflammatory effect of hamamelis lotion in a UVB erythema test. **Dermatology**, v. 196, n. 3, p. 316-322, 1998.

HU, L.; LU, Z.; WANG, B.; CAO, J.; MA, X.; TIAN, Z. et al. Closure of skin incisions by laser-welding with a combination of two near-infrared diode lasers: preliminary study for determination optimal parameters. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, n. 3, p. 038001-1-038001-7, 2011.

ITOKAWA, H.; TOTSUKA, N.; TAKEYA, K.; WATANABE, K.; OBATA, E. New Antitumor Principles, Casearins A-F, from *Casearia sylvestris* Sw. (Flacourtiaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.36, n.4, p.1585-1588, 1990.

JAYASHEELAN, V.; MAHESWARI, A.U.; SHANMUGARATHINAM, A.; PURATCHIKODY, A. Wound healing potential of *Psammaphysilla purpurea*: a pharmacological and biochemical evaluation. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 6, p. 1325-1329, 2010.

JUNGES, M.J.; SCHENKEL, E.P.; SIMÕES, C.M.O. Flavonoides da *Casearia sylvestris* Sw. (erva-de-bugre). **Caderno de Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 95-101, 1985

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9.ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; KANARSA, T.; BUAYAIRAKSA, M. New bioactive clerodane diterpenoids from the bark of *Casearia grewiaifolia*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 2, p. 183-188, 2005.

KAPU, S.D.; NGWAI, Y.B.; KAYODE, O.; AKAH, P.A.; WAMBEKE, C.; GAMANIEL, K. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 7-13, 2001.

KHALIFEH, M.S.; HANANEH, W.; AL-RUKIBAT, R.; OKOUR, O.; BOUMEZRAG, A. Clinical and histopathological evaluation of MDP/collagen induced arthritis rat model (MCIA) after treatment with *Urtica dioica*, *Plantago major* and *Hypericum perforatum* L. herbal mixture. **Experimental Animals**, v. 52, n. 2, p. 101-110, 2008.

KIM, Y.J.; KETTER, R.; STEUDEL, W.I. Prognostic significance of the mitotic index using the mitosis marker anti-phosphohistone H3 in meningiomas. **American Journal Clinical Pathology**, v.128, n. 1, p. 118-125, 2007

KOCA, U.; SÜNTAR, I.P.; KELES, H.; YESILADA, E.; AKKOL, E.K. *In vivo* anti-inflammatory and wound healing activities of *Centaurea iberica* Trev. ex Spreng. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 551-556, 2009.

KORTING, H.C.; SCHAEFER-KORTING, M.; HART, H.; LAUX, P.; SCHMID, M. Anti-inflammatory activity of *Hamamelis* distillate applied topically to the skin influence of vehicle and dose. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 44, n. 4, p. 315-318, 1993.

- LIBROWSKI, T.; CZARNECKI, R.; CZEKAJ, T.; MARONA, H. New xanthone derivative as potent anti-inflammatory agents. **Medicina (Kaunas)**, v. 41, p. 54-58, 2005.
- LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SOUZA Jr., P.T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville for anti-inflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 218-220, 1998.
- LIU, H.; LINS, S.; XIAO, D.; ZHENG, X.; GU, Y.; GUO, S. Evaluation of the wound healing potential of *Reina Draconis* (*Dracena cochinchinensis*) in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 468-477, 2010.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 220-221, 2002.
- LUZ, S.F.B.; SATO, M.E.O.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Parâmetros **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 7-8, n. 1, 1998.
- MAJNO, G.; Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. **American Journal of Pathology**, p. 153:1035, 1998.
- MANDELBAUM, S.H.; DiSANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- MAROIS, Y.; CADI, R.; GOURDON, J.; FATOURAEE, N.; KING, M.W.; ZHANG, Z.; et al. Biostability, inflammatory response, and healing characteristics of a fluoropassived polyester-knit mesh in the repair of experimental abdominal hernias. **Artificial Organs**, v. 24, n. 7, p. 533-543, 2000.
- MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. **Science**. Stanford, v. 276, p. 75-81, 1997.
- McINNES, I.B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nature Review/Immunology**, v. 7, June 2007.
- MEKONNEN, A.; SIDAMO, T.; ASRES, K.; ENGIDAWORK, E. In vivo wound healing activity and phytochemical screening of the crude extract and various fractions of *Kalanchoe peltata* A. Rich (Crassulaceae) leaves in mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 638-646, 2013.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857-862, 1996b.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.

MORAES, S. M.; MACHADO, M. I. L. Essential oil of *Casearia grandiflora* Camb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, p. 697-698, 1997.

MORITA, H.; NAKAYAMA, M.; KOJIMA, H.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H.; SCHENKEL, E.P.; MOTIDOME, M. Structures and cytotoxic activity relationship of casearins, new clerodane diterpenes from *Casearia sylvestris* Sw. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 3, p. 693-697, 1991.

MOTA, M.L.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J.M.; Anti-inflammatory actions of tannins isolated from the bark of *Anacardium occidentale* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 13, p. 289-300, 1985.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 853-859, 1999.

NEVES, M. do C.L.C.; JORGE NETO, J.; IFA, D.R.; FRACASSO, J.F.; SILVA, R.F.P.; LEPERA, E.Z.P. Estudo dos efeitos farmacológicos de hamamelis e barbatimão. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992, Curitiba. Resumos, Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992b.

NOGUEIRA, R. T.; SHEPERD, G. J.; LAVERDE JÚNIOR, A.; MARSAIOLI, A. J.; IMAMURA, P. M. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1153-1157, 2001.

OBERLIES, N.H.; BURGESS, J.P.; NAVARRO, H.A.; PINOS, R.E.; FAIRCHILD, C.R.; PETERSON, R.W.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D.; WANI, M.C.; WALL, M.E. Novel bioactive clerodane diterpenoids from the leaves and twigs of *Casearia sylvestris*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 2, p. 95-99, 2002.

OLIVEIRA, A.M.; SANTOS, A.G.; SANTOS, R.A.; CSIPAK, A.R.; OLIVAT, C.; SILVA, I.C.; FREITAS, M.B.; BASSI, C.L.; CAVALHEIRO, A.J.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S.; SAKAMOTO-HOJO, E.T.; TAKAHASHI, C.S.; SOARES, C. Ethanolic extract of *Casearia sylvestris* and its clerodane diterpen (caeargrewiin F) protect against DNA damage at low concentrations and cause DNA damage at high concentrations in mice's blood cells. **Mutagenesis**, vol. 24, n. 6, pp. 501-506, 2009.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v.28, p. 2375-2382, 2001.

PERES, V.; NAGEM, T.J.; DE OLIVEIRA, F.F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 55, p. 683-710, 2000.

PEREIRA, B. M. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina popular III. Atividade antiedematogênica. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 85-86, 1992.

PHILIPPE, L.; GEGOUT-POTTIE, P.; GUINGAMP, C.; BORDJI, K.; TERLAIN, B.; NETTER, P.; GILLET, P. Relations between functional, inflammatory, and degenerative parameters during adjuvant arthritis in rats. **American Journal Physiology**, v. 273, n. 2, p. 1550-1556, 1997.

PIERCE, G.F.; TARPLEY, J.E.; YANAGIHARA, D.; MUSTOE, T.A.; FOX, G.M.; THOMASON, A. Platelet derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in derma wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. **American Journal of Pathology**, v. 140, n. 6, p. 1375-1388, 1992.

PRANCE, G.T. Floristic inventory of the tropics: where do we stand? **An. Missouri Botanical Garden**, v. 64, p. 559-684, 1997.

QIU, Z.; KWON, A.H.; KAMIYAMA, Y. Effects of plasma fibronectin on the healing of full-thickness skin wounds in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Surgical Research**, v. 138, n. 1, p. 64-70, 2007.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; DALE, M.M. "Inflamação e Anti-inflamatórios". In: **Farmacologia**, 4ª Ed., Guanabara Koogan, 2001.

RASLAN, D. S.; JAMAL, C. M.; DUARTE, D. S.; BORGES, M. H.; DE LIMA, M. E. Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. **Bolletín Chimie et Farmacie**, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2002.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, 134, p. 725-732, 2011.

RAYNER, T.E.; COWIN, A.J.; ROBERTSON, J.G.; COOTER, R.D.; HARRIES, R.C.; REGESTER, G.O., et al. Mitogenic whey extract stimulates wound repair activity in vitro and promotes healing of rat incisional wounds. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 278, n. 6, p. 1651-1660, 2000.

ROTE, N.S. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HEUTHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby, cap. 7, p. 205-236, 1998.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª ed. Elsevier Editora, 2010.

RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇALVES, L. C.; PEREIRA, N. A. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas. I – Atividades analgésica e antiinflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 71, n. 3, p. 54-56, 1990.

RYAN, G.B.& MAJNO, G. Acute inflammation. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 86, n. 1, p.184-271, jan. 1977.

SANTOS, A. G. **Identificação dos princípios ativos antiulcerogênicos do extrato das folhas de *Casearia sylvestris*: contribuição para o desenvolvimento de um fitoterápico**. 2008. 335f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-graduação em Química, Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista-UNESP, Araraquara.

SANTOS, A.G.; FERREIRA, P.M.P.; VIEIRA JÚNIOR, G.M.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; SILVA, G.H.; BOLZANI, V.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C. do Ó; CAVALHEIRO, A.J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casaria sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. **Chemistry and Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

SANTOS, A.G.; PEREZ, C.C.; TININIS, A.G.; BOLZANI, V.S.; CAVALHEIRO, A.J. Clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Swartz. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1100-1103, 2007.

SANTRAM, L.; SINGHAI, A. Preliminary pharmacological evaluation of *Martynia annua* Linn leaves for wound healing. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 6, p. 421-427, 2011.

SASSIOTO, M. C. P.; CARDOSO FILHO, N.; FACCO, G. G.; SODRÉ, S. T.; NEVES, N.; PURISCO, S. U.; FARIAS, A. G. Efeito da *Casearia sylvestris* no reparo ósseo com matriz óssea bovina desvitalizada em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 6, p. 637-641, 2004.

SCAVONE, O.; GRECCHI, R.; PANIZZA, S.; SILVA, R. A. P. S. Guaçatonga (*Casearia sylvestris* Swartz): aspectos botânicos da planta, ensaios fitoquímicos e propriedade cicatrizante da folha. **Anais de Farmácia e Química de São Paulo**, v.19, n.1, p.73-81, 1979.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Florianópolis. UFSC: UFRGS, cap. 15, p. 371-400, 2007.

SCHIMITZ, L.M.; BACHER, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 19-25, 2005.

SCHNEIDER, N. F.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; FLACH, A. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de *Casearia sylvestris* Swart. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 87, n. 4, p. 112-114, 2006.

SCHOENFELDER, T; PICH, C.T.; GEREMIAS, R.; ÁVILA, S.; DAMINELLI, E.N.; PEDROSA, R.C.; BETTIOL, J. Antihyperlipidemic effect of *Casaria sylvestris* methanolic extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 465-467, 2008.

SEIDEL, M.F.; KECK, R.; VETTER, H. ICAM-1/LFA-1 expression in acute osteodestructive joint lesions in collagen-induced arthritis in rats. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 45, n. 9, p. 1247-1253, 1997.

SERTIÉ, J.A.A. Pharmacological assay of *Casearia sylvestris*, I: Preventive anti-ulcer activity and toxicity of the leaf crude extract. **Journal Ethnopharmacology**, v. 30, p. 185-197, 1990.

SERTIÉ, J.A.A.; CARVALHO, J. C. T.; PANIZZA, S. Antiulcer activity of the crude extract from the leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n.2, p. 112-119, 2000.

SHARMA, S.P.; AITHAL, K.S.; SRINIVASAN, K.K.; UDUPA, A.L.; KUMAR, V.; KULKARNI, D.R. Anti-inflammatory and wound healing activities of the crude alcoholic extracts and flavonoids of *Vitex leucoxydon*. **Fitoterapia**, v. 61, p. 263–265, 1990.

SHERWOOD, E.R.& TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice Research Clinical Anaesthesiology**, London, v. 18, n. 3, p. 385-405, sep. 2004.

SILVA, F.B.; ALMEIDA, J.M.; SOUSA, S.M.G. Natural medicaments in endodontics – a comparative study of the anti-inflammatory action. **Brazilian Oral Research**, v. 18, n. 2, p. 174-179, 2004.

SILVA, R. A. D. **Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil I**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.503-504, 1926.

SILVA, A.C.;BALZ, D.; SOUZA, J.B.D.; MORSCH, V.M.; CORRÊA, M.C.; ZANETTI, G.D.; MANFRON, M.P.; SCHETINGER, M.R.C. Inhibition of NTPDase 5'-nucleotidase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase and acetylcholinesterase activities by subchronic treatment with *Casearia sylvestris*. **Phytomedicine**, v. 13, p. 509-514, 2006.

SILVA, S.L.; CHAAR. J.S.; DAMICO, D.C.S; FIGUEIREDO, P.M.S.; YANO, T. Antimicrobial activity of ethanol extract from leaves of *Casearia sylvestris*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 347-351, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN J.R. **Plantas da Medicina Popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade; 1986.

SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 833 p, 2007.

SIMÕES, M.J.; CABRAL, A.C.V.; BOYACIYAN, K.; KULAY JUNIOR, L.; SASSO, W.S. Aspectos ultra-estruturais dos fibroblastos e dos macrófagos durante o processo de reparação da pele de ratos. **Revista Paulista de Medicina**, São Paulo, v. 104, n. 3, p. 132-1134, 1986.

SIMPLICIO, F.G.; PINHEIRO, C.C.S.; CONRADO, G.G.; BARBOSA, G.S.; SANTOS, P.A.; PEREIRA, M.M.; LIMA, E.S. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 282-286, 2012.

SCHMITZ, L.M.; BACHER, S. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v.4, p. 19-25, 2005.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; CHASE, M. W.; MORT, M. E.; ALBACH, D. C.; ZANIS, M.; SAVOLAINEN, V.; HAHN, W. H.; HOOT, S. B.; FAY, M. F.; AXTELL, M.; SWENSEN, S. M.; PRINCE, L. M.; KRESS, W. J.; NIXON, K. C.; FARRIS, J. A. Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, *rbcL*, and *atpB* sequences. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 133, p. 381–461, 2000.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PALAZZO de MELLO, J.C.; MENTZ, L.A.; ROS PETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. Universidade UFSC, p. 577-611, 2007.

SORG, H.; SCHULZ, T.; KRUEGER, C.; VOLLMAR, B. Consequences of surgical stress on the kinetics of skin wound healing partial hepatectomy delays and functionally alters dermal repair. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 3, p. 367-377, 2009.

SOUSA, F. G.; DENARDIN, R. B. N.; MOURA, N. F.; DREVS, S. Allelopathy and genotoxic potential of *Casearia sylvestris* Sw. extracts. **Allelopathy Journal**, v. 20, n. 1, p. 195-202, 2007a.

STALDELMANN, W.K.; DIGENIS, A.G.; TOBIN, G.R. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **The American Journal of Surgery**, Louisville, v. 176, (Suppl 2A), p. 26S-38S, 1998.

SÜNTAR, I.P.; AKKOL, E.K.; YALÇIN, F.N.; KOCA, U.; KELES, H.; YESILADA, E. Wound healing potential of *Sambucus ebulus* L. leaves and isolation of an active component, quercetin 3-O-glucoside. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 106-114, 2010.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 141, p. 399-436, 2003.

TININIS, A. G.; ASSONUMA, M. M.; TELASCREA, M.; PEREZ, C. C.; SILVA, M. R. S. R. M.; FAVORETO, R.; CAVALHEIRO, A. J. Composição e variabilidade química de óleo essencial de *Casearia sylvestris* SW. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 132-136, 2006.

TOBACMAN, J. K. Review of Harmful Gastrointestinal Effects of Carrageenan in Animal Experiments. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 10, p. 983-994, 2001.

TRENTAN, D.E.; TOWNES, A.S.; KANG, A.H.; DAVID, J.R. Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 146, p. 857-868, 1977.

TUMEN, I.; HAFIZOGLU, H.; KILIC, A.; DONMEZ, I.E.; SIVRIKAYA, H.; REUNANEN, M. Yields and constituents of essential oil from cones of Pinaceae spp. Natively grown in Turkey. **Molecules**, v.15, p. 5797-5806, 2010.

TUROLLA, M.S.R. **Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos**: um estudo comparativo. 2004. 145 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

VELLEY, G.C. Effect of bilateral adrenalectomy on the speed of cicatrization of small skin wounds in rats. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de J'Academie des Sciences**, v. 239, n. 25, p.1851-1853, 1954.

VIEIRA JUNIOR, G.M. **Contribuição ao estudo dos metabólitos secundários do gênero Casearia e de algumas de suas atividades biológicas**. 2010. 364f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MARQUES, L.C.; Influências da variação sazonal e tipos de secagem nas características da droga vegetal – raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 137-144, 2004.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de Tecnologia Farmacêutica**. 3<sup>a</sup> Ed. Zaragoza: Acribia. 769p, 1982.

XIE, Y.; GAO, K.; HAKKINEN, L.; LARJAVA, H.S. Mice lacking beta6 integrin in skin show accelerated wound repair in dexamethasone impaired wound healing model. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 3, p. 326-339, 2009.

ZANUSSO-JUNIOR, G.; MELO, J.O.; ROMERO, A.L.; DANTAS, J.A.; Avaliação da atividade anti-inflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 13, n. 1, p. 17-23, 2011.

YILMAZ, E.; AVCI, M.; BULUT, M.; KELESTIMUR, H.; KARAKURT, L.; OZERCAN, I. The effect of seprafilm on adhesion formation and tendon healing after flexor tendon repair in chicken. **Orthopedics**, p. 164-170, 2010.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade de desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WANG, W.; ZHAO, J.; WANG, Y.-H.; SMILLIE, T.A.; LI, X.-C.; KHAN, I.A. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Médica**, v. 75, p. 1476-1481, 2009.

WEISBERG, S.P.; HUNTER, D.; HUBER, R.; LEMIEUX, J.; SLAYMAKER, S.; VADDI, K.; CHARO, I.; LEIBEL, R.L.; FERRANTE Jr., A.W. CCR<sub>2</sub> modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 1, p. 115-124, 2006.

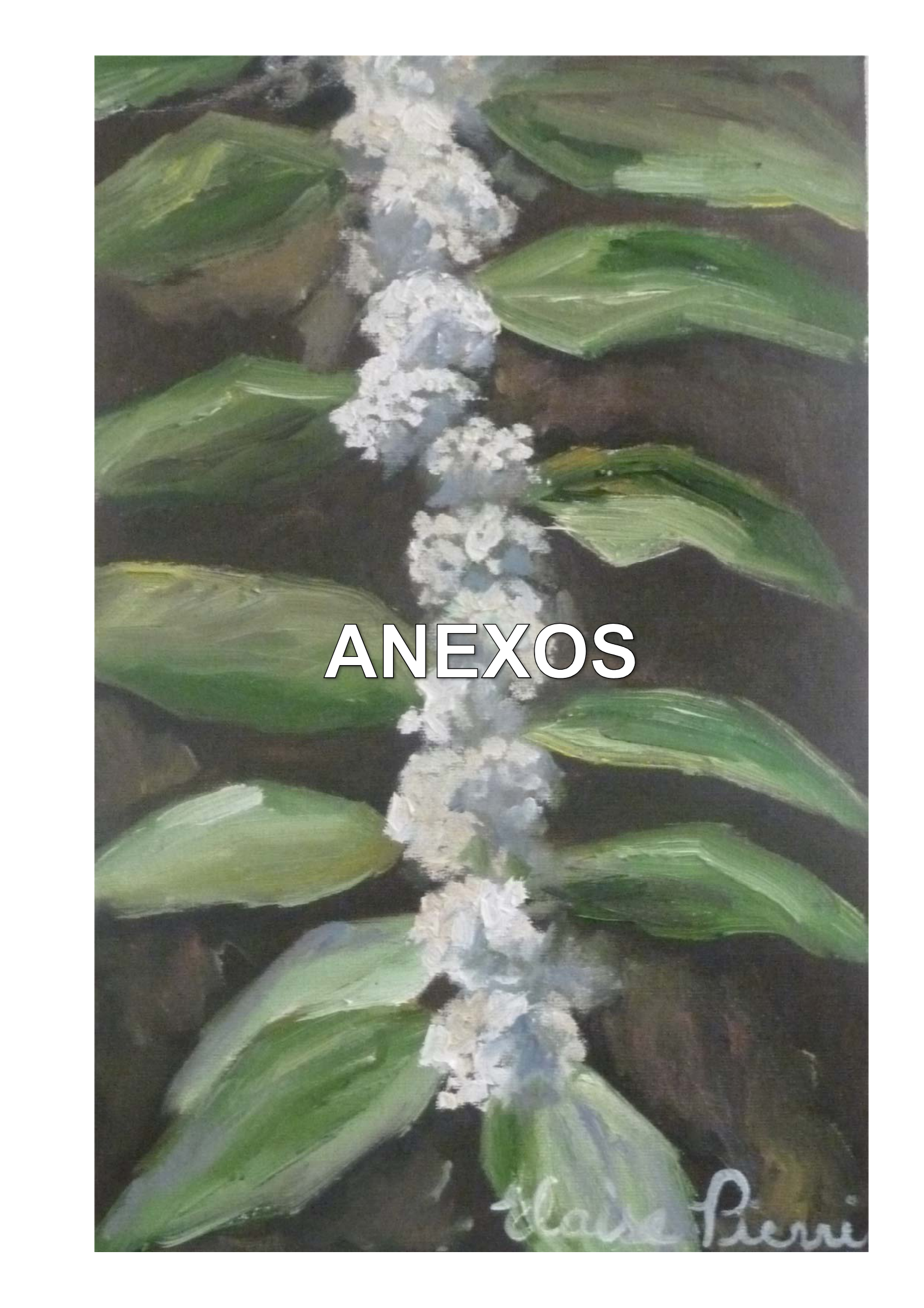
WETZLER, C.; KAMPFER, H.; STALLMEYER, B.; PFEILSCHIFTER, J.; FRANK, S. Large and sustained induction of chemokines during impaired wound healing in the genetically diabetic mouse: prolonged persistence of neutrophils and macrophages during the late phase of repair. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 245-253, 2000.

WILSON, E. A situação atual da Diversidade Biológica. In: Wilson.E.O., Org. Biodiversidade, Rio de Janeiro, Nova Fronteira, 1997.

WINTER, C; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WHO (World Health Organization) 1998. Regional office for the western pacific research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines. Manila.

WU, C.R.; LIN, W.-H.; HSEU, Y.-C.; LIEN, J.-C.; LIN, Y.-T.; KUO, T.-P.; CHING, H. Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Lingustrum* species leaves from Taiwan flora *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 127, p. 564-571, 2011.

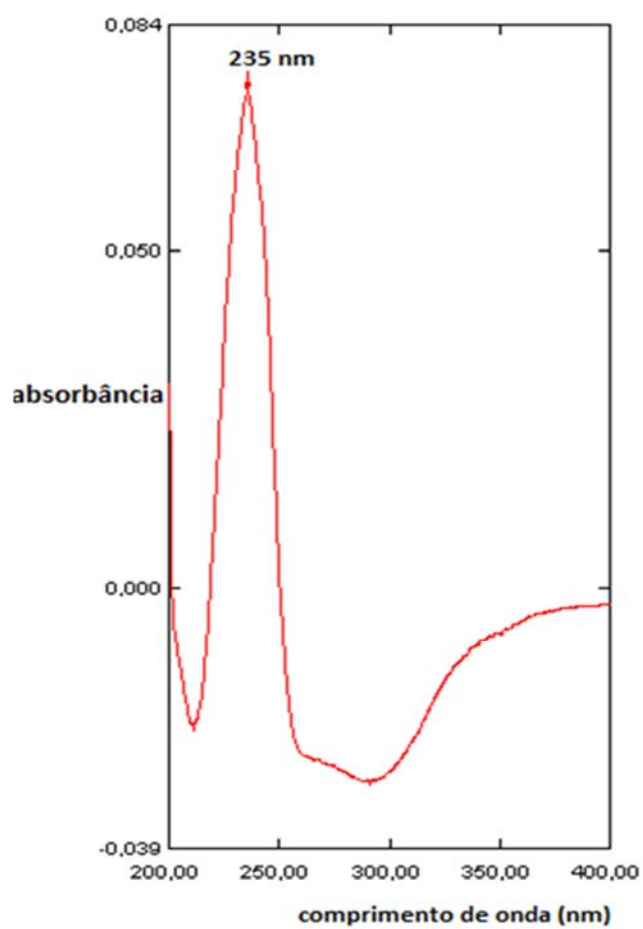
An oil painting of a plant, possibly a cornflower, with several green leaves and a central spike of small white flowers. The painting is done in a visible, textured style with thick brushstrokes. The word "ANEXOS" is overlaid in the center in a white, bold, sans-serif font.

# ANEXOS

Clare Pierre

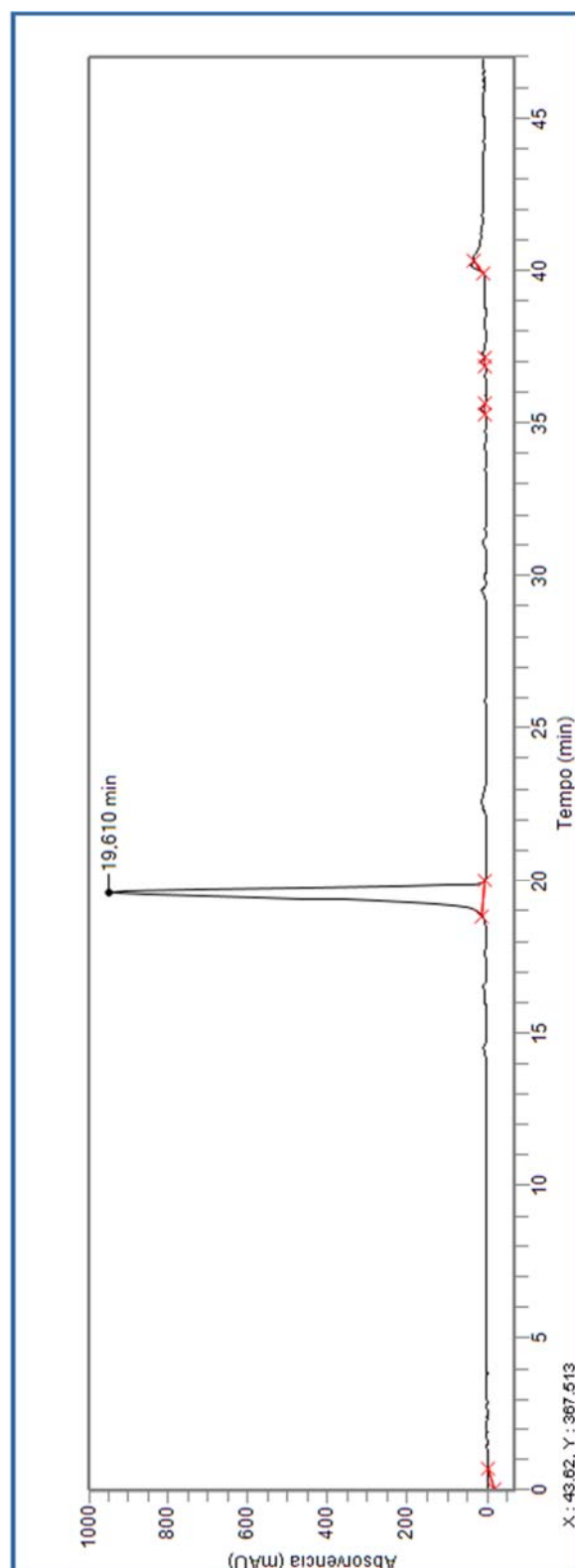
## ANEXO 1

**Figura:** Espectro de absorção no UV para casearina J



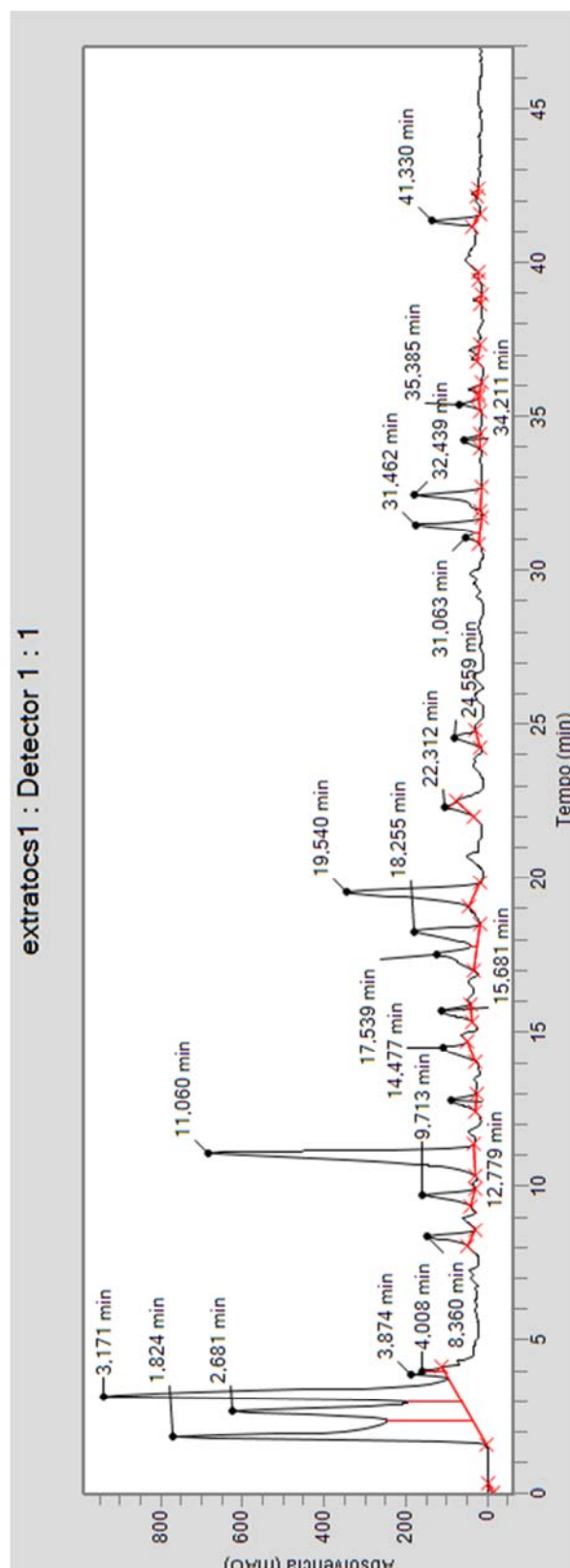
## ANEXO 2

**Figura:** Cromatograma do padrão de caseína J (CasJ) obtida em CLAE-UV. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.

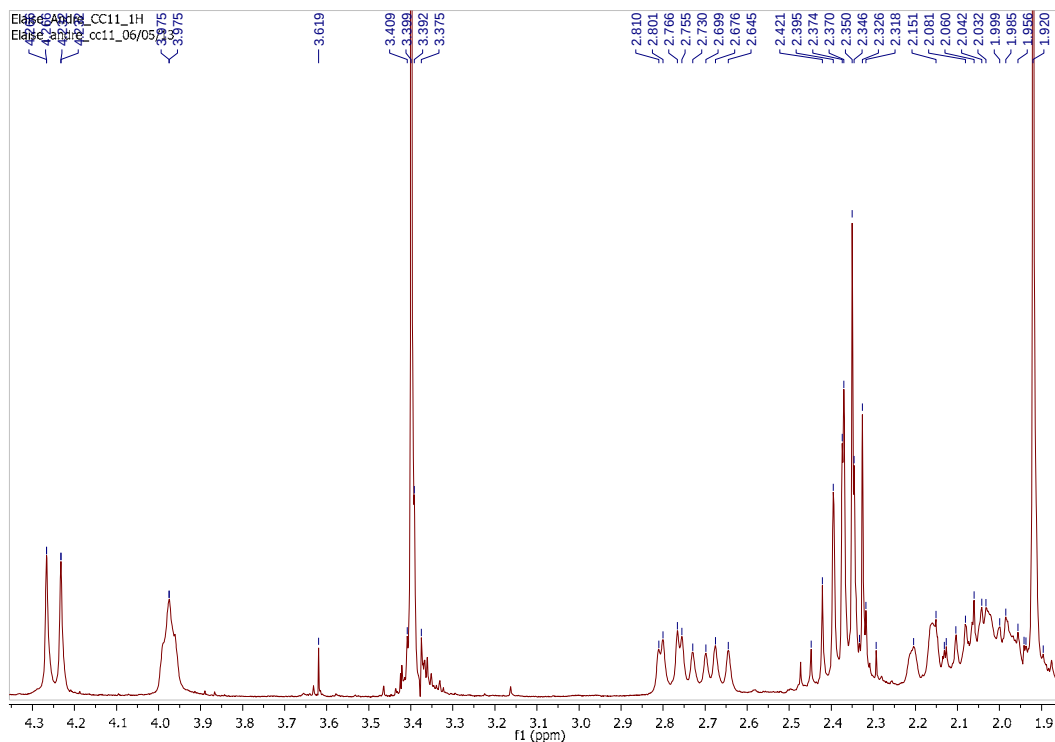


## ANEXO 3

**Figura:** Cromatograma do extrato etanólico de folhas de *C. sylvestris* (EEtCs) obtido em CLAE-UV. Condições de análise descritas no item 4.4.2.2.

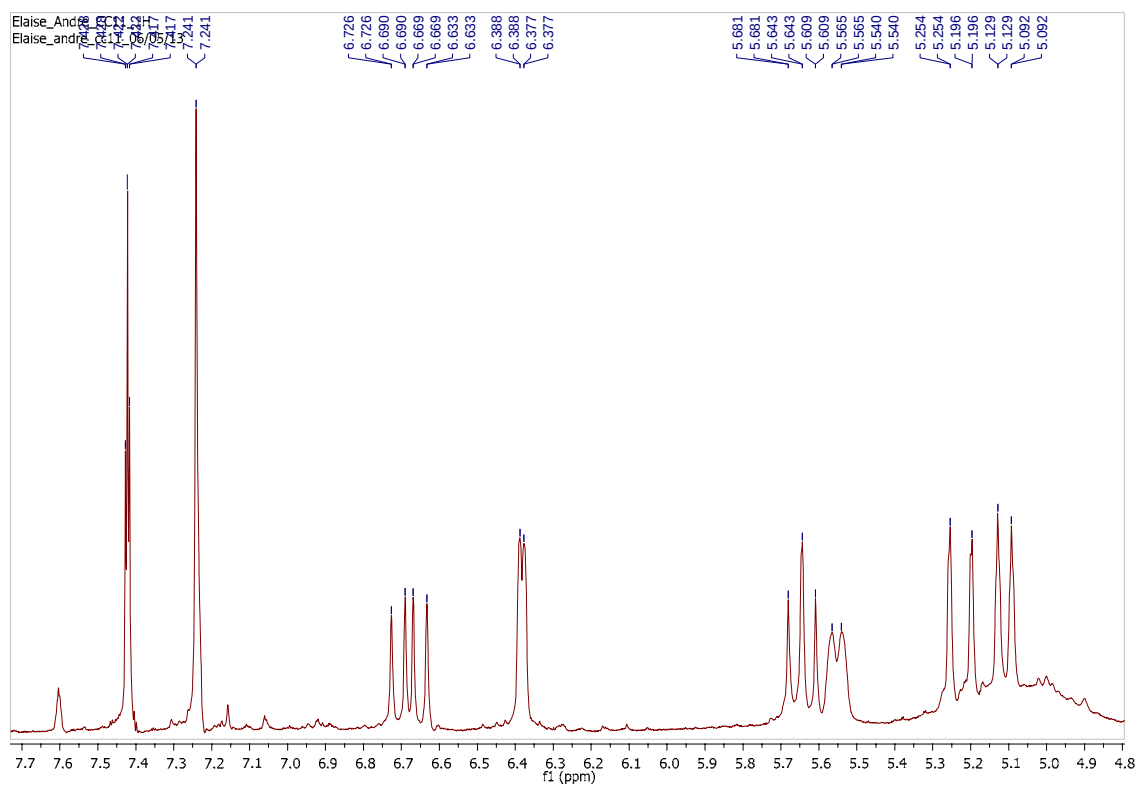






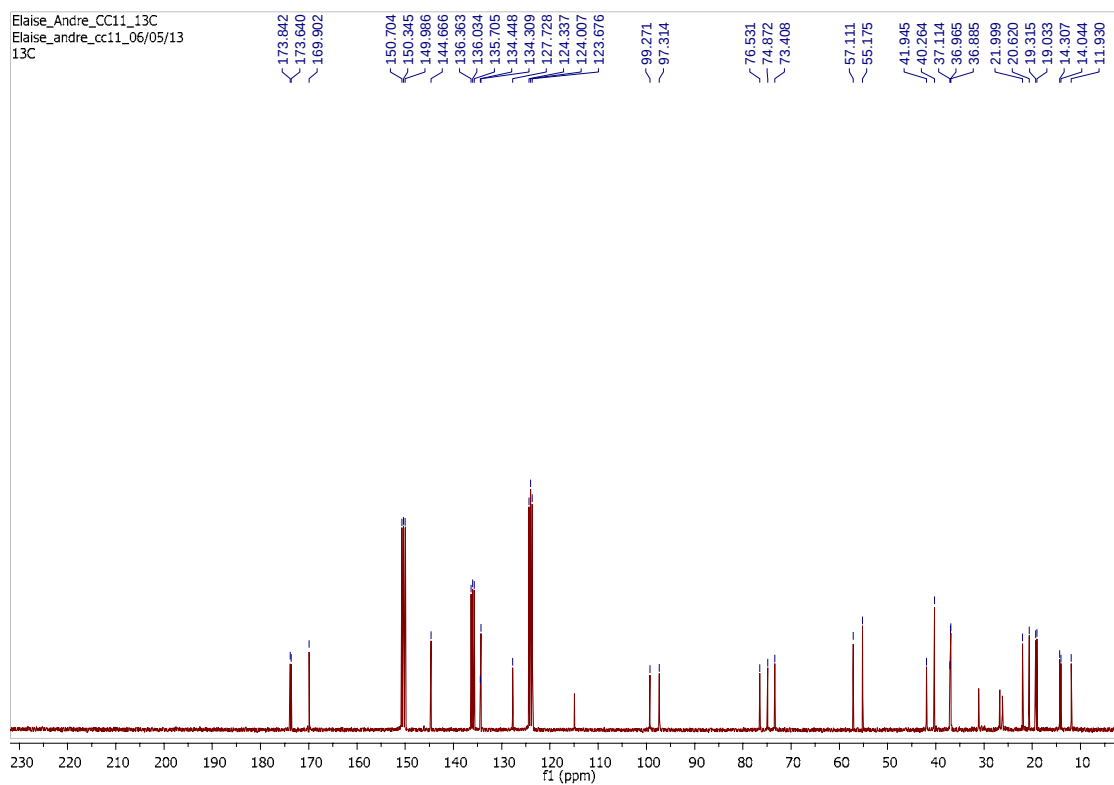
## ANEXO 6

**Figura:** Expansões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da casearina J em piridina-d<sub>5</sub> obtido a 300 MHz.



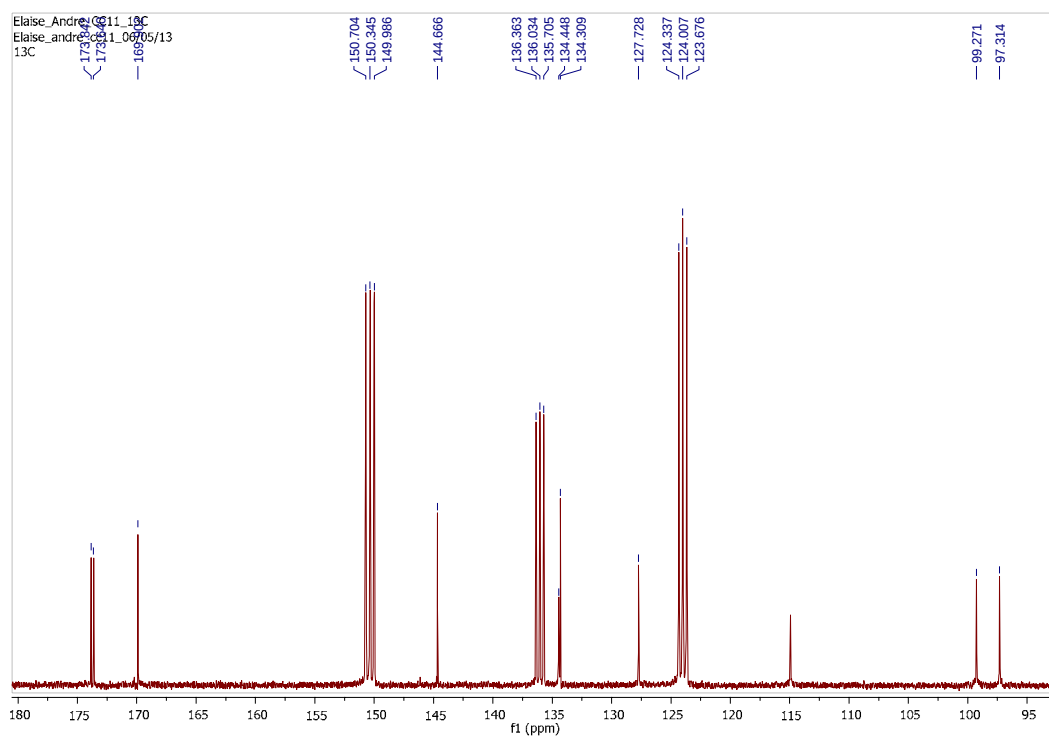
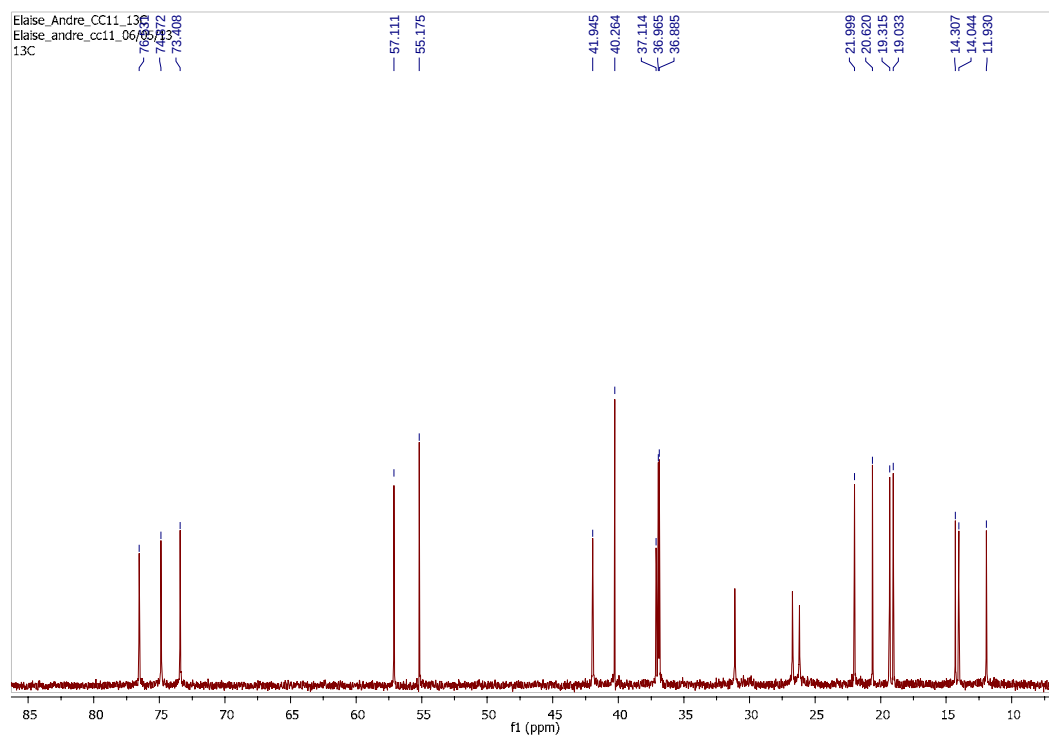
## ANEXO 7

**Figura:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da casearina J em piridina-d5 obtido a 75 MHz.



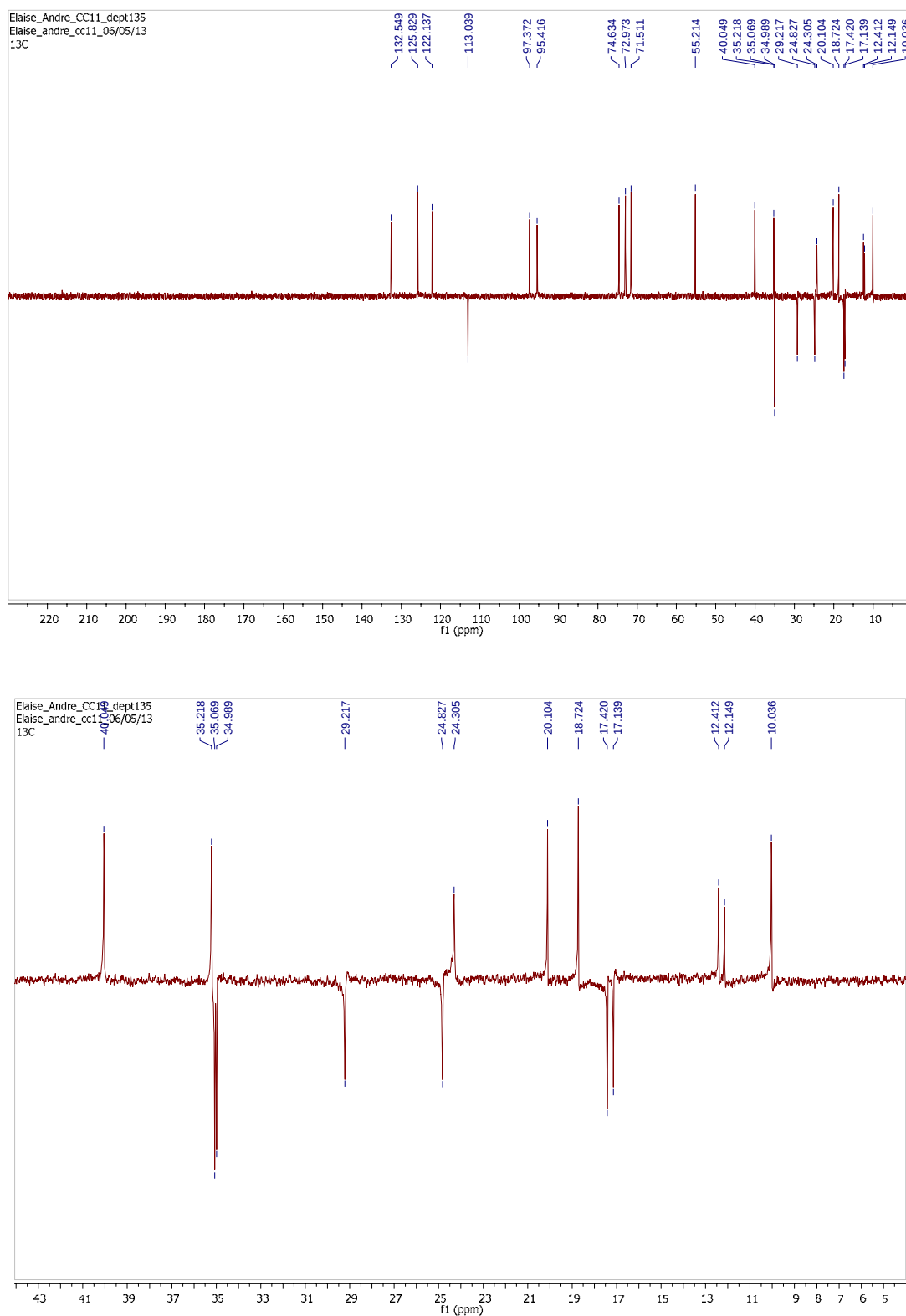
## ANEXO 8

**Figura:** Expansões do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da casearina J em piridina- $d_5$  obtido a 75 MHz.



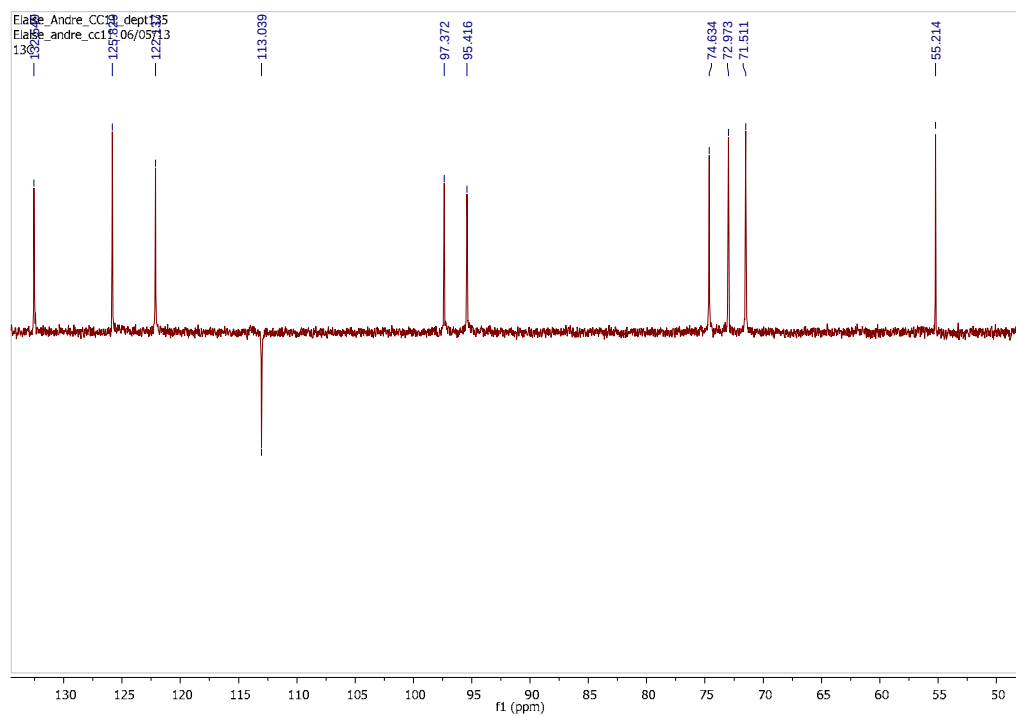
## ANEXO 9

**Figura:** Espectro de DEPT135<sup>o</sup> (incluindo expansão abaixo) da casearina J em piridina-d5 obtido a 75 MHz.



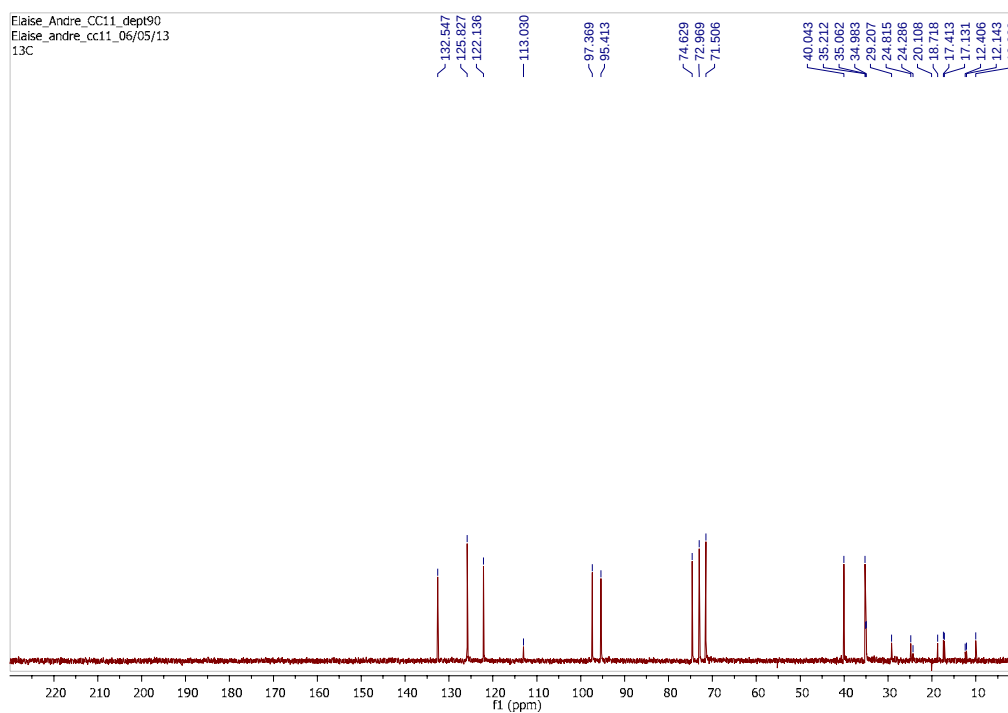
## ANEXO 10

**Figura:** Expansão do espectro de DEPT135<sup>o</sup> da casearina J em piridina-d5 obtido a 75 MHz.

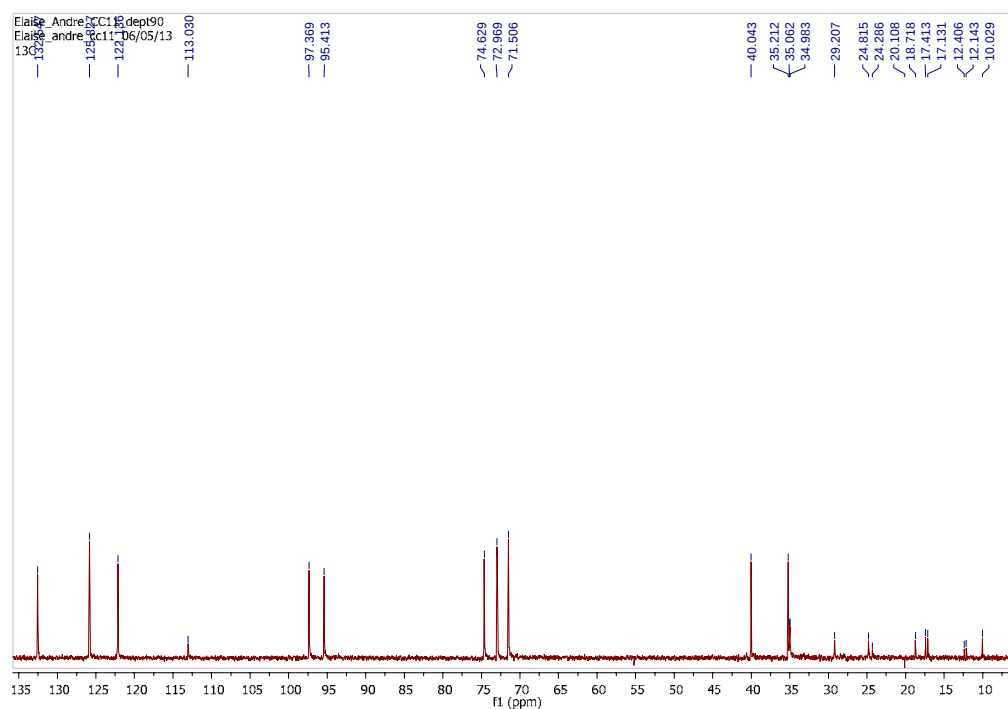


## ANEXO 11

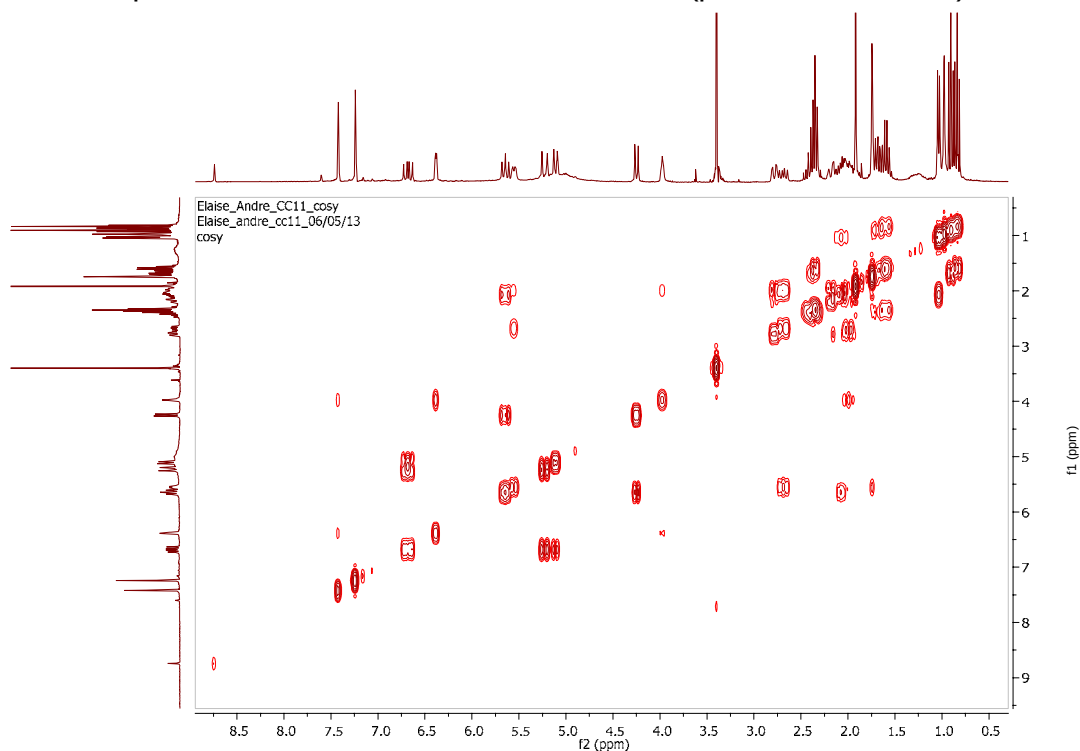
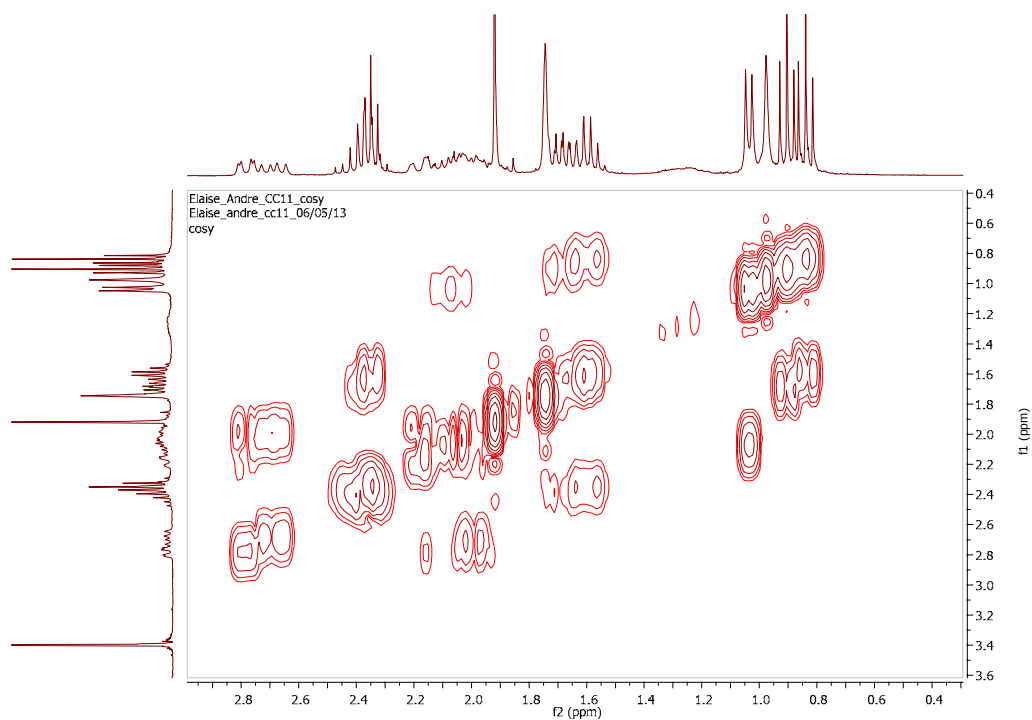
**Figura A:** Espectro de DEPT90<sup>o</sup> da casearina J em piridina-d5 obtido a 75 MHz.



**Figura B:** Expansão do espectro de DEPT90<sup>o</sup> da casearina J em piridina-d5 obtido a 75 MHz.

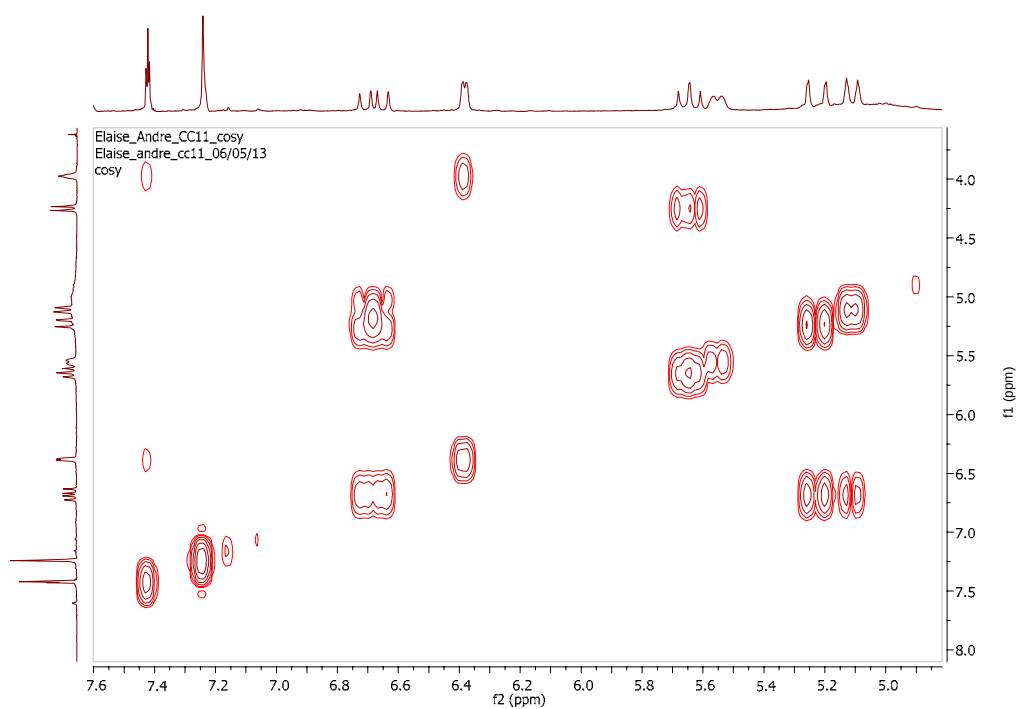
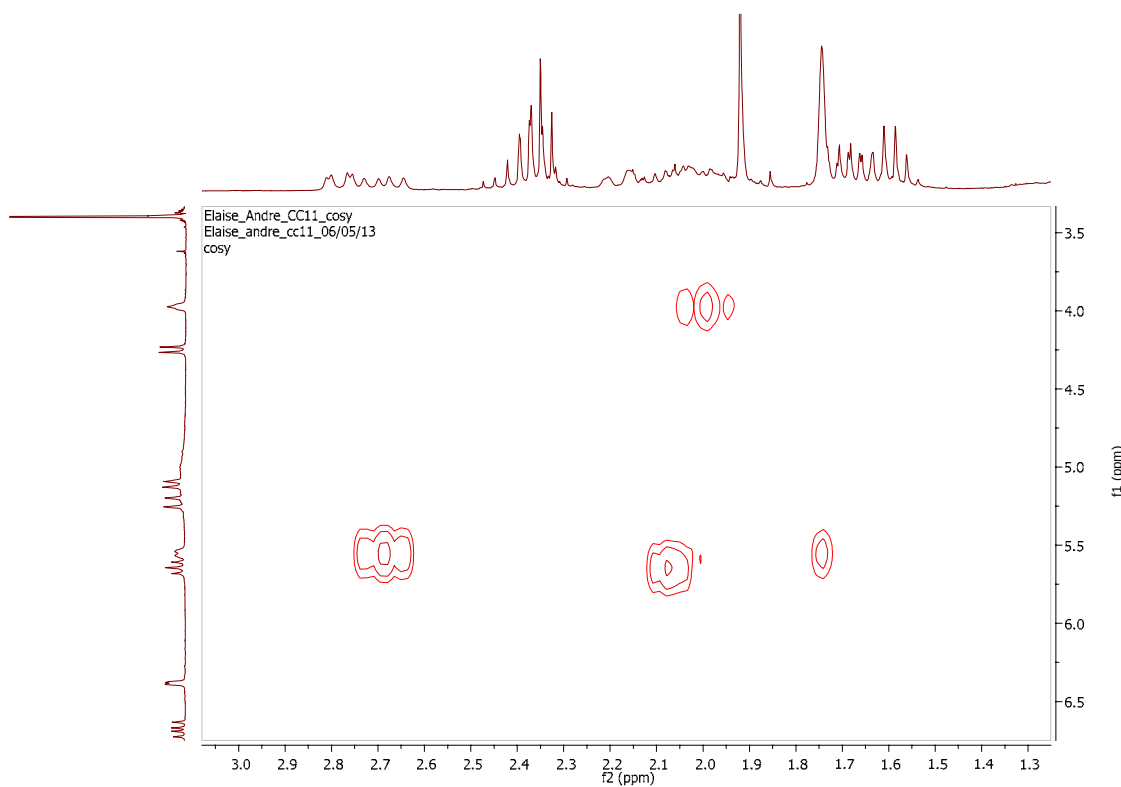


## ANEXO 12

**Figura A:** Mapa de contornos COSY da casearina J (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).**Figura B:** Expansão do mapa de contornos COSY da casearina J (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).

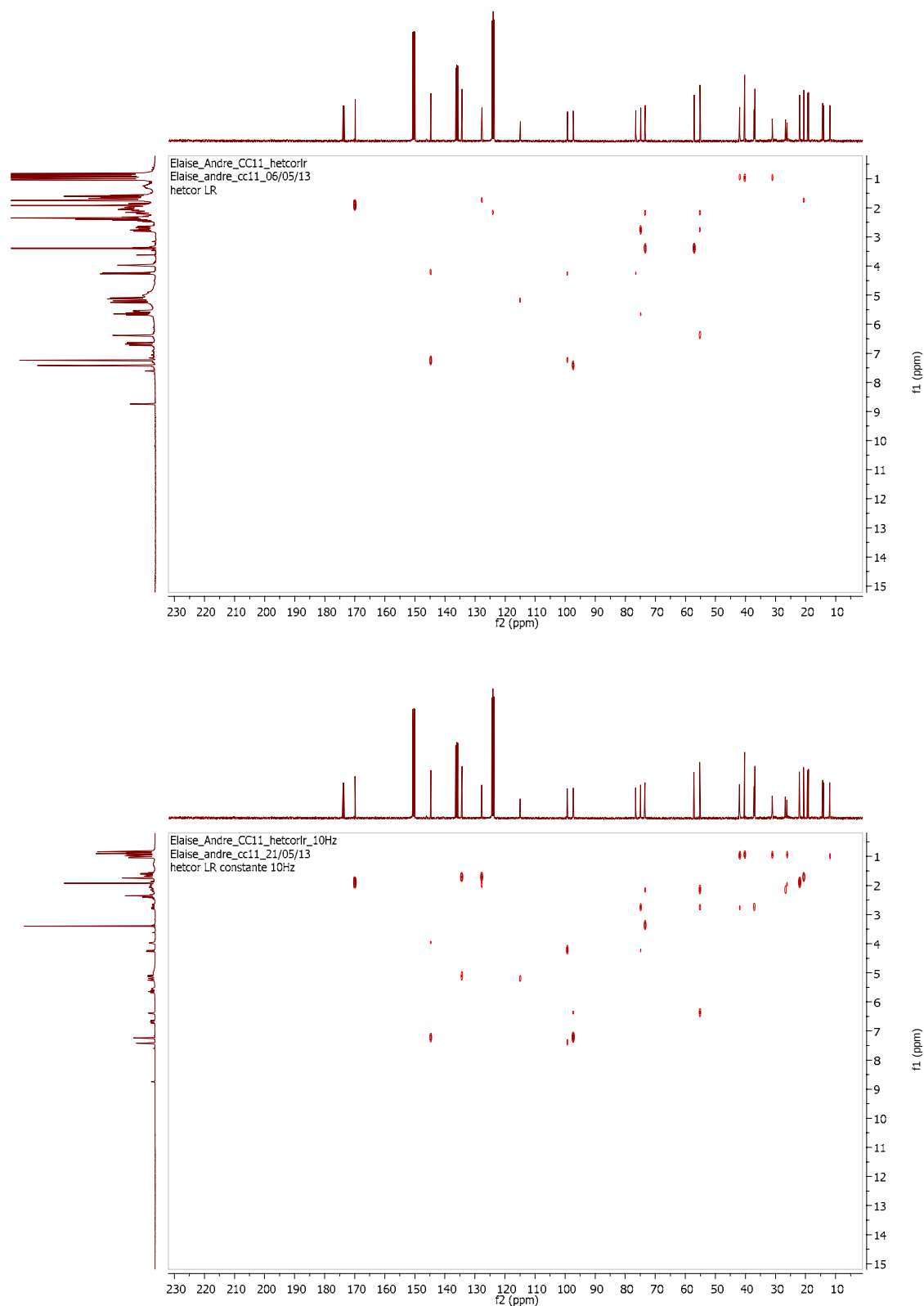
## ANEXO 13

**Figura:** Expansões do mapa de contornos COSY da casearina J (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).



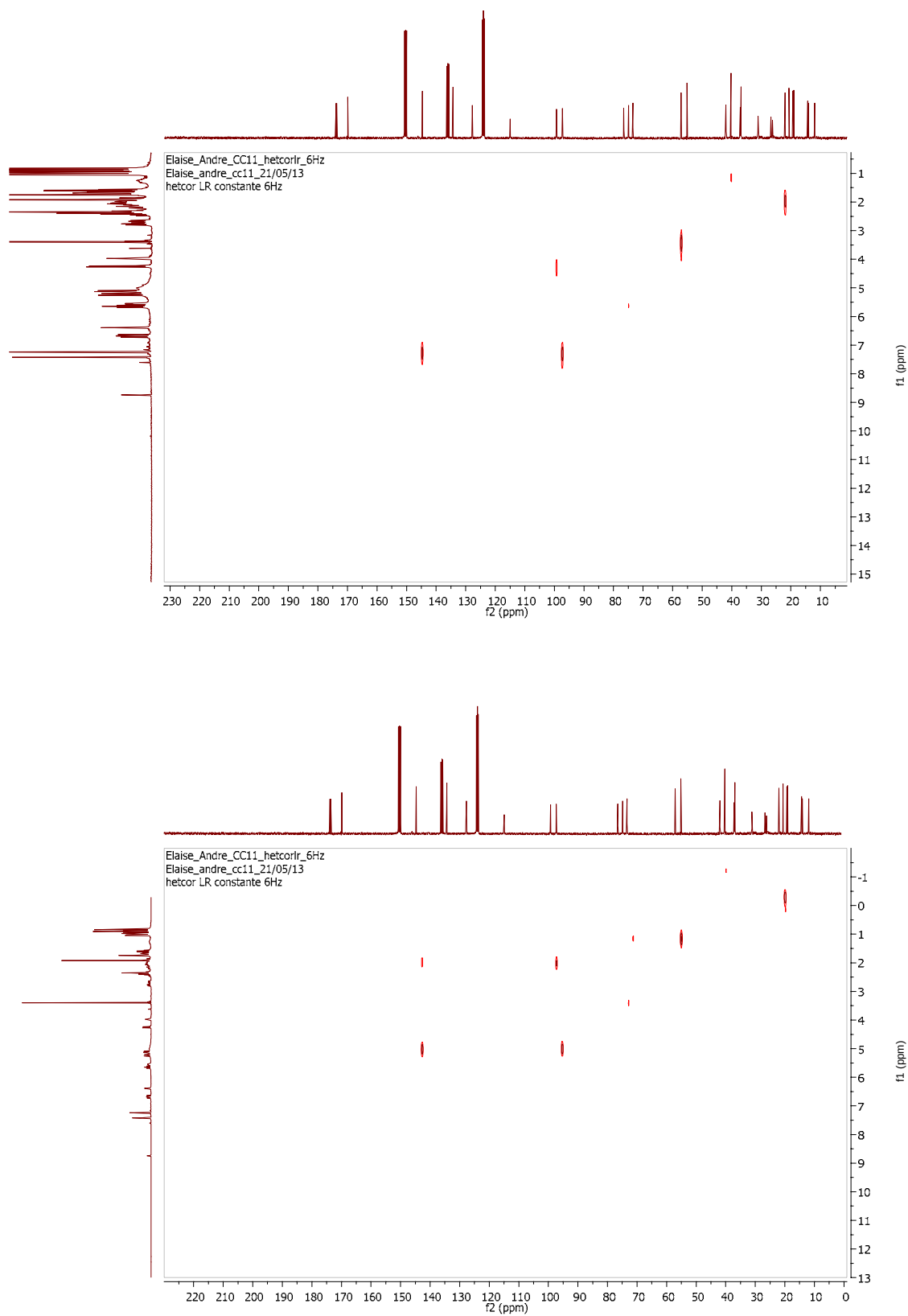
## ANEXO 14

**Figura:** Mapa de contornos HETCOR-LR da casearina J, 8 e 10 Hz (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).



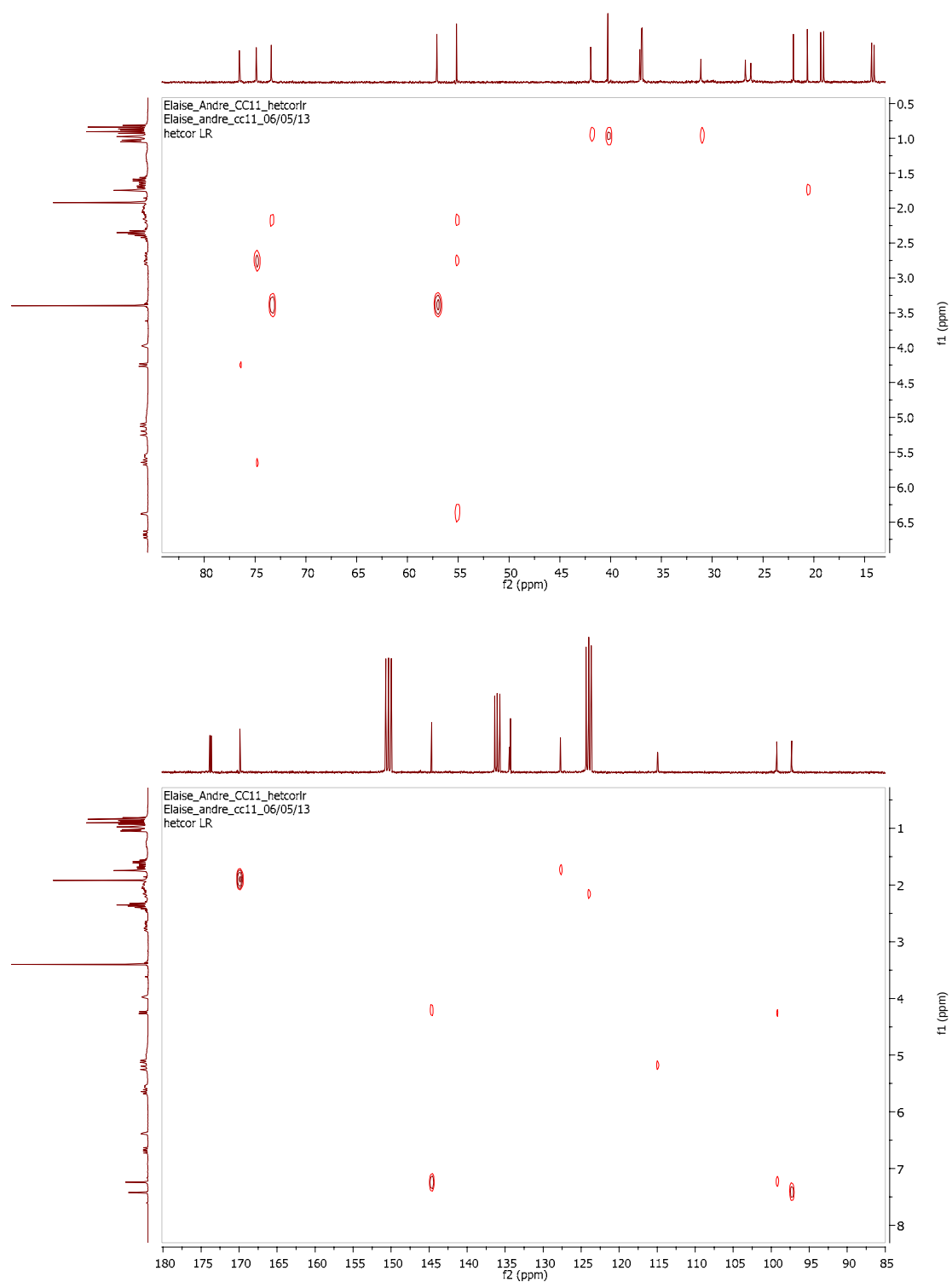
## ANEXO 15

**Figura:** Mapa de contornos HETCOR-LR da casearina J, 6 Hz (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).



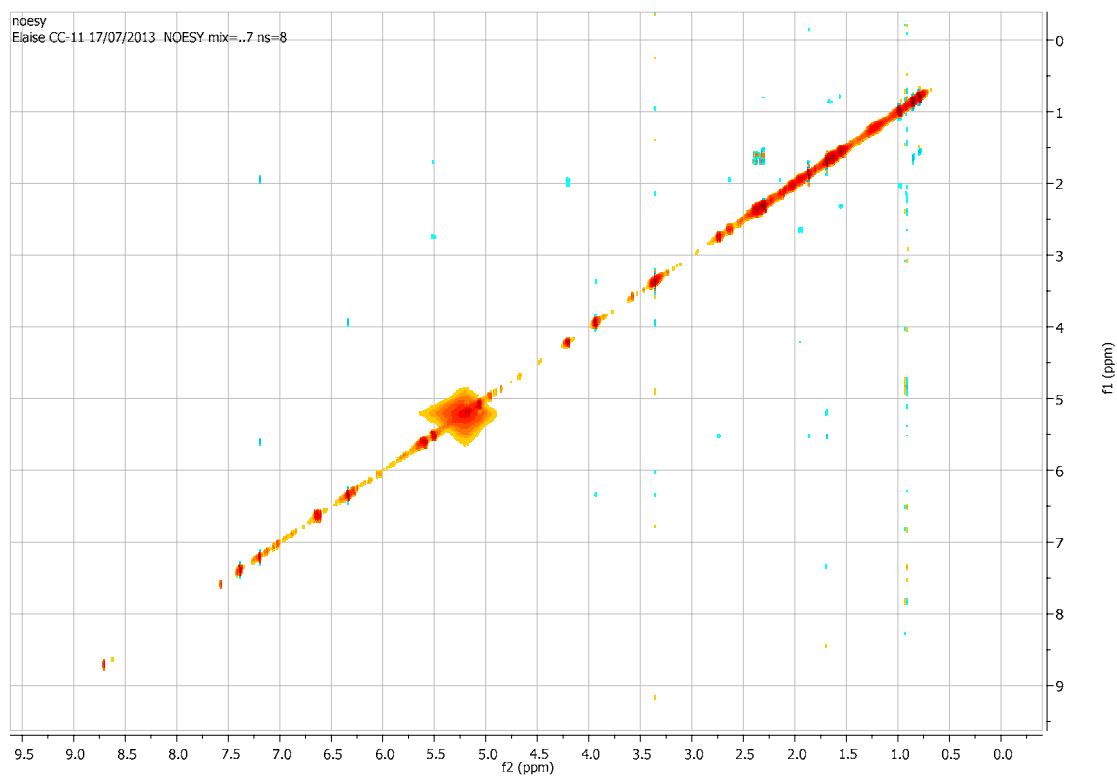
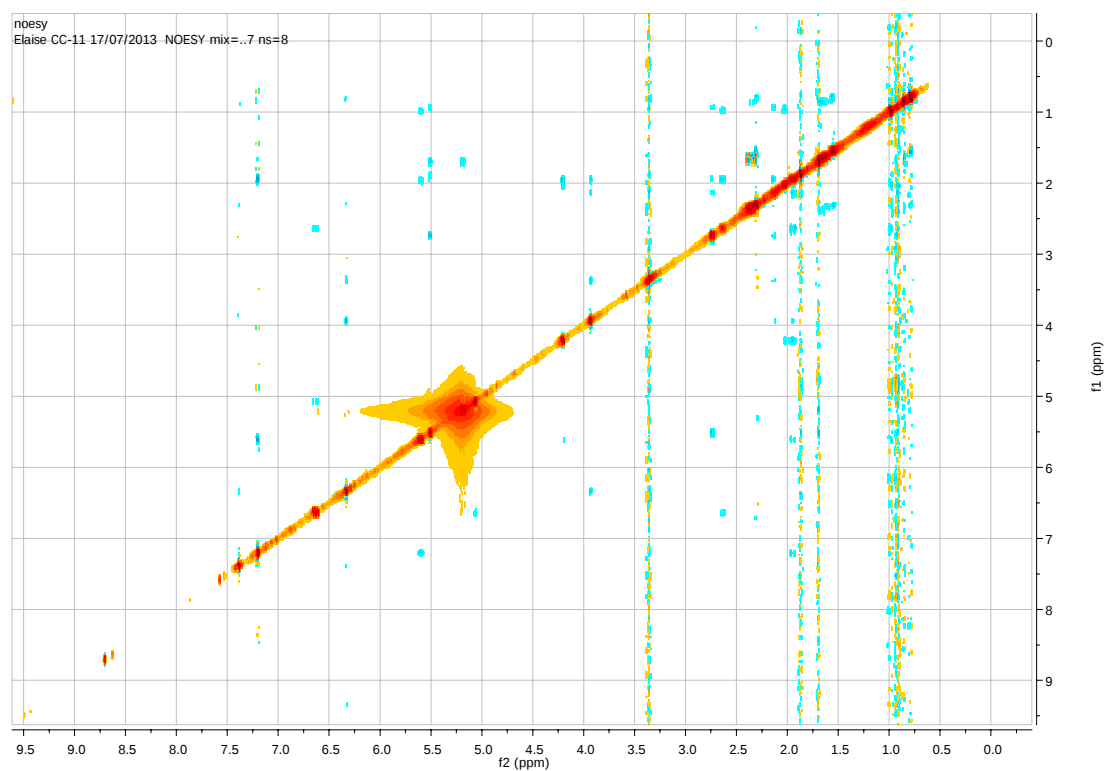
## ANEXO 16

**Figura:** Expansões do mapa de contornos HETCOR-LR da casearina J (piridina-d<sub>5</sub>, 11,7 T).



## ANEXO 17

**Figura:** Mapa de contornos NOESY2D da casearina J (piridina-d5, 11,7 T).



**ANEXO 18****(A) Formulação do gelcreme de EEtCs 2,0 %**

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| EEtCs.....            | 2,00%          |
| Carbopol 940.....     | 1,00%          |
| Trietanolamina.....   | q.s. pH 6,0    |
| Óleo de amêndoas..... | 4,00%          |
| Nipagin.....          | 0,15%          |
| Água.....             | q.s.p. 100,00% |

**(B) Formulação do gelcreme de CasgwF 0,06 %**

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| CasgwF.....           | 0,06%          |
| Carbopol 940.....     | 1,00%          |
| Trietanolamina.....   | q.s. pH 6,0    |
| Óleo de amêndoas..... | 4,00%          |
| Nipagin.....          | 0,15%          |
| Água.....             | q.s.p. 100,00% |

**(C) Formulação do gelcreme base**

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| Carbopol 940.....     | 1,00%          |
| Trietanolamina.....   | q.s. pH 6,0    |
| Óleo de amêndoas..... | 4,00%          |
| Nipagin.....          | 0,15%          |
| Água.....             | q.s.p. 100,00% |

Protocolo CEUAIFCF/CAr nº 2312011

Pesquisador: ELAISE GONÇALVES PIERRI

Orientador: Profa. Ora. Chung Man Chin

Projeto: Avaliação das atividades cicatrizantes e anti-inflamatória de *Casearia sy/vestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos.

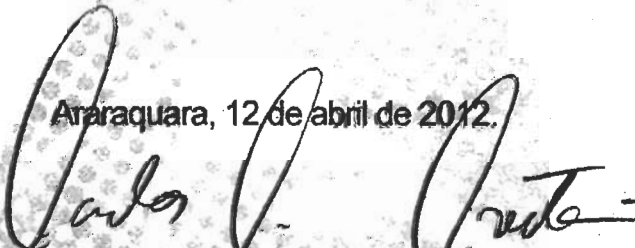
Experimento: Avaliação da atividade anti-inflamatória eulcerogênica do extrato, frações e diterpenos purificados de *Casearia sy/vestris* Swartz.

#### **Parecer nº 10/2012 – Comissão de Ética no Uso de Animais**

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Avaliação das atividades cicatrizantes e anti-inflamatória de *Casearia sy/vestris* Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos", apresentado pela pós-graduanda Elaise Gonçalves Pierri sob orientação da Profa. Ora. Chung Man Chin do Departamento de Fármacos e Medicamentos desta Faculdade, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em dezembro de 2013, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 12 de abril de 2012.

  
Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI  
Coordenador da CEUA



Universidade Estadual de Maringá  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação



Parecer emitido após reunião realizada em:

6/6/2013

Parecer nº

067/2013

Pesquisador: Luzmarina Hernandes

Sector: DCM

Título:

Protocolo nº 030/2013

**Avaliação das atividades cicatrizantes e anti-inflamatória de Casearia sylvestris Swartz em animais e identificação dos marcadores químicos**

Entrada: 13/5/2013

Início: 23/6/2013

Término: 24/6/2014

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final:

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

#### Considerações e Parecer:

Quanto ao mérito da pesquisa em relação às normas previstas na Lei no 11.794/08, Decreto 6.899/09, Resolução n 01/2010 – CONCEA (DOU no 131, de 12/07/10, p. 10), Lei Estadual no 14.037/03 e Resolução UEM no 032/2006-CEP, verifica-se que o projeto atende a todos os requisitos necessários para aprovação do uso dos animais na pesquisa proposta.

Aparentemente a pesquisadora utilizou um modelo de formulário diferente do constante no site da PPG, uma vez que os itens 1.1, 1.3, 1.4, de Identificação do Experimento são diferentes.

Sendo assim, propõe-se que o presente projeto fique APROVADO na forma do artigo 10, inciso I, da Resolução UEM no 032/2006-CEP, uma vez que não se constata óbices legais para o desenvolvimento dos procedimentos, nos moldes propostos no protocolo, em relação à legislação vigente, exigindo-se, entretanto, as informações, no Relatório Final, do título do projeto em inglês (formulário) e a descrição das doses de anestesia e eutanásia em mg/kg, como explicado no Check List do site do CEAE/PPG/UEM.



Prof. Dr. Alexandre Ribas de Paulo,  
Presidente do CEAE

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

I - aprovado;

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

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

IV - não aprovado

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



Revista de Ciências  
Farmacêuticas  
Básica e Aplicada

*Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*

---

Araraquara, 06 de maio de 2013.

**Ref. RCFBA-010/2013**

Em nome da Editoria Científica, temos o prazer de informar que o artigo intitulado:

**Liberação de componentes do extrato de *Casearia sylvestris* Swartz empregando membranas de látex natural como suporte,**

De autoria de Alberto Trecco; Felipe Azevedo Borges; Elaise G. Pierri; André Gonzaga dos Santos; Chung Man Chin; Rondinelli Donizetti Herculano foi aceito para publicação na *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*.

Enviaremos, na época oportuna, a prova gráfica para correção final.

Atenciosamente,

**Eliana Aparecida Varanda**  
**Editora Chefe**

**Ilmo. Sr.**

**Prof. Dr. Rondinelli Donizetti Herculano**