Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

Ação de constituintes de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos

Brunno Carvalho Gastaldo

Dissertação para a obtenção do titulo de mestre

Orientadora Profa. Dra. Elfriede M. Bacchi

São Paulo

2013

Brunno Carvalho Gastaldo

Ação de constituintes de *Solidago chilensis* MEYEN (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Dissertação entregue para o
programa de pós-graduação em
Fármaco e Medicamentos – FCF – USP
para a obtenção do grau de mestre em
Ciências

Orientadora Profa. Dra. Elfriede M. Bacchi

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Gastaldo, Brunno Carvalho
G255a Ação de constituintes de *Solidago chilensis* MEYEN (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos / Brunno Carvalho Gastaldo. -- São Paulo, 2013.
108 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Bacchi, Elfriede Marianne

1. Farmacognosia 2. Etnofarmacologia 3. Inflamação I. T. II. Bacchi, Elfriede Marianne, orientador.

615.321 CDD

Brunno Carvalho Gastaldo

Ação de constituintes de *Solidago chilensis* MEYEN (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Elfriede M. Bacchi – USP – pelos tantos anos de incentivo, orientação e amizade que, juntos possibilitaram esse trabalho

À Profa. Dra. Elaine Hatanaka – Universidade Cruzeiro do Sul – pela sua orientação e apoio

Ao Dr. Gilson Murata – Universidade Cruzeiro do Sul – pelo auxilio nos ensaios biológicos

Ao José Ricardo Bortolon – Universidade Cruzeiro do Sul – pelo auxilio nos ensaios biológicos

À Profa. Dra. Ingrit Collantes – UNIP – por analisar os espectros de RMN e auxiliar nas analises por CLAE

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus Pinto e Felipe Rebello Lourenço – USP – pelas analises de endotoxinas

Ao Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz – USP – pelo auxilio na formulação das preparações

À Profa. Dra. Telma Sakuda – USP – pelo auxilio nas analises microbianas

Ao professor Ilio Montanari - CPQBA Unicamp - por seu auxilio com o cultivo da planta

Ao CNPQ e à FAPESP pelo apoio financeiro

Não basta ficar à espera e almejar.
Importa fazer algo mais. É necessário lançar-se ao trabalho e responder – como homem e de um modo profissional – à "exigência de cada dia".

Max Weber em a ciência como vocação

Resumo

Gastaldo, Brunno Carvalho, **Ação de constituintes de *Solidago chilensis* MEYEN (arnica brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos**. 2013. 117 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013

Plantas medicinais são usadas por 80% da população mundial. O Brasil, devido a sua grande diversidade de clima, possui uma forte medicina tradicional. Muitas espécies vegetais são usadas pela população como anti-inflamatórias e cicatrizantes. Neste cenário está *Solidago chilensis*. Sucedânea da *Arnica montana*, está presente na lista de plantas de interesse da ANVISA (RENISUS), e possui uma investigação científica defasada. Para apoiar o uso popular e resolver as questões sobre o seu mecanismo de ação foram desenvolvidos testes demonstrando a ação cicatrizante desta espécie. Experimentos de ferida aberta e bolsa de ar foram realizados em ratos, para determinar sua participação como um pró ou anti-inflamatório. Estes testes incluem contagem de migração celular e dosagem de citocina, frente ao estimulo de seu extrato e frações. Ensaios *in vitro* foram realizados para indicar o tipo celular predominante envolvido e a dose toxica (indicada pela fragmentação de ADN e viabilidade celular). Todos os experimentos foram executados com o extrato hidroetanólico a 70%, liofilizado e com as frações clorofórmio, acetato de etila, e aquosa. Paralelamente, uma triagem química por CLAE e CCD foi realizada para determinar, por RMN, alguns marcadores. Foi observado uma redução significativa da área da ferida no dia 5º dia de tratamento com LHEE em gel de carbopol, justamente na passagem da fase de inflamação para a fase de granulação, indicando uma aceleração da fase inflamatória. Também foi observado um aumento da liberação de L-selectina, IL-1, IL-6 no ensaio de bolsa de ar, mas em oposição, percebe-se um efeito oposto quando administrado concomitantemente com um estímulo pró-inflamatório. Diversos compostos devem estar atuando para culminar com essa atividade, entre eles endotoxinas, contaminantes inerentes ao ambiente não estéril, diterpenos tóxicos e flavonóides, como a quercitrina. O supracitado fenômeno indica um efeito modulador da resposta imune.

Palavras chave: Citocinas, *Solidago chilensis*, cicatrização, inflamação, neutrófilos

Abstract

Gastaldo, Brunno Carvalho, **Action of constituents of Solidago chilensis Meyen (Brazilian arnica) in rats wound healing mechanisms.** 2013. 117 f. dissertation (master's degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences - University of São Paulo, São Paulo. in 2013

Medicinal plants are used by 80% of the world population. Brazil due its vast climatically diversity possess a strong traditional medicine. Many vegetal species are used by the population as anti-inflammatory and wound healer. In this picture there is *Solidago chilensis*. Ersatz of the Arnica Montana, and present in the ANVISA`s plants of interest list (RENISUS), posses a lagged scientific investigation. To support the popular use and elucidate questions about its mechanism of action were developed tests demonstrating the healing action of this specie. Open wound and air pouch experiments are developed with rats to determinate the activities as a pro or anti-inflammatory. These tests include a cellular migration count and cytosine dosage. In vitro essay were performed to indicate the predominant cellular type response and the toxic dosage (indicated by DNA fragmentation and the cellular viability). All the experiments were executed with the lyophilized 70% hydroethanolic extract, and the fractions chloroform, ethyl acetate, and aqueous. An alongside chemical screening by THL and HPLC were carried on to determine by NMR some key compounds. It was verified a significant reduction of the wound in the 5th day in the open wound experiment, which is the passage of the inflammation phase to the granulation phase. Also it was noted ad increase of the L-selectin, IL-1, and IL-6 liberation by neutrophils but a decrease when administrated concomitant with a pro- inflammatory stimulus. Several compounds must be acting to culminate this activity, including endotoxin, inherent contaminants in the non-sterile environment, toxic diterpenes and flavonoids such as quercitrin. The aforementioned phenomenon points to a modulatory effect of the immune response. The obtained result indicates a potential use in wound healing processes with has immune deficiency and also hiperresponsivite. Further studies will be performed to verify the most active fraction, and its main compounds.

- **Keywords**: Cytokines, *Solidago chilensis*, wound healing, inflammation, neutrophil

Lista de Figuras

- FIGURA 1 CRESCIMENTO DA VENDA DE FITOTERÁPICOS EM 9 PAÍSES REPRESENTATIVOS (BUTÃO, CANADÁ, REPÚBLICA CHECA, IRÃ, MADAGASCAR, MALÁSIA, PAQUISTÃO, SUDÃO E SUÉCIA) (OMS, 2011) 16
- FIGURA 2 FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE *SOLIDAGO CHILENSIS* (TRÓPICOS, 2012) 20
- FIGURA 3 REPRESENTAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE *S. CHILENSIS*. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: LAMINA FOLIAR, CORTE TRANSVERSAL EVIDENCIANDO O PARÊNQUIMA, E CORTE TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL DA FOLHA (OLIVEIRA, 1998). 21
- FIGURA 4 ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA QUERCITRINA (LHUILLIER, 2007) 22
- FIGURA 5 FORMULA ESTRUTURAL DA QUERCITRINA(DISPONÍVEL EM: HTTP://PUBCHEM.NCBI.NLM.NIH.GOV) 22
- FIGURA 6 RELAÇÃO ENTRE OS TIPOS CELULARES E AS FASES DA CICATRIZAÇÃO (HATANAKA, 2007). .. 26
- FIGURA 7(A) NÚMERO DE PUBLICAÇÕES ENCONTRADAS NA REVISÃO DA LITERATURA EM DIFERENTES BASES DE DADOS (PUB MED, THOMPSON, SCOPUS E SCIELO) COM AS PALAVRAS CHAVES: SOLIDAGO, *SOLIDAGO CHILENSIS*, SOLIDAGO E INFAMAÇÃO E SOLIDAGO E CICATRIZAÇÃO. (B) NÚMERO DE PUBLICAÇÕES SOBRE O GÊNERO *SOLIDAGO* POR DÉCADA. 34
- FIGURA 8 FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM OS EXTRATOS DE S. CHILENSIS..... 35
- FIGURA 9 CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR CCD COM O EXTRATO E AS FRAÇÕES DE *S. CHILENSIS* COM A FASE MÓVEL ACETATO DE ETILA, ÁCIDO FÓRMICO, ÁCIDO ACÉTICO, ETIL-METIL-CETONA, ÁGUA (50: 7: 3:30:10) (WAGNER , 1996). NA SEQUENCIA, DA ESQUERDA PARA A DIREITA EXTRATO BRUTO (ETANOL 70%), FRAÇÃO AQUOSA, FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA. (A) REVELADOR NP EM VISUALIZAÇÃO EM UV, 466 (B) REVELADOR FECL3 EM VISUALIZAÇÃO EM LUZ VISÍVEL, (C) REVELADOR AS EM VISUALIZAÇÃO EM LUZ VISÍVEL 47
- FIGURA 10 CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA A FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACETONITRILA DE 5%- 100%, 60', (A) PLANO GERAL, (B) DETALHE. 48
- FIGURA 11 CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA A FRAÇÃO AQUOSA DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACETONITRILA DE 5%- 100%, 6, (A) PLANO GERAL, (B) DETALHE. 49
- FIGURA 12 CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA A FRAÇÃO ACOET DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACETONITRILA DE 5' 24%, 20' 24%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5 (A) PLANO GERAL, (B) DETALHE. 51
- FIGURA 13 CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA A FRAÇÃO AQUOSA DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACETONITRILA DE 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) PLANO GERAL, (B) DETALHE 52
- FIGURA 14 ESPECTRO OBTIDO POR CLAE PARA O PICO DE RETENÇÃO 17.403 MIN DA FRAÇÃO ACOET DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACN DE 5' 24%, 20' 24%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5% (A) PICOS DE ABSORBÂNCIA, (B) PUREZA (C) IMAGEM 3D (EIXO X = COMPRIMENTO DE ONDA, Y = FLUORESCÊNCIA E Z = TEMPO DE RETENÇÃO. 53
- FIGURA 15 ESPECTRO OBTIDO POR CLAE PARA O PICO DE RETENÇÃO 16.62 MIN DA FRAÇÃO AQUOSA DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACN DE 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) PICOS DE ABSORBÂNCIA, (B) PUREZA 53

- FIGURA 16 ESPECTRO OBTIDO POR CLAE PARA O PICO DE RETENÇÃO 27.364 MIN DA FRAÇÃO AQUOSA DE *S. CHILENSIS*. GRADIENTE DE ACN DE 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) PICOS DE ABSORBÂNCIA, (B) PUREZA..... 54
- FIGURA 17 CROMATOGRAMA OBTIDO POR CLAE PARA A O PADRÃO DO FLAVONÓIDE QUERCITRINA. GRADIENTE DE ACETONITRILA DE 5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5 (DETALHE). 55
- FIGURA 18 ESPECTRO OBTIDO POR CLAE PARA O PICO DE RETENÇÃO 27.15 MIN. DO PADRÃO DE QUERCITRINA. GRADIENTE DE ACN DE 5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5. (A) PICOS DE ABSORBANCIA, (B) PUREZA (C) IMAGEM 3D (EIXO X = COMPRIMENTO DE ONDA, Y = FLUORESCÊNCIA E Z = TEMPO DE RETENÇÃO..... 55
- FIGURA 19 CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS 15 PRIMEIRAS SUBFRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO DA FCHCL3 DE S. CHILENSIS. FASE MÓVEL HEXANO: ACETATO DE ETILA (9:1). (A) VISUALIZAÇÃO EM UV 254NM, (B) VISUALIZAÇÃO EM UV 366NM, (C) REVELAÇÃO COM ÁCIDO SULFÚRICO A 20% SEGUIDO DE AQUECIMENTO 57
- FIGURA 21 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (300 MHZ) $CDCL_3$ DO COMPOSTO 1 (PRESENTE NA BANDA 8) DO EXTRATO $FCHCL_3$ DE S.CHILENSIS..... 59
- FIGURA 22 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (75 MHZ) $CDCL_3$ DO COMPOSTO 1 DO EXTRATO $FCHCL_3$ DE *S.CHILENSIS* 61
- FIGURA 22 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (300 MHZ) $CDCL_3$ DOS COMPOSTOS 2 E 3 ENCONTRADOS NA BANDA N. 14 DA SUBFRAÇÃO 7 DO EXTRATO FCHCL3 DE *S. CHILENSIS*. 63
- FIGURA 23 ESPECTRO DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (75 MHZ) $CDCL_3$ DOS COMPOSTOS 2 E 3 ENCONTRADOS NA BANDA N. 14 DA SUBFRAÇÃO 7 DO EXTRATO FCHCL3 DE *S. CHILENSIS*. 65
- FIGURA 24 LIBERAÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS SOB O EFEITO DE LHEEO ENSAIO DE CULTURA REALIZADA COM O FH_2O INDICA. OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS 69
- FIGURA 25 LIBERAÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS SOB O EFEITO DE FH_2O. OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS 70
- FIGURA 26 LIBERAÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS SOB O EFEITO DE FACOET. OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS COM P<0.05 *, P<0,01 **..... 71
- FIGURA 27 LIBERAÇÃO DE CITOCINAS POR NEUTRÓFILOS SOB O EFEITO DE $FCHCL_3$. OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS 72
- FIGURA 28 FRAGMENTAÇÃO DE ADN SOB O EFEITO DO EXTRATO LHEE (A) E $CHCL_3$(B) EM UNIDADES RELATIVAS ((1/ABSORBÂNCIA)/CONTROLE). OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS COM P<0,0001. 73

- FIGURA 29 EFEITO DO TRATAMENTO CONTROLE SOBRE A COMPLEXIDADE CELULAR (SSC) VOLUME CORPUSCULAR (FSC) E ADESÃO DO FLUORÓFORO (IODETO DE PROPÍDIO) À PARES DE ADN ÍNTEGROS. SENDO INDICATIVOS DA QUANTIDADE DE FRAGMENTAÇÃO DE ADN E MORTE POR APOPTOSE 75
- FIGURA 30 EFEITO DO LHEE SOBRE A COMPLEXIDADE CELULAR (SSC) VOLUME CORPUSCULAR (FSC) E ADESÃO DO FLUORÓFORO (IODETO DE PROPÍDIO) À PARES DE ADN ÍNTEGROS. SENDO INDICATIVOS DA QUANTIDADE DE FRAGMENTAÇÃO DE ADN E MORTE POR APOPTOSE 76
- FIGURA 31 NECROSE CELULAR SOB O EFEITO DO EXTRATO LHEE (A) E $CHCL_3$(B) EM UNIDADES RELATIVAS ((1/ABSORBÂNCIA)/CONTROLE). OS DADOS SÃO REPRESENTATIVOS DE 3 EXPERIMENTOS REALIZADOS E DUPLICATAS E ESTÃO EXPRESSOS COMO MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS ESTATÍSTICAS ENTRE OS GRUPOS COM P<0,0001. 77
- FIGURA 32 FIGURA ILUSTRATIVA DO EFEITO DO TRATAMENTO CONTROLE SOBRE A COMPLEXIDADE CELULAR (SSC) VOLUME CORPUSCULAR (FSC) E ENTRADA DO FLUORÓFORO (IODETO DE PROPIDIO) NA CÉLULA. SENDO INDICATIVOS DA QUANTIDADE DE DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR E MORTE POR NECROSE 79
- FIGURA 33 FIGURA ILUSTRATIVA DO EFEITO DOLHEE SOBRE A COMPLEXIDADE CELULAR (SSC) VOLUME CORPUSCULAR (FSC) E ENTRADA DO FLUORÓFORO (IODETO DE PROPIDIO) NA CÉLULA. SENDO INDICATIVOS DA QUANTIDADE DE DEGRADAÇÃO DA PAREDE CELULAR E MORTE POR NECROSE 80
- FIGURA 34 FOTOS DAS FERIDAS DOS GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E EXTRATO SUSPENDIDO NO GEL DE CARBOPOL NOS DIAS 0 4 E 8, CORRESPONDENDO AO INICIO DA FERIDA, FASE DE GRANULAÇÃO E REMODELAMENTO, RESPECTIVAMENTE. E MÉDIA DA ÁREA RELATIVA DOS GRUPOS..... 82
- FIGURA 35 BOXPLOT RELACIONANDO A QUANTIDADE DE LEUCÓCITOS ENCONTRADOS NO EXSUDATO INFLAMATÓRIO EM RELAÇÃO AO TIPO DE TRATAMENTO UTILIZADO. OS DADOS SÃO PROVENIENTES DE 1 EXPERIMENTO COM N= 8. P<0,005 * EM RELAÇÃO AO CONTROLE (-). 83
- FIGURA 36 COMPARAÇÃO ENTRE A LIBERAÇÃO DAS CITOCINAS MEDIANTE Á APLICAÇÃO DE UM DOS 4 TRATAMENTOS (PBS, EXTRATO ETOH 70%, LPS, LPS + EXTRATO ETOH 70%).OBSERVA-SE DIFERENÇA SIGNIFICATIVA QUANDO P<0,05 *, P<0,01 ** E P<0,001 *** EM RELAÇÃO AO CONTROLE (-)..... 85
- FIGURA 37 ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA A SUBSTANCIA ENCONTRADA NA BANDA N. 8 (COMPOSTO 1) DA SUBFRAÇÃO 5+6 DO EXTRATO $FCHCL_3$ DE *S. CHILENSIS.* 88
- FIGURA 38 ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA A SUBSTANCIA ENCONTRADA NA BANDA N. 13 (COMPOSTO 2) DA SUBFRAÇÃO 7 DO EXTRATO FCHCL3 DE S. CHILENSIS. 88
- FIGURA 39 ESTRUTURA QUÍMICA DE A-AMIRINA E BAUERENOL RESPECTIVAMENTE ENCONTRADAS NA BANDA N. 14 (COMPOSTO 2 E 3) DA SUBFRAÇÃO 7 DO EXTRATO FCHCL3 DE S. CHILENSIS..... 88

Lista de Tabelas

- TABELA 1 CROMATOGRAFIAS DESENVOLVIDAS PARA OTIMIZAR A SEPARAÇÃO DOS COMPONENTES DOS ESTRATOS FACOET E FH_2O..... 39
- TABELA 2 MASSA DAS BANDAS OBTIDAS POR FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA DA FCHCL3 DE S. CHILENSIS. 58
- TABELA 3 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN-13C (75 MHZ) EM CDCL3, DO COMPOSTO PRESENTE NA BANDA 8 COMPARADOS COM DA LITERATURA (TORRES ET AL 1989). 62
- TABELA 4 DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN-13C (75 MHZ) EM $CDCL_3$, DO COMPOSTO 2 E 3 COMPARADOS COM DA LITERATURA. 66
- TABELA 5 CARGA MICROBIANA ENCONTRADA NA DROGA DIZER QUAL A DROGA SECA E RECOMENDAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE..... 67
- TABELA 6 QUANTIDADE DE ENDOTOXINAS ENCONTRADAS NO EXTRATO E NAS FRAÇÕES, EM EU POR MILILITRO (UE/ML), NANOGRAMAS POR MILILITRO (NG/ML) E POR KILO 67
- TABELA 7 LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURA DE NEUTRÓFILO COM LHEE. 68

Lista de abreviações

AcOEt	acetato de etila
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANVISA	Agencia nacional de vigilância Sanitária
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CE_{50}	Concentração efetiva
$CHCl_3$	Clorofórmio
CINC	cytokine-induced neutrophil chemoattractant
CLAE	Cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC)
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
DEF	Dicionário de Especialidades Farmacêuticas
DMSO	Dimetil sulfoxido
DPPH	2,2'-difenil-1-picrilidrazila
LHEE	Extrato hidroetanolico liofilizado
EROs	Espécies reativas do oxigênio
EtOH	Etanol
FAcOEt	Fração acetato de etila
$FCHCl_3$	Fração Clorofórmica
FDA	Food and Drug Administration
FH_2O	Fração resíduo Aquoso
fMLP	N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine
HPLC	Hight performance liquid chromatography (CLAE)
IL	Interleucina
LAL	Limulus amebocyte lysate
LPS	Lipopolissacarideo
MIP	Proteínas inflamatórias para macrófagos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NO	Oxido Nitrico
NP	Ácido difenilbórico 2-amino etiléster
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDA	Photodiode Array
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RMN	Ressonância magnética nuclear
PBS	Tampão de fosfato salino (phosphate buffered saline)
TGF	Fator de crescimento transformante-alfa
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	Tryptic Soy Tooltip Agar
TSB	Caldo tripticaseína de soja
UV	Ultra Violeta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

Sumário

AGRADECIMENTOS 5

RESUMO 7

ABSTRACT 8

LISTA DE FIGURAS 9

LISTA DE TABELAS 12

LISTA DE ABREVIAÇÕES 13

SUMÁRIO 14

1. INTRODUÇÃO 16

1.1. SOLIDAGO CHILENSIS 17
1.2. MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO 25
1.2.1. FASE INFLAMATÓRIA 26
1.2.2. FASE DE FORMAÇÃO DE TECIDO DE GRANULAÇÃO/PROLIFERATIVA 28
1.2.3. FASE DE REMODELAMENTO DO TECIDO 29

2. OBJETIVO GERAL 32

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

3. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO 33

4. MATERIAL E MÉTODOS 35

4.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS 36
4.2. TRIAGEM FITOQUÍMICA 36
4.3. PERFIL CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS 37
4.3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) 37
4.3.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 38
4.3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS 40
4.4. CARGA MICROBIANA 40
4.5. ENDOTOXINAS 40
4.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS 41
4.6.1. CULTURA CELULAR, NECROSE E APOPTOSE. 41
4.6.1.1. ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA (NECROSE CELULAR) 42
4.6.1.2. ENSAIO DE FRAGMENTAÇÃO DE ADN (APOPTOSE) 42
4.6.2. ENSAIO DE FERIDA ABERTA 43
4.6.3. ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM BOLSA DE AR ESTÉRIL 43
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA 44

5. RESULTADOS 45
5.1. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS 45
5.2. TRIAGEM FITOQUÍMICA 45
5.3. PERFIL CROMATOGRÁFICO E ISOLAMENTO DOS COMPOSTOS MAJORITÁRIOS 46
5.3.1. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) 46
5.3.2. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA 47
5.3.3. IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS 56
5.4. CARGA MICROBIANA 66
5.5. ENDOTOXINAS 67
5.6. ENSAIOS BIOLÓGICOS 68
5.6.1. CULTURA CELULAR, NECROSE E APOPTOSE. 68
5.6.1.1. VIABILIDADE CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DE ADN 72
5.6.2. ENSAIO DE FERIDA ABERTA 81
5.6.3. ENSAIO DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS EM BOLSA DE AR ESTÉRIL 83
5.6.3.1. CÉLULAS 83
5.6.3.2. CITOCINAS 84

6. DISCUSSÃO 86

7. CONCLUSÕES 99

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

9. ANEXOS 108

1. Introdução

Desde os primórdios, o homem utiliza a natureza para beneficio próprio, fato que pode, por exemplo, ser visualizado no campo farmacêutico, onde são feitas modificações genéticas, identificação de novos princípios ativos de origem vegetal e extração de produtos naturais com potencial terapêutico (BRASILEIRO, 2006; SILVA G., 1999; SIMÕES, 2007). São muitas as compilações de plantas curativas, como por exemplo o papiro Ebers de 1.500 a.C. e a “De Matéria Médica” do século XII/XIII de Dioscórides, que possuem drogas fármacos utilizadas até os dias atuais (LETONA, 2009).

Em países desenvolvidos, como Alemanha e Canadá, até 80% da população faz uso de plantas medicinais como medicina alternativa, mas em países em desenvolvimento até 95% da população considera a medicina tradicional como tratamento primário, principalmente na América do sul, Ásia e África. (OMS, 2011). É difícil quantificar com precisão valores de vendas devido às varias nomenclaturas e legislações dos diversos países, contudo estimativas apontam uma crescente movimentação financeira na área, como mostra a Figura 1 Crescimento da venda de fitoterápicos em 9 países representativos (Butão, Canadá, República Checa, Irã, Madagascar, Malásia, Paquistão, Sudão e Suécia) (OMS, 2011)

chegando a um aumento de 40% (no período de 1999 2001) (OMS, 2011).

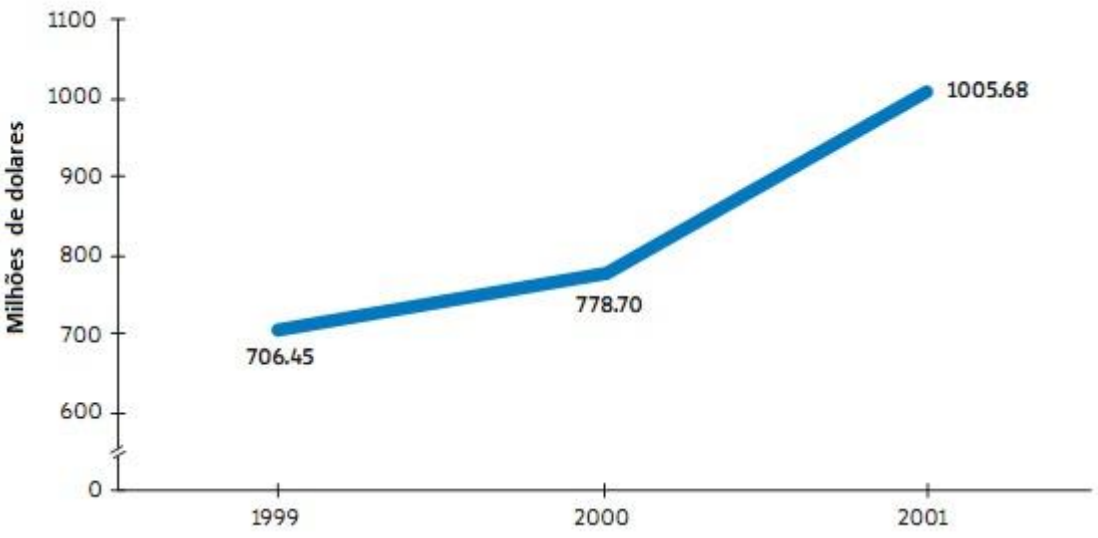


Figura 1 Crescimento da venda de fitoterápicos em 9 países representativos (Butão, Canadá, República Checa, Irã, Madagascar, Malásia, Paquistão, Sudão e Suécia) (OMS, 2011)

No entanto, o uso indiscriminado de medicamentos sintéticos ou naturais, sem os necessários estudos de segurança, eficiência e eficácia, apresenta um grande risco à saúde (OMS, 2011).

Das espécies vegetais que possuem a atividade cicatrizante comprovada pode-se citar: *Aloe vera, Calendula officinalis, Matricaria camomila e Copaífera* sp. (SILVA G., 1999, SARABIA, 1999), e com poucos e pontuais estudos a *Solidago chilensis* (GOULART, 2007; SMOLAREK, 2009). Assim, no presente estudo pretende-se focar na atividade cicatrizante de *S. chilensis* e sua participação na fase inflamatória do processo de cicatrização.

1.1. Solidago chilensis

O gênero *Solidago* (Asteraceae) possui 80 espécies, destas, 37 contam com alguns estudos. Muitas espécies são utilizadas pelo mundo, *S. virgaurea* (goldenrod) na Ásia e Europa, e *S. canadensis*, *S. odora*, e *S. gigantea* na América do Norte. As espécies possuem, de forma geral, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e analgésica (TAMURA, 2009; GOULART 2007; TORRES, 1985).

Em *S. virgaurea* por exemplo, foram encontrados taninos, óleo essencial, diterpenos, saponinas, ácidos fenólicos, flavonóides e leiocarposídeo, que possui atividade diurética e anti-inflamatória, o que a remete ao uso de inflamação na bexiga. Também o extrato da mesma planta é um dos componentes do fitomedicamento Phytodolor™. Esse fitomedicamento é produzido pela Steigerwald Arzneimittel GmbH da Alemanha e tem indicação para inflamação das juntas, associada com doenças reumatóides, e artrite, demonstrando uma redução da necessidade da utilização de anti-inflamatórios não esteroidais convencionais entre os pacientes que receberam esse tratamento (BARRETT, 2004).

S. chilensis é encontrada em muitos países da América do Sul, particularmente nas regiões sul e sudeste do Brasil (TORRES, 1985), sendo utilizada popularmente como sucedânea da *Arnica montana* (arnica-verdadeira) (SCHMEDA-HIRSCHMANN, 2002). Lorenzi, em “Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas” (2002), faz um extenso levantamento bibliográfico e afirma que apesar de não ter comprovação cientifica é amplamente utilizada segundo a tradição popular.

Essa planta pertence à ordem Asterales Lindl, família Asteraceae Bercht. & J. Presl, gênero *Solidago* L., espécie *Solidago chilensis* Meyen e consta na 1° Ed. da Farmacopéia Brasileira (1926) (TROPICOS, 2009).

Como sinônimo científico encontra-se *Aster polyglossus* var. *microglossus* DC. (IPNI, 2010). Alguns autores ainda consideram como sinônimo *Solidago microglossa* (TROPICOS, 2009*), S. marginella, S nitidula, S. odora, S. polyglossa, S. vulneraria* (OLIVEIRA, 1998). Popularmente é denominada de arnica-brasileira, arnica-silvestre, erva-lanceta, espiga-de-ouro, lanceta, macela-miúda, rabo-de-rojão e sapé-macho (OLIVEIRA, 1998; BRASILEIRO, 2006).

É um vegetal ereto medindo até 1 metro de altura por 1,5 cm de espessura na base. Possui um caule simples, não ramificado, de cor verde claro a acinzentado. O colênquima subepidérmico é pouco desenvolvido e os feixes vasculares são do tipo colateral aberto, relacionados com canais secretores (OLIVEIRA, 1998). Suas folhas são sésseis, serrilhadas na porção distal, alternas, membranosas, com até 10 cm de comprimento, 1,5 cm de largura e lisas (Figura 2). O mesofilo se caracteriza pela heterogeneidade simétrica e células parenquimáticas de paredes finas. A nervura central é biconvexa e bastante proeminente na abaxial. Possui três feixes vasculares envolvidos pelo parênquima fundamental, também relacionados com canais secretores. Podem-se observar estômatos anomocíticos em ambas as faces também apresentando tricomas tectores unisseriados com 1 a 4 células, sendo o terminal alongado e delgado Figura 3). O parênquima paliçádico é formado por 2

fileiras de células em ambas faces. Possui inflorescências em panícula, amarelas, constituídas por 8 a 10 floretas tubulosas e 18 a 20 floretas liguladas, atingindo até 20 cm (CHICOUREI, 1997; OLIVEIRA, 1998). Seu fruto é do tipo aquênio medindo 1mm de comprimento, com pequenas elevações em sua superfície. Com a base ligeiramente aguda, seu ápice é truncado e encimado pelo papo. A droga não apresenta cristais de oxalato de cálcio e possui odor fracamente aromático e sabor amargo (OLIVEIRA, 1998).

Figura 2 Fotografia da espécie *Solidago chilensis* (TRÓPICOS, 2012)

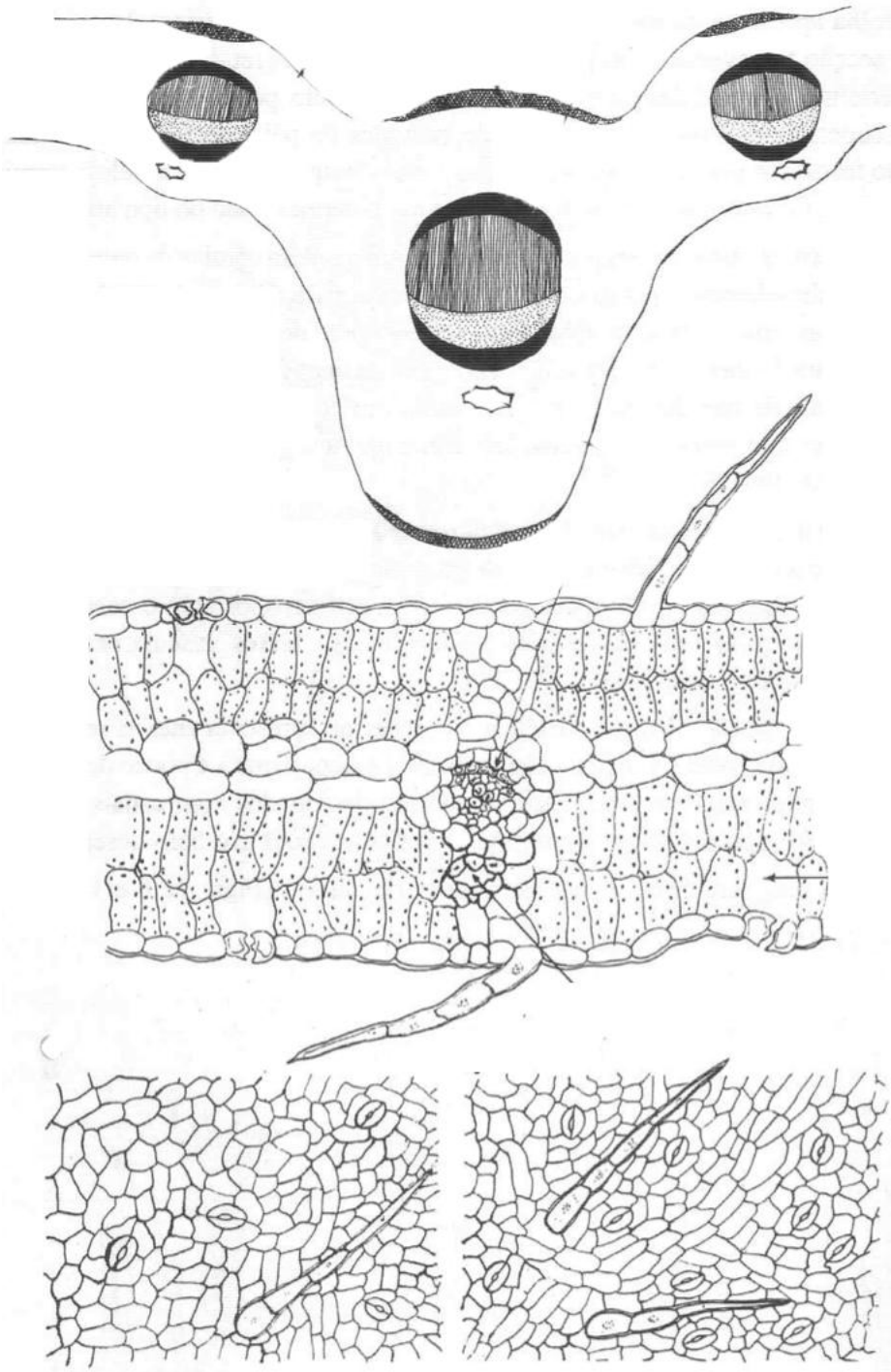


Figura 3 Representação de cortes histológicos de *S. chilensis*. Da esquerda para a direita: lamina foliar, corte transversal evidenciando o parênquima, e corte transversal da nervura central da folha (OLIVEIRA, 1998).

Estudos fitoquímicos demonstraram nas partes aéreas a presença de alcalóides, taninos e flavonóides, no verão e inverno. Na primavera encontra-se somente a presença de taninos e flavonóides (CHICOUREI, 1997). Óleo essencial (MOREL, 2006), ácidos

carboxílicos, terpenóides e hidrocarbonetos alifáticos também foram encontrados na planta, sendo suas raízes ricas em diterpenos (TORRES, 1985).

A quercitrina (Figura 5) foi encontrada por Miranda (2001) e esta presente em outras plantas com atividade anti-inflamatória. Medina (2002) estudou o efeito desse flavonóide e demonstrou seu efeito anti-inflamatório. Lhuillier (2007) identifica-o e apresenta seu espectro, indicando picos de absorção em 254-256 e 345-355 nm (Figura 4).

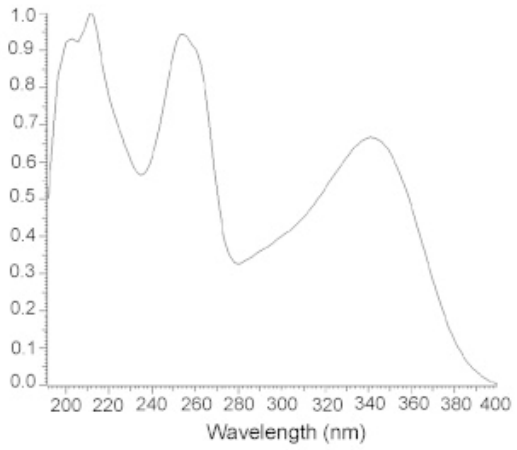


Figura 4 Espectro de absorção UV da quercitrina mostrando seus picos de absorção (LHUILLIER, 2007)

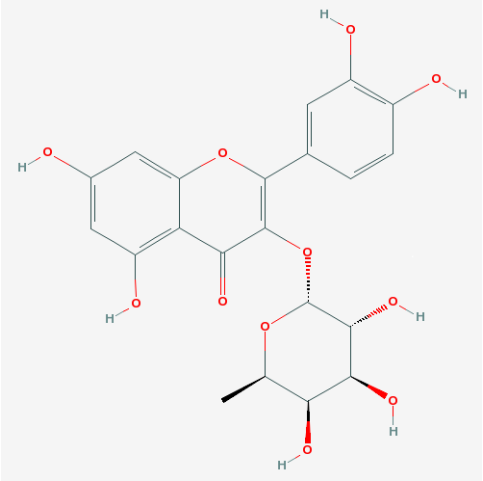


Figura 5 Estrutura molecular da quercitrina (disponível em: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

A espécie em estudo tem descrita atividade anti-inflamatória (GOULART, 2007) e anti C*andida albicans* (DUARTE, 2005). Foi efetiva para o tratamento de lumbago (doença reumática da região lombar) o que dá indícios de sua atividade (SILVA,A., 2010). Tamura (2009) descreve a participação do extrato etanolico (95%) no processo de inflamação, em ensaios de edema de orelha, bolsa de ar e microscopia intravital, quando administrado pelas vias oral, tópica e intraperitoneal. Foi apontado que a atividade anti-inflamatória ocorre quando administrado por via tópica e intraperitoneal. Entretanto, nesse trabalho, não foi esclarecida qual a quantidade de contaminantes presentes na amostra, dado essencial posto que diferentes concentrações de lipopolissacarideo (LPS) e diferentes tempos de exposição ao mesmo podem interferir na resposta inflamatória e no tipo celular predominantemente envolvido, o que influencia na fase da cicatrização. Tamura (2009) também utiliza uma dose considerada tóxica por Facury Neto (2004).

Como restringimos o objeto de pesquisa na fase inflamatória do processo de cicatrização é fundamental saber se o tipo celular predominante nessa fase, neutrófilos, são influenciados pela administração da droga, assim como analisar a toxicidade das substancias testadas frente a esse tipo celular.

Outro ponto de divergência na literatura é que focamos nesse trabalho foi o estudo das frações com o objetivo de destacar os prováveis tipos de compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória e sua relação com a atividade cicatrizante

Em relação à ação farmacológica, Miranda (2001) realizou um estudo utilizando a tintura de *S. chilensis* a 50% e não observou melhora no processo de cicatrização. Estudos mais aprofundados devem ser realizados, uma vez que, sabe-se que a aplicação de solventes orgânicos em feridas ou ensaios que envolvam células por si só pode comprometer o resultado final e exigem controles adicionais de toxicidade.

Nesse sentido, Chizzola (2008) demonstrou que os extratos com maior potencial anti-inflamatório são aqueles obtidos com etanol entre 55 e 75% (solventes de polaridade média), por possuírem maior concentração de fenóis, sendo que nessas concentrações há uma extração de compostos tanto apolares como polares. Assim, a extração de *S. chilensis* deve ser realizada com porcentagens menores de etanol (70%).

De Freitas (2008) observou que o extrato aquoso da espécie tem propriedades anti-hemolíticas e estabilizantes da osmolaridade eritrocitária. Facury Neto (2004) demonstrou a atividade cicatrizante após administração intraperitoneal do extrato aquoso de *S. chilensis* em ratos. Essa diminuição, quando comparada com o controle, foi pequena, mas significativa, com aumento das fibras colágenas. O solvente aquoso, provavelmente, não extraiu os componentes com polaridade intermediária como flavonas e flavonóis, muito menos os mais apolares como diflavonóis, di-hidroflavonóis, isoprenoides, entre outros (CECHINEL FILHO, 1998). O referido solvente também não é ideal para a extração de compostos fenólicos antioxidantes (MOHSEN, 2009), sendo importante um estudo com as outras frações. No mesmo estudo Facury Neto (2004) não verifica toxicidade ao fígado causada pelo extrato aquoso por via intraperitoneal, dada a manutenção dos índices de enzimas hepáticas. , e ainda que a DL_{50} e a DL_{100} foram 54,7 ± 0,3 mg/kg e 86,2 mg/kg, respectivamente. Conclui então que o índice terapêutico, nessas condições, é reduzido (dose eficaz 16,1mg/kg). e que extratos da espécie não devem ser utilizados sistemicamente, visando o efeito cicatrizante e anti-inflamatório, e ainda que estudos mais aprofundados devam ser realizados utilizando frações mais puras do extrato bruto e por outra via de administração (FACURY NETO, 2004).

Morel (2006) demonstrou que o extrato metanólico e o óleo essencial da espécie apresentaram uma atividade antimicrobiana, ambos contra: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Salmonella setubal, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Saccharomyces cerevisiae e C. albicans*.

Brasileiro (2006) por sua vez verificou que o extrato diclorometânico apresentou atividade inibitória contra *S. aureus*, e que o mesmo extrato da planta é tóxico para o crustáceo *Artemia salina*, sendo sua DL_{50} de 72.42 ppm. Foi demonstrado que a infusão de folhas desta planta têm um baixo potencial mutagênico, e possui atividade anti-proliferativa e citotóxica (BAGATINI, 2008).

O flavonóide quercitrina (quercetina-3-O-ramnosideo) demonstrou atividade anti-inflamatória, posto que à concentração de 50μM inibiu em 78,6% de produção de óxido nítrico (NO), 76,5% de TNF – α, e 80,6% de IL – 6, sem causar citotoxicidade, e ainda reduziu a população de células no estágio S, aumentando no estagio G0 e G1 em uma relação dose dependente com $p > 0,001$ (FANG, 2008). Também é demonstrada atividade anti-inflamatória pelo modelo de edema de pata por carragenina (ERDEMOGLU, 2008).

1.2. Mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de cicatrização

Cicatrização é o termo utilizado para definir o processo pelo qual um tecido lesado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. O processo envolve componentes da matriz extracelular, células residentes (queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células nervosas), leucócitos, e mediadores de natureza lipídica (prostaglandinas, leucotrienos, fator de agregação plaquetária) e proteica (citocinas, e fatores de crescimento) (HATANAKA, 2007). Didaticamente, o processo de cicatrização é separado em quatro fases: (I) **coagulação**, (II) **inflamação**, (III) **proliferação** e (IV) **remodelamento**. Estas fases não ocorrem isoladamente, trata-se de uma sequência de eventos celulares, teciduais e bioquímicos organizados para restabelecer o tecido após a injúria (Figura 6).

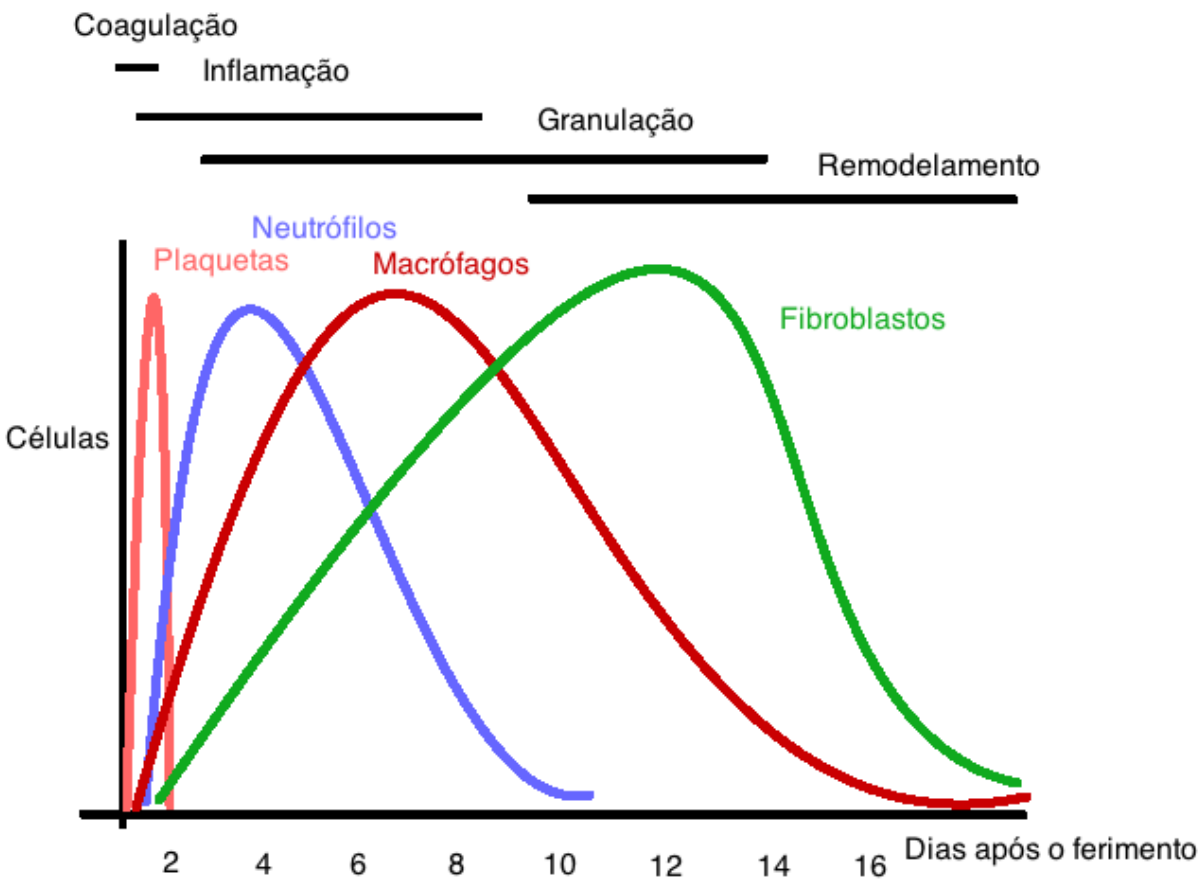


Figura 6 Relação entre os tipos celulares e as fases da cicatrização (HATANAKA, 2007).

1.2.1.Fase inflamatória.

A fase inflamatória tem duração de aproximadamente 24 a 72 horas e caracteriza-se pelo aparecimento dos sinais clássicos da inflamação como dor, calor, rubor e edema. Os mediadores químicos inicialmente liberados por plaquetas e mastócitos provocam vasodilatação, aumentam a permeabilidade dos vasos e favorecem a quimiotaxia principalmente de neutrófilos e monócitos/macrófagos que tem como função combater os agentes invasores e realizar a fagocitose dos produtos resultantes da lise tecidual (MOLLÍNEDO, 1999). Neutrófilos, além de suas conhecidas atividades de produção de proteases e espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio, estão intimamente

envolvidos com as reações de formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento e citocinas, responsáveis pela recomposição da celularidade regional e restabelecimento da homeostasia tecidual (MOLLÍNEDO, 1999).

A chegada de leucócitos ao local da inflamação depende de substâncias quimioatraentes como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Este é liberado imediatamente após a lesão em grandes quantidades a partir da degranulação das plaquetas, apresenta propriedades quimiotáticas sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos (WERNER, 2003). O TGF- β 1 é o fator de maior influencia para a infiltração de neutrófilos, e é liberado de plaquetas, macrófagos e fibroblastos, após a lesão. O TGF- β também induz vários tipos celulares a produzir mais TGF- β elevando sua concentração no foco inflamatório. Além disso exerce efeitos importantes sobre a angiogênese que é importante na fase fibroblástica e de remodelamento do tecido (WERNER, 2003).

A fase inflamatória também é modulada por quimiocinas como as proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP) (GILLITZER, 2001). As MIPs exercem uma posição estratégica durante a cicatrização. São principalmente encontradas durante os primeiros 7 dias após o ferimento e integram os eventos inflamatórios com os de reparo tecidual. São responsáveis pelo acúmulo inicial de macrófagos, células que apresentam capacidade fagocítica, de apresentação de antígenos e fonte de fatores de crescimento. Di Pietro *et al*, (1998) demonstraram em modelo murínico, que a depleção de MIP-1 no processo de cicatrização reduz de forma indireta a atividade angiogênica por reduzir a chegada de macrófagos no sítio de reparo.

A produção de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) ocorre rapidamente após o trauma. Estas mediam os sintomas associados com o trauma. Embora esta resposta (mediada por citocinas) seja parte essencial para a cicatrização, a sua produção em excesso está associada com a severidade da doença em muitos processos inflamatórios / infecciosos.

TNF-α e IL-1, por exemplo, são os principais mediadores da resposta inflamatória aguda. São importantes na ativação de células endoteliais e na expressão de moléculas de adesão, fato que contribui para o recrutamento e acúmulo de mais fagócitos na área inflamada (MOLLÍNEDO, 1999; LIU HL, 1995; ABBAS, 1998).

No sítio da inflamação, neutrófilos produzem espécies reativas de oxigênio, que são de vital importância na atividade microbicida e inflamatória destas células. A atividade microbicida é dependente da ativação do sistema NADPH oxidase, ou seja, da geração de EROs (burst respiratório) e mobilização de cátions no fagossomo (BABIOR, 1999; BORREGAARD, 1993, SHAW, 2010)

1.2.2. Fase de formação de tecido de granulação/proliferativa

Na fase proliferativa ocorre neoangiogênese, produção de colágeno jovem pelos fibroblastos e intensa migração celular (principalmente queratinócitos), promovendo a reepitelização. Inicialmente, a migração e ativação de fibroblastos são intensificadas em decorrência da liberação de mediadores principalmente, por macrófagos, destacando-se fatores de crescimento como TGF- α (Fator de crescimento transformante-alfa) e VEGF-A (Fator de crescimento vascular – endotelial - A). Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, a matriz começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Este processo é denominado de fibroplasia. Sua eficiência é dependente da ocorrência em paralelo da formação de novos vasos sanguíneos (KNIGHTON, 1981; HARTLAPP, 2001). VEGF-A é o principal regulador da vasculogênese e angiogênese durante o desenvolvimento do tecido cicatricial, assim o aumento de VEGF acelera o processo de cicatrização (BRETTBART, 2001).

Com a angiogênese e a fibroplasia se inicia a formação do tecido de granulação composto por macrófagos, fibroblastos e vasos neoformados que estão suportados por uma

matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipo I e II. Este tecido é edematoso e caracterizado pela presença de muitos espaços vazios, devido à imaturidade dos vasos, os quais são extremamente exsudativos e sangram com facilidade (CORRAL, 1999).

Sob o estímulo de fatores de crescimento e de outros mediadores, as células endoteliais do interior de capilares intactos nas margens da ferida passam a secretar colagenase e ativador do plasminogênio. Essas substâncias promovem aberturas na membrana basal que permitem a migração das células endoteliais que, atravessando a parede do vaso e utilizando como substrato a matriz extracelular provisoriamente produzida, seguem em direção à região da lesão (WERNER, 2003). As células epidérmicas possuem potencial mitótico latente e no caso de uma machucadura, o mecanismo inibitório desaparece e as células entram imediatamente em processo mitótico. Ao final desta etapa, o leito da ferida está totalmente preenchido por tecido de granulação. A rede linfática passa por regeneração e a circulação está restabelecida pela neovascularização. Lentamente, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região lesada a aparência de cicatriz devido ao acúmulo de massa fibrosa (GUIDUGLI-NETO, 1987). Os queratinócitos nesta fase tornam-se células hiperproliferativas e migratórias que produzem e secretam componentes da matriz extracelular e polipeptídeos sinalizadores, ao mesmo tempo em que seu citoesqueleto é alterado para a produção de queratina (MONTESANO, 1988).

1.2.3. Fase de remodelamento do tecido

A fase de remodelamento pode durar de meses a anos. Nesta fase, ocorre reorganização do colágeno e aumento da resistência da cicatriz, que adquire maior força tênsil e empalidece. O remodelamento envolve etapas sucessivas de produção, digestão e

orientação das fibrilas de colágeno. A deposição de colágeno é feita a princípio de maneira aleatória tendo como orientação a organização da fibronectina e dependente da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras são subsequentemente digeridas pela colagenase, novamente sintetizadas, e arranjadas de acordo com a organização das fibras do tecido conjuntivo adjacente e lateralmente ligadas por ligações covalentes. Essas ligações são formadas entre moléculas de tropocolágeno no âmbito da fibrila e entre as próprias fibrilas. Repetições sucessivas de quebra, síntese, direcionamento e ligação formam fibras maiores de colágeno, resultando numa configuração mais uniforme da cicatriz. Isso aumenta a sua resistência devido à organização das fibras acompanharem as forças mecânicas a que o tecido está sujeito durante a atividade normal. Uma ferida somente pode ser considerada resolvida depois de concluída a maturação e remodelagem da matriz extracelular.

Quando a ferida completou o seu fechamento e os microorganismos foram eliminados, os linfócitos constituem o subsistema leucocitário mais abundante em feridas humanas (CLARK, 1988). Os linfócitos não são somente efetores imunes, mas também, produtores de fatores de crescimento (ENGELHARD, 1998). De forma notável, nesta etapa, eles são atraídos para a região da ferida em igual número que os monócitos e, a partir do décimo quarto dia, são os leucócitos que predominam na região. Os eosinófilos aparecem nas últimas fases do reparo e presume-se que podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento (BLOTNIK, 1994).

Os medicamentos que agem como cicatrizantes estimulam o processo de cicatrização ou restabelecem as condições imprescindíveis à cicatrização. Usualmente são utilizados alguns medicamentos para aumentar o processo da cicatrização, como: Bepantol© (dexpantenol) Bayer, Fibrase© (fibrinolisina, desoxirribonuclease, cloranfenicol) Pfizer, Kollagenase© (Colagenase e Cloranfenicol) Cristalia, Iruxol Mono© (colagenase)

Abbott, Paraqueimol© (Sulfacetamida sódica) Aché, e Trofodermin© (Acetato de Clostebol) Pfizer (DEF 2007/2008; ANVISA, 2010), entre outros.

2. Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi verificar a atividade cicatrizante de do extrato hidroetanólico a 70% das partes aéreas de*S. chilensis*, focando no estudo da fase inflamatória do reparo tecidual e nas funções de neutrófilos através de ensaios *in vivo*.

2.1. Objetivos específicos

- Obter o extrato hidroetanólico a 70% das partes aéreas de *S. chilensis*,
- Fracionar o extrato com clorofórmio, acetato de etila e água,
- Realizar a triagem fitoquímica do extrato e das frações,
- Obter o perfil cromatográfico em CCD e CLAE do extrato e das frações,
- Isolar os compostos majoritários,
- Verificar a carga microbiana da planta, da droga, do extrato e das frações, bem como análise de endotoxinas do extrato e das frações,
- Analisar a citotoxicidade *in vitro* nos tipos celulares em que for encontrada ativação ou inativação frente ao extrato e frações,
- Analisar *in vitro* a produção de citocinas por neutrófilos,
- Verificar a atividade cicatrizante do extrato e das frações, após a indução de ferimento em ratos, através da análise macroscópica do processo de cicatrização (área e tamanho do ferimento),
- Analisar a migração de neutrófilos em bolsa de ar induzida no dorso e mediadores inflamatórios liberados (TNF-a, IL-1b e CINC-2α/β) na área do ferimento e na bolsa de ar induzida frente ao extrato e às frações.

3. Justificativa do trabalho

O conhecimento dos mecanismos pelos quais *S. chilensis* interfere nas fases de reparo tecidual é essencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desta forma, este estudo visa definir possíveis efeitos da *Solidago chilensis* na fase inflamatória do processo de cicatrização de feridas.

Nesse sentido, foram utilizados neutrófilos, pois estas células estão presentes na fase inflamatória do processo de cicatrização e são envolvidas com as reações catabólicas de degradação de tecidos através da produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; apresentam atividade no processo de angiogênese e formação de tecidos através da produção de fatores de crescimento; e liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio (PARK, 2004; GILLITZER, 2001; WERNER, 2003). Sabe-se que a produção excessiva de citocinas e espécies reativas de oxigênio por leucócitos pode levar à injúria tecidual e a morte celular. Sendo assim, a hiper ou hiporresponsividade encontrada em células tratadas com *S. chilensis* pode desencadear ativação apropriada, contribuindo para o processo de cicatrização, ou inapropriada, aumentando a susceptibilidade do organismo a microorganismos invasores. Neste aspecto, é importante a verificação de seu potencial antioxidante sua influencia na migração de neutrófilos e na liberação de citocinas importantes no processo como TNF- α, IL-1 β e CINC-2α/β.

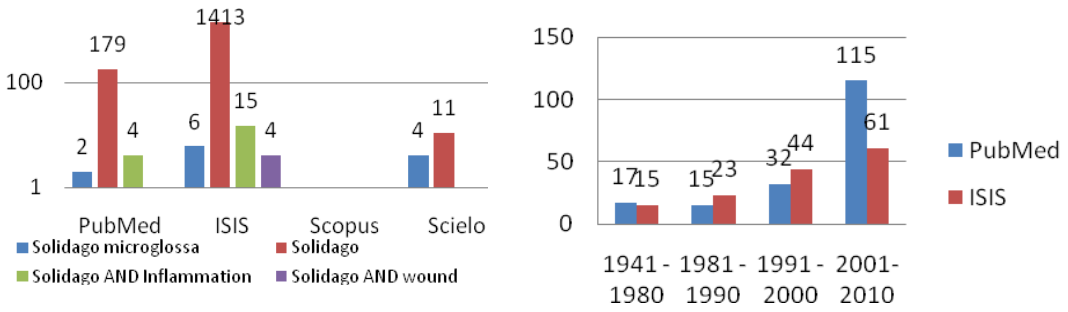
Neste estudo foram utilizados modelos animais. Para isso, ratos com feridas induzidas e tratadas com *S. chilensis* foram monitorados quanto aos seguintes aspectos: (a) análise macroscópica do processo de cicatrização (tamanho); (b) migração celular e (c) análise por ELISA (kit DuoSet® ELISA Development Systems) das citocinas presentes na área do ferimento.

Vários pontos são relevantes quando consideramos que ~~a~~ *S. chilensis* contém substâncias que podem regular o processo de regeneração do tecido. Por exemplo, para

otimizar a intervenção terapêutica, torna-se necessário o conhecimento prévio do efeito do fármaco na cronologia da lesão, a fim de maximizar os efeitos benéficos do tratamento. A partir da análise efetuada neste trabalho, pretende-se eleger a forma ideal de intervenção com o objetivo de potencializar o evento predominante. Extratos de origem vegetal são utilizados em ferimentos, principalmente em países da América Latina (CARDOSO, 2004). A perspectiva futura é que, se houver efeitos benéficos, estes sejam evidenciados, bem como o mecanismo envolvido determinado. Além disso, será possível desenvolver formulações (biomembranas, géis, pomadas) para aplicação em humanos.

A espécie *S. chilensis* é altamente utilizada pela população brasileira, apesar de somente poucos estudos terem sido publicados em revistas indexadas (figura 1).

A espécie é altamente adaptável, de fácil cultivo e baixo custo, o que garante à espécie vegetal um lugar na lista da ANVISA de plantas de interesse (LORENZI, 2002). Se for acrescentado o interesse crescente no gênero, comprovado pelo aumento de estudos publicados (Figura 7), e a comprovação de espécies do mesmo gênero com atividade cicatrizante (TAMURA, 2009) torna-se imprescindível fazer um estudo dos componentes presentes em frações de várias polaridades e sua relação com atividade.



(A) (B)

Figura 7 (A) Número de publicações encontradas na revisão da literatura em diferentes bases de dados (Pub Med, Thompson, Scopus e Scielo) com as palavras chaves: Solidago, *Solidago chilensis*, Solidago e Infamação e Solidago e Cicatrização. (B) Número de publicações sobre o gênero *Solidago* por década.

4. Material e métodos

O fluxograma apresentado na Figura 8 relaciona não cronologicamente os experimentos. Em rosa estão os ensaios - **biológicos**, sejam eles *in vitro* (ovalados) ou *in vivo* (quadrados), -**químicos** em laranja, - os **extratos** em verde e a - **preparação** destes em azul. Com o LHEE.

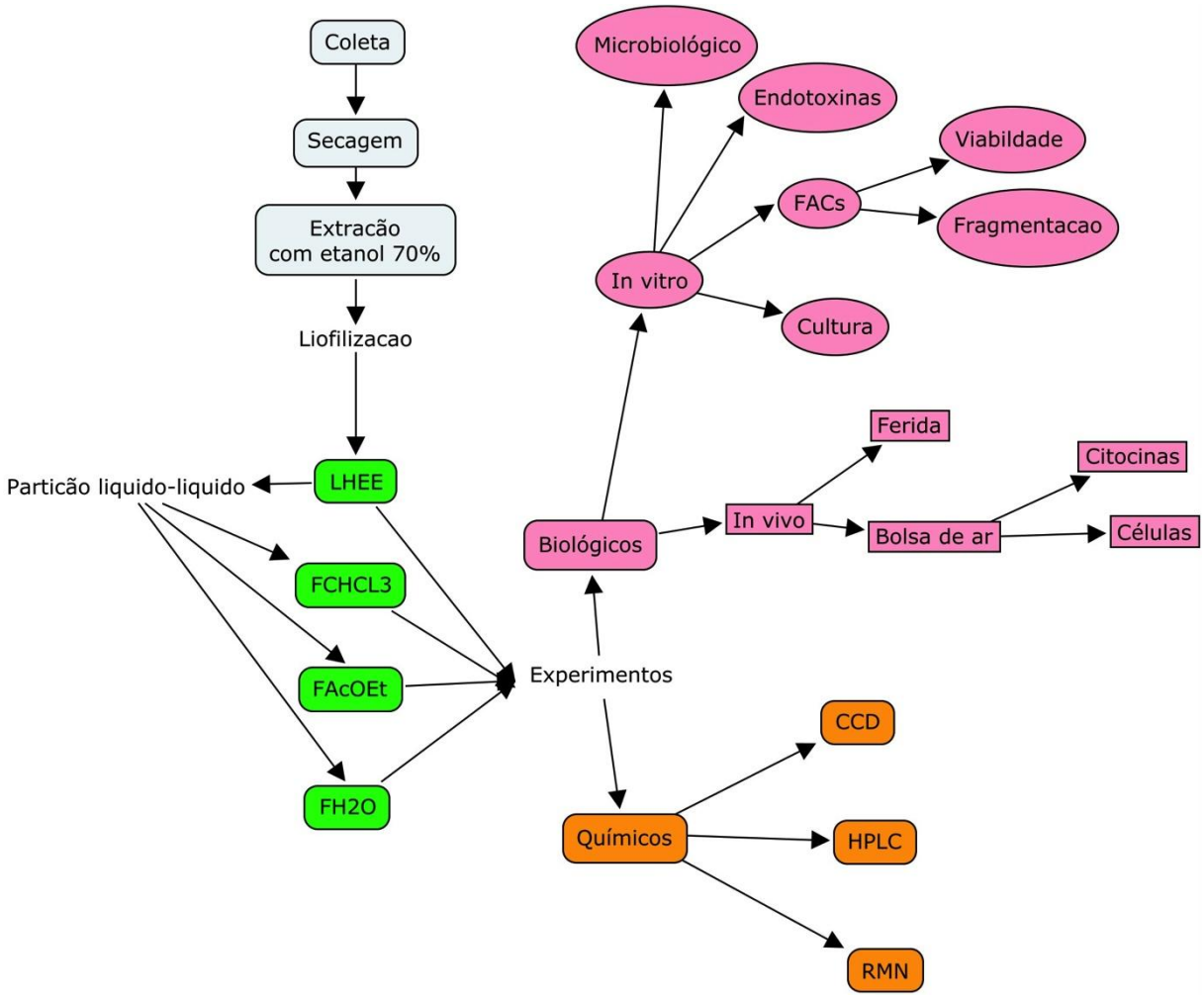


Figura 8 Fluxograma dos experimentos realizados com os extratos de *S. chilensis*

4.1. Obtenção dos extratos

As partes aéreas da espécie vegetal (depositada no herbário da Unicamp sob número UEC 121.391) obtidas por cultivo pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP) foram secas em estufa a 40° C com circulação de ar, marca Estufa Soc.Fabbe Ltda, e pulverizadas em moinho de facas e martelos marca Thomas®, passando por tamis de 1 mm. O extrato hidroetanólico a 70% foi obtido por percolação da droga vegetal, segundo o método "A" da Farmacopéia Brasileira 2° ed (1959). O extrato foi evaporado por rotaevapor Büchi R-114, à pressão reduzida e temperatura limite de 40 °C e então liofilizado em liofilizador LK4, da marca Edwards do Brasil, obtendo-se assim o extrato hidroetanolico liofilizado (LHEE - liofilized hydroethanolic extract). Este foi acondicionado em frascos de vidro âmbar fechado, em dissecador contendo sílica. Três quartos da massa total foram fracionados consecutivamente por partição liquido-liquido com solventes de polaridade crescente da marca Synth grau P.A., obtendo-se ao final 3 frações, clorofórmio ($FCHCl_3$), acetato de etila (FAcOEt) e aquosa (FH_2O). Essas frações foram concentradas em rotaevaporador e liofilizadas de acordo com o mesmo processo descrito acima (CECHINEL FILHO, 1998; GOULART, 2007).

4.2. Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica foi realizada para o LHEE e para as frações. Foram realizados testes para os seguintes grupos de princípios ativos:

a. Cumarinas: visualização em solução alcalina com aparecimento de coloração amarela, e visualização do extrato sob a luz UV 466nm (fluorescência azul ou verde) (SIMÕES, 2006);
b. Polifenóis: reação com cloreto férrico ($FeCl_3$) (SIMÕES, 2006);

c. Flavonóides: cianidina (Shinoda), cloreto de alumínio e hidróxido de sódio (COSTA, 2001);
d. Taninos: acetato de chumbo, proteína (gelatina), alcalóides, reação com FeCl3) (COSTA, 2001; SIMÕES, 2007);
e. Antraquinonas: reação de Borntraeger (COSTA, 2001);
f. Saponinas teste de espuma (COSTA, 2001).

4.3. Perfil cromatográfico e isolamento dos compostos majoritários

4.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

O perfil cromatográfico por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizado para o LHEE e para as frações com o seguinte sistema cromatográfico:

a. Cromatografia ascendente;
b. Placas de vidro de 20 x 20 cm, recobertas com sílica gel 60_{F254};
c. Saturação total (1 hora), temperatura ambiente;
d. Concentração do extrato de 1mg/ml;
e. Fase móvel acetato de etila (AcOEt), ácido fórmico, ácido acético, etilmetilcetona, água (50: 7: 3:30:10) (WAGNER, 1996).

Para determinação de compostos fenólicos o revelador foi cloreto férrico (COSTA, 2001), com visualização a luz visivel (COSTA, 2001); flavonóides, revelador NP (ácido difenilbórico 2-amino etiléster) (WAGNER, 1996; COSTA, 2001) e visualização ultravioleta a 365nm (após NP) (WAGNER, 1996); para terpenos o revelador é anisaldeído sulfúrico (AS) seguido de aquecimento a 100°C por 5 min. (WAGNER, 1996).

4.3.2. Cromatografia liquida de alta eficiência

O perfil por CLAE foi realizado em um equipamento Shimadzu® LC-20A, detector PDA (Photodiode Array), coluna Shimadzu® C18 Shim-Pack VP-ODS de 250 mm x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm. Inicialmente foi feita uma corrida em gradiente de 60 min., 5-100% B (acetonitrila grau HPLC Tedia®) em água Milli-Q® neutra, com fluxo de 1mL/min para avaliar qual a polaridade dos principais compostos. Posteriormente essa corrida foi otimizada para uma melhor separação dos picos, originando o gradiente de acetonitrila (grau HPLC Tedia®) de 60 min., 10%-60% e de 60% a 100% em 15 min conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1 Configuração das corridas cromatográficas em CLAE desenvolvidas para otimizar a separação dos componentes dos extratos FAcOEt e FH_2O

Extrato	Solvente (solubilização da amostra	Nº da corrida	Concentração da amostra	Corrida, em porcentagem de ACN
Aquoso	H2O	C1	1mg/ml	
AcOEt	Acetona	C2	0,5mg/ml	5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5'
AcOEt	Acetona	C2	0,5mg/ml	5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5'
AcOEt	MeOH	C3	0,5mg/ml	5' 10%, 10' 25%, 70', 45%, 75' 100%, 80' 100%, 85' 5%
Aquoso	H2O	C4	1mg/ml	5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5%
AcOEt	MeOH	C5	0,5mg/ml	5' 10%, 10' 25%, 26', 26' 30%, 30' 100%, 35' 100%, 40' 5%
AcOEt	MeOH	C6	0,5mg/ml	5' 26%, 20' 26%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C7	0,5mg/ml	5' 5%, 50' 30%, 55' 100%, 60' 100%, 65' 5%
AcOEt	MeOH	C7	0,5mg/ml	5' 5%, 50' 30%, 55' 100%, 60' 100%, 65' 5%
AcOEt	MeOH	C8	0,5mg/ml	5' 24%, 20' 24%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C9	0,5mg/ml	5' 25%, 20' 25%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C10	0,5mg/ml	5' 23%, 20' 23%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C11	0,5mg/ml	5' 22%, 20' 22%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C12	0,5mg/ml	5' 21%, 20' 25%, 21' 100%, 30' 100, 35' 5%
AcOEt	MeOH	C13	0,5mg/ml	5' 20%, 20' 25%, 20' 100%, 30' 100, 35' 5%

4.3.3. Identificação dos compostos

A fração FAcOEt foi analisada por RMN 300 MHz e CLAE - MS na integra pois, uma vez que o componente majoritário é muitas vezes mais abundante que os outros componentes seu sinal subrepuja-os possibilitando sua identificação sem que haja a necessidade de isola-lo. Já a $FCHCl_3$ foi fracionada por cromatografia em coluna (CC) e placas de CCD preparativa de 1000µm.

4.4. Carga microbiana

A análise microbiológica foi realizada para a droga seca, através da contagem de microrganismos viáveis totais empregando-se o método de contagem em placas (F. Bras. IV, 1988):

Uma amostra de 10g da droga foi dispersa em 90 mL de meio de cultura. Posteriormente foram feitas diluições seriadas, adicionando 1mL em um tubo de ensaio contendo 9mL de TSB (caldo tripticaseína de soja) sucessivamente. Cada uma dessas diluições foi plaqueada (em duplicata) em ágar triptona soja TSA (Trypticase soy agar) e incubada a 36º C para crescimento bacteriano e ágar Sabouraud dextrose SDA (Sabouraud Dextrose Ágar.) incubado a 25ºC para crescimento de fungos (SOUSA, 2006).

4.5. Endotoxinas

O ensaio de endotoxinas foi realizado pelo laboratório CONFAR® (Laboratório de Controle de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos afins a as Respectivas Matérias-Primas) nos extratos LHEE, $FCHCl_3$, FAcOEt e FH_20.

O teste realizado foi o LAL (Limulus amebocyte lysate) utilizando o kit Lonza® 50-650U (LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE, 2010).

4.6. Ensaios biológicos

Os ensaios de cicatrização foram realizados nas instalações da Universidade Cruzeiro do Sul, sob a coordenação da Profa. Dra. Elaine Hatanaka, e aprovados pelo comitê de ética da referida instituição sob o numero 47/05/2011 e ratificados pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP.

As amostras foram dissolvidas em tampão isotônico fostato-salino PBS (phosphate buffered saline) estéril ou quando não diretamente solúveis em solventes hidrofílicos foram dissolvidos em etanol e então diluídos com PBS, sempre mantendo uma concentração de etanol final inferior a 0,05% (concentração testada em experimentos prévios que não demonstrou causa alteração fisiológica celular).

4.6.1. Cultura celular, necrose e apoptose.

Neutrófilos foram obtidos por lavagem intraperitoneal de ratos, utilizando 40mL de PBS, 3 horas depois de uma inoculação intraperitoneal de glicogênio de ostra (Sigma tipo II, de ostra) para induzir a migração de neutrófilos. O lavado foi centrifugado por 10 min. a 4º C em 500G. As condições de tratamento foram: meio de cultura RPMI – 1640 com 10% suplementado com SBF (soro bovino fetal), glutamina (2 mM) e Hepes (20mM) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 10^6 células, a 37º C e 5% de CO_2. O numero de células viáveis foi determinado por contagem em câmara de Neubauer por exclusão de trypan blue em microscópio óptico. Os tratamentos foram preparados dissolvendo as amostras (LHEE, FH_2O, FAcOEt, $FCHCl_3$) em etanol 100% a uma concentração de 0,1mg/ml e então diluídos com água estéril até a concentração de 0,1µg/ml, seguido de diluições decimais seriadas. Como controle foram usadas células não tratadas. Todas as analises foram feitas em duplicatas.

Os neutrófilos foram transferidos para placas de 96 poços e foi adicionada uma das 4 amostras (LHEE, FH_2O, FAcOEt, $FCHCl_3$) em uma das concentrações finais de 0,1000µg/ml, 0,0100µg/ml, 0,0010µg/ml ou 0,0001µg/ml. Esses 5 grupos (controle e extrato nas 4 concentrações) também foram testados com a adição concomitante de um estimulo positivo LPS (5 ρg/mL) para a verificação da ação anti-inflamatória. Após o tempo de incubação as placas de cultura foram centrifugadas a 500G por 5 min a 4º C. O sobrenadante foi guardado a -80º C para doseamento de CINC, VEGF, L-selectina, TNF- α e IL-1β por ELISA (DuoSet kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e o precipitado (pellet) para as analises de necrose e apoptose.

4.6.1.1. Ensaio de Integridade de membrana (necrose celular)

As placas de cultura foram cultivadas conforme descrito acima e o pellet ressuspendido em 450 mL de PBS e 50 mL de iodeto de propidio (50 mg/mL em PBS) e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton–Dickinson, USA). O iodeto de propidio é um composto fluorescente altamente solúvel em água que não penetra em membranas celulares integras. A fluorescência foi medida usando o canal FL2 (laranja – vermelho 585/42 nm). Dez mil eventos foram analisados por experimento e as células com fluorescência foram analisadas pelo software Cell Quest (Becton– Dickinson)

4.6.1.2. Ensaio de fragmentação de ADN (apoptose)

As células foram incubadas e centrifugadas como descrito acima. O pellet foi ressuspendido em 450 mL de solução hipotônica (0.1% citrato de sódio, e 0.1% Triton-X-100) e 50ml de iodeto de propidio (50 mg/mL em PBS), e então incubado por 30 min. Esse detergente permeabiliza as células permitindo a entrada do corante que se incorpora a

fragmentos de ADN. Assim quanto maior a fragmentação maior a fluorescência. A leitura também foi realizada como descrito acima.

4.6.2. Ensaio de ferida aberta

O ensaio de cicatrização foi realizado com 20 ratos Wistar machos (150 a 180g), oriundos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, separados aleatoriamente em 5 grupos de 4 animais: - controle (PBS); - Dersani® (usado para comparar com um medicamento usualmente utilizado em postos de saúde) (MAGALHÃES, 2007); - LHEE; - LHEE suspendido em gel de carbopol ETD 2020 (extrato incorporado a 10%).; - e gel ETD 2020. Todos os animais receberam água e ração da marca Purina® *ad libitum* e foram acondicionados em caixas de polietileno em condições de umidade e temperatura ambientais (46-50%, 22°C), com fase de claro e escuro de 12 horas cada (GARROS, 2006). Os animais foram anestesiados por xilazina (20 mg.mL-1) e ketamina (50mg.mL-1) (FACURY NETO, 2004), e então tiveram o dorso tricotomizado seguido de limpeza com etanol 70% (FACURY NETO, 2004; LIMA., 2006). Uma ferida foi então aberta, até a fáscia muscular, com uma tesoura cirúrgica e um modelo de área guia de $1cm^2$, criando uma ferida de $1cm^2$ (GARROS, 2006; LIMA, 2006). Após a cirurgia os animais receberam topicamente 0,1 mL de um dos cinco tratamentos 1 vez ao dia (GARROS, 2006), por 15 dias ou até o fechamento total da ferida, permanecendo em gaiolas individuais (LIMA, 2006). O tamanho dos ferimentos foi medido no tempo inicial, nos primeiros 3 dias e então a cada 2 dias por meio de fotografia digital a uma distância padronizada de 60 cm e análise digital pelo software Image Pro-Plus.

4.6.3. Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril

O efeito do extrato LHEE sobre a migração de neutrófilos *in vivo* foi avaliado através da indução de bolsa de ar estéril no tecido subcutâneo do dorso de ratos. Sete dias após a administração de 20 mL de ar esterilizado por filtro com diâmetro menor que 0,22µm as bolsas foram novamente insufladas com 10ml de ar esterilizado e foi adicionado 1 mL de PBS para controle, 1 mL de PBS estéril contendo o extrato LHEE a 0,01mg/ml (dose não letal para neutrófilos testada em ensaio de fragmentação de ADN e de viabilidade celular) o que corresponde a uma dose de 0,033mg/kg, 1mL de PBS estéril contendo o estímulo positivo para quimiotaxia fMLP (N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine) (10 nM) ou 1mL de PBS estéril contendo uma mistura 1:1 da solução de fMLP (10 nM) e LHEE. Quatro horas após a injeção do estímulo, os animais foram eutanasiados e o exsudado inflamatório foi coletado por lavagem da cavidade formada com 5 mL de PBS. A suspensão foi centrifugada a 400 G por 10 min. a 4°C. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 1 mL de PBS, tendo seu número contado em câmara de Neubauer. O sobrenadante foi congelado para a dosagem posterior de citocinas pelo método de ELISA (DuoSet kit; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) para as seguintes citocinas, TNF, CINC-2ab, MIP, IL-6, IL-1, TNF e L-selectina (TAMURA, 2009).

4.7. Análise estatística

Todos os resultados foram comparados usando ANOVA, seguido do teste de ajuste de p utilizando o método de Bonferroni. Resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0.05$.

5. Resultados

5.1. Obtenção dos extratos

A planta foi coletada diretamente da coleção de espécies vegetais do CPQBA/UNICAMP no dia 14 de abril de 2010, totalizando uma massa de 2,760kg. Depois de seco obteve-se a massa de 658g (24% da massa fresca), sendo a temperatura da estufa de secagem não maior que 40º C, garantindo uma maior segurança para a estabilidade dos metabólitos secundários. A moagem resultou em uma massa de 561g (85% da droga seca ou 21% da planta fresca).

A partir da droga moída foi realizada a percolação utilizando-se 7 litros de solvente (etanol - água, 7:3). O extrato foi concentrado em rota-evaporador em pressão reduzida, para a retirada do etanol, e liofilizado obtendo-se uma massa de 81,5g, 14% da droga moída (3,46% da planta fresca), apresentando-se em forma de pó higroscópico, de coloração castanho-clara e aroma levemente adocicado. Utilizando 56,25g do extrato liofilizado (aproximadamente 2/3) foi feito o fracionamento. Este foi realizado por partição liquido-liquido, formando uma suspensão em água a 10%, seguido de extração pela adição consecutiva dos solventes $CHCl_3$ e AcOEt, restando no final a fração aquosa. Após o fracionamento obteve-se 38,13g da fração aquosa (67,79% do liofilizado, e 2,426% da planta fresca), 4,44g da fração acetato de etila (7,89% do liofilizado e 0,273% da planta fresca) e 10,64g da fração clorofórmica (18,92% do liofilizado e 0,677% da planta fresca), assim um rendimento total (somando a massa das 3 frações) de 94,06%.

5.2. Triagem fitoquímica

A triagem fitoquímica demonstrou a presença de compostos fenólicos e saponinas na fração aquosa e taninos e flavonóides na fração acetato de etila. Não foi possível determinar

a presença de outros componentes nem desses nas outras frações devido á coloração dos extratos dificultar a visualização da mudança de cor.

5.3. Perfil cromatográfico e Isolamento dos compostos majoritários

5.3.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os cromatogramas obtidos por CCD demonstram que o fracionamento foi eficiente para a separação de compostos, com 12 bandas no LHEE e na FH_2O, 6 na FAcOEt e 8 na $FCHCl_3$, como mostra a figura 9 abaixo. A fração $CHCl_3$ extraiu principalmente compostos de baixa polaridade que não são revelados por NP, por exemplo os compostos terpenicos, com pode ser observado no cromatograma em camada delgada revelado com anisaldeido sulfúrico, já a fração AcOEt concentrou a grande quantidade de compostos fenólicos como a grande banda amarela presente na parte superior (Figura 9), enquanto isso o resíduo aquoso reteve em maior quantidade de compostos mais polares, corroborando o encontrado nos resultados obtidos na triagem fitoquímica. Nas figuras A e B são mostrados os compostos fenólicos. Fica claro que na fração de polaridade intermediária há predominância de um determinado composto, uma vez que ele aparece como uma grande banda amarela e até se sobrepõe às outras que estão próximas. Esse resultado é confirmado pela análise por CLAE em que o pico majoritário satura o detector ultrapassando 4000 mAU (figura 10). Na figura C são mostrados os compostos terpenicos como a α-amirina e o bauerenol (identificado por outros autores (CERDA-GARCÍA-ROJAS, 1996; DE CARVALHO, 1998).e também encontrados nesse extrato).

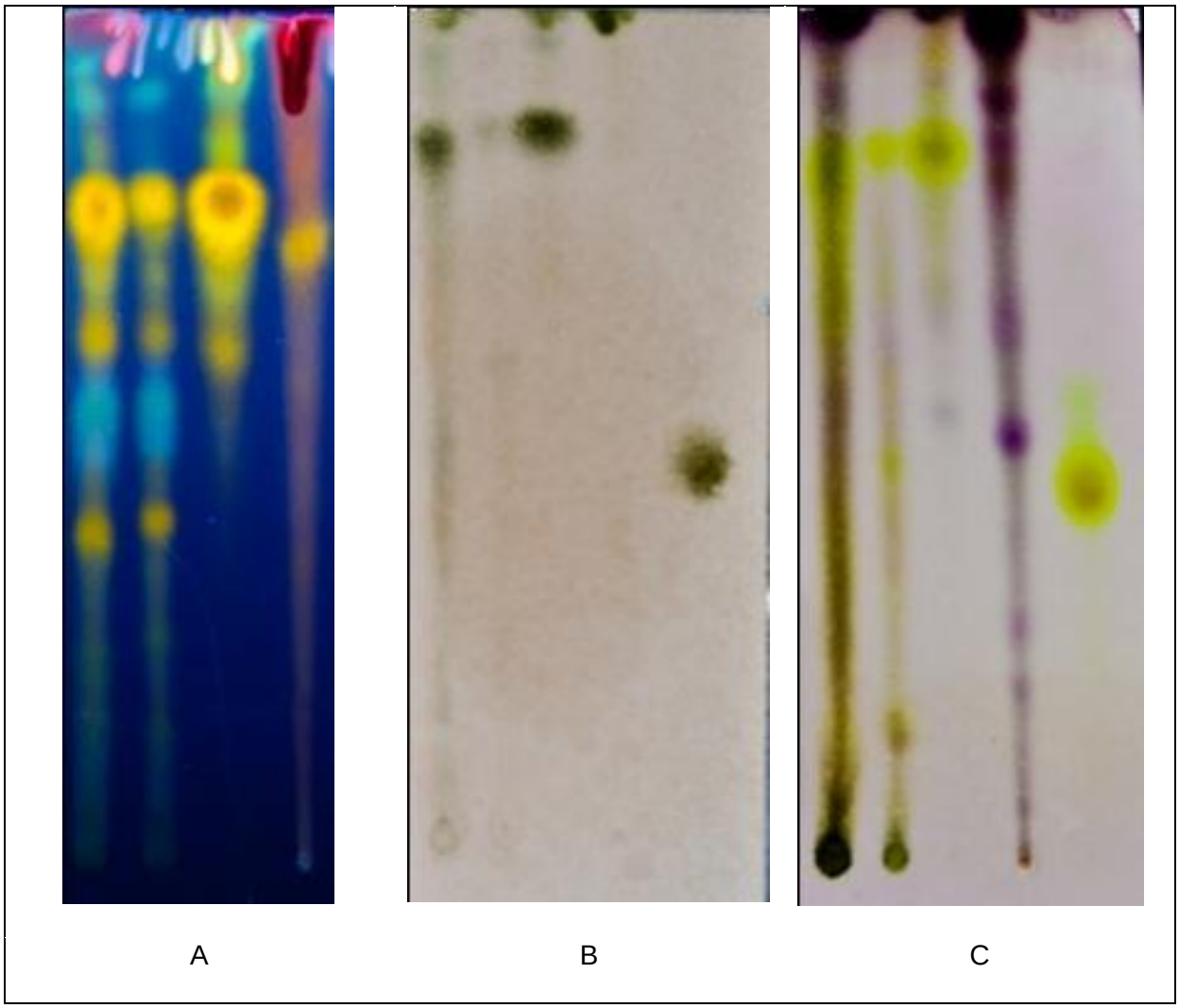
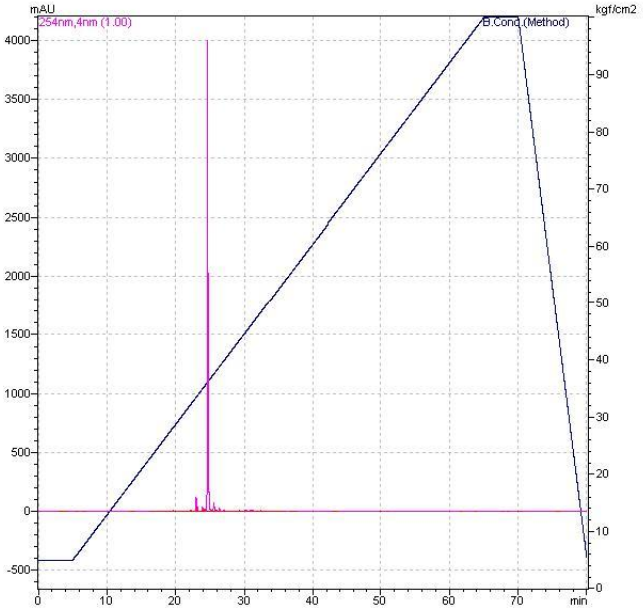


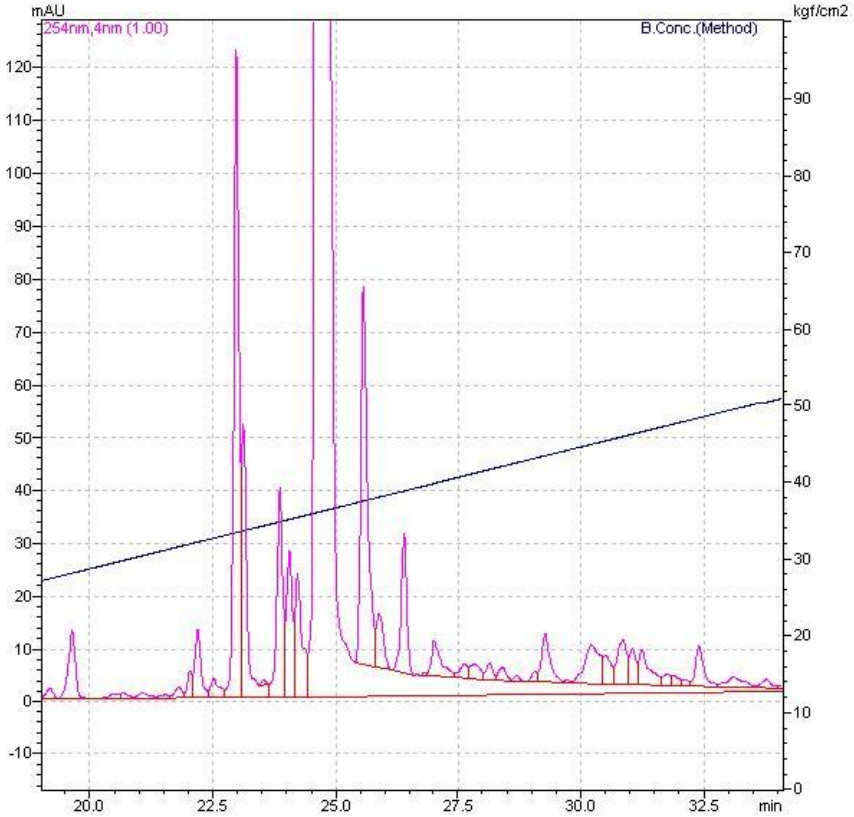
Figura 9 Cromatogramas obtidos por CCD com o extrato e as frações de *S. chilensis* com a fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, etil-metil-cetona, água (50: 7: 3:30:10) (WAGNER , 1996). Na sequencia, da esquerda para a direita no cromatograma A: extrato bruto (etanol 70%), fração aquosa, fração acetato de etila, e fração clorofórmica, e nos cromatogramas B e C extrato bruto (etanol 70%), fração aquosa, fração acetato de etila, fração clorofórmica e padrão de quercetina. (A) Revelador NP em visualização em UV, 466 (B) Revelador FeCl3 em visualização em luz visível, (C) Revelador AS em visualização em luz visível

5.3.2. Cromatografia liquida de alta eficiência

Os cromatogramas obtidos por CLAE foram desenvolvidos inicialmente como descritos na metodologia e são apresentados nas Figura 10 Figura 11 (FAcOEt e FH_2O, respectivamente).

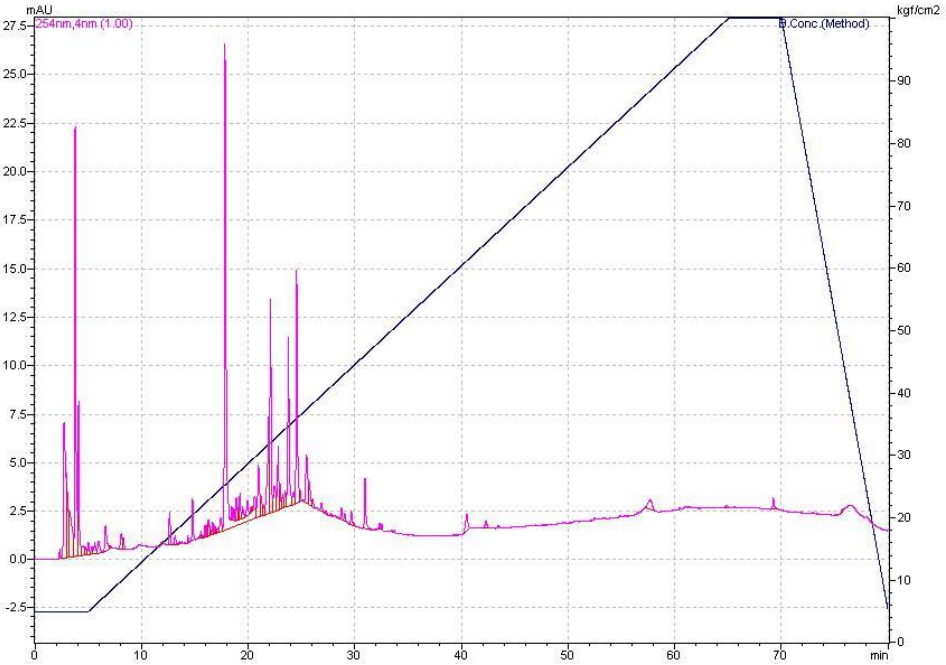


A

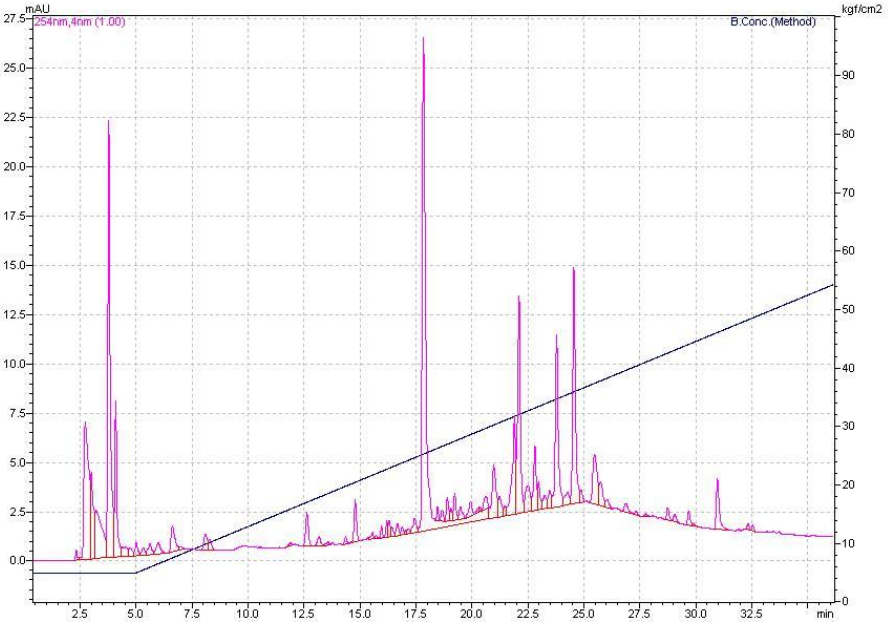


B

Figura 10 Cromatograma obtido por CLAE para a fração acetato de etila de *S. chilensis*. Gradiente de acetonitrila de 5%- 100% em 60 min., (A) plano geral, (B) detalhe.



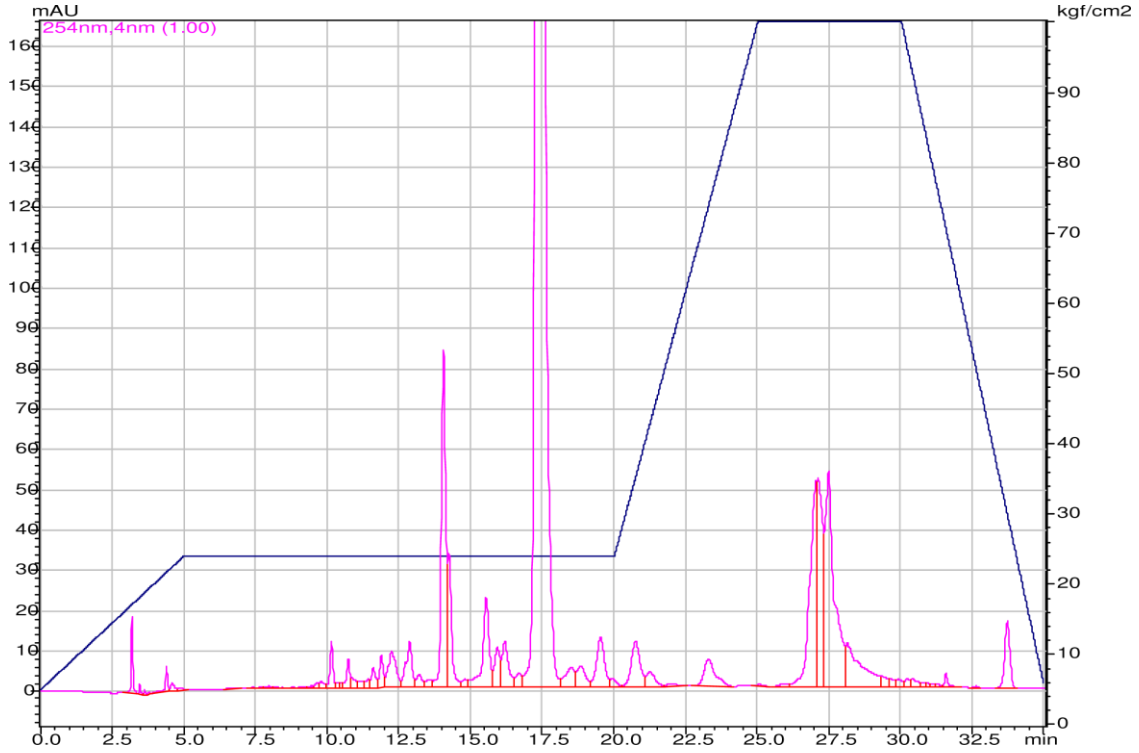
A



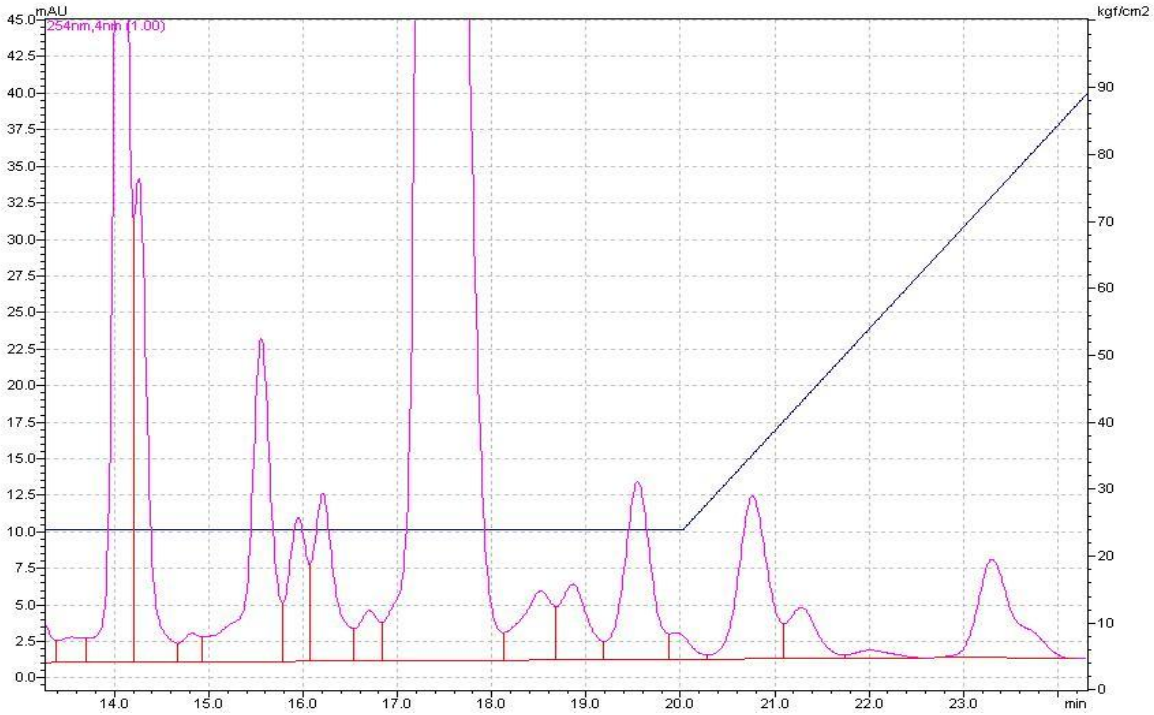
B

Figura 11 Cromatograma obtido por CLAE para a fração aquosa de *S. chilensis*. Gradiente de acetonitrila de 5%-100% em 60 min, (A) plano geral, (B) detalhe.

A partir dos cromatogramas obtidos, foram ensaiadas novas fases para se obter uma separação melhor dos picos como mostra a Tabela 1 Configuração das corridas cromatográficas em CLAE desenvolvidas para otimizar a separação dos componentes dos extratos FAcOEt e FH_2O e os cromatogramas Figura 12Figura 13. Com a concentração próxima de 24% de acetonitrila, um maior número de picos pode ser separado na FAcOEt (C8). Aumentando a concentração de ACN em 1% alguns picos se tornam mais definidos, mas um número maior deles se sobrepõe. Já ao reduzir a quantidade do solvente apolar fica nítida a formação de picos com “ombro” indicando que mais de uma substancia está presente naquele sinal. A FH_2O foi desenvolvida conforme a Tabela 1 e está apresentada na Figura 13

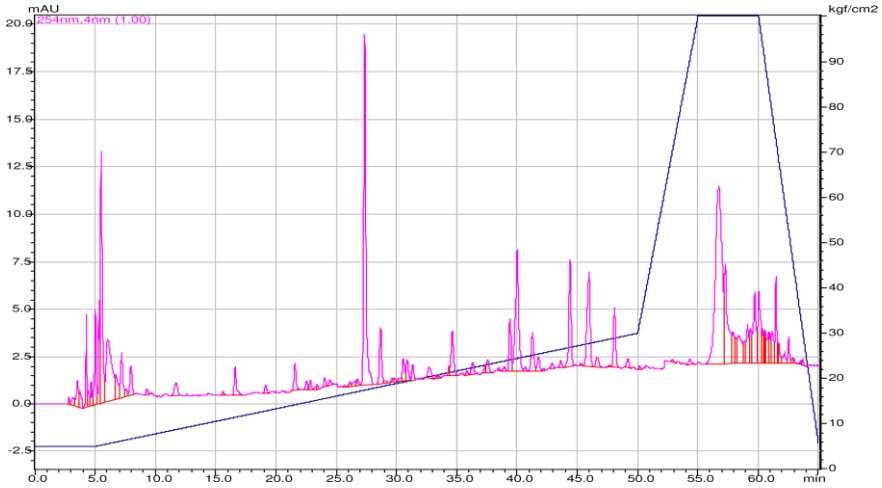


(A)

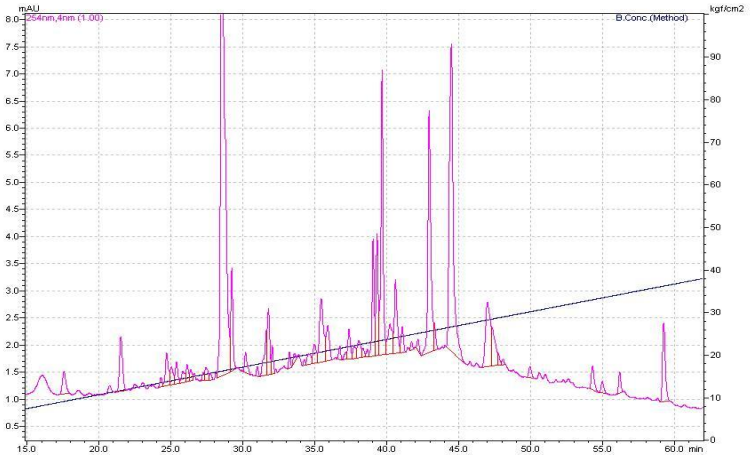


(B)

Figura 12 Cromatograma obtido por CLAE para a fração AcOEt de *S. chilensis*. Gradiente de acetonitrila de 5' 24%, 20' 24%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5 (A) plano geral, (B) detalhe.



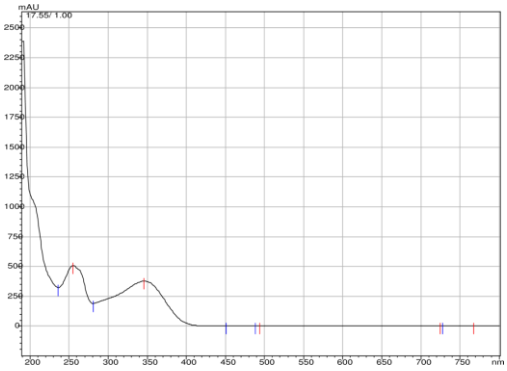
(A)

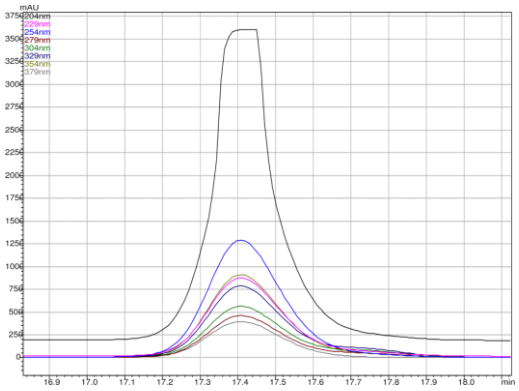


(B)

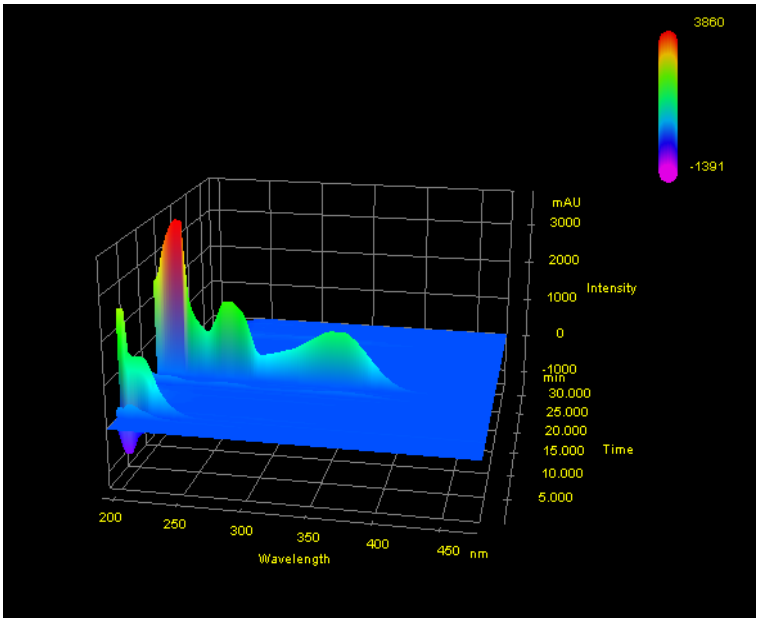
Figura 13 Cromatograma obtido por CLAE para a fração aquosa de *S. chilensis*. Gradiente de acetonitrila de 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) plano geral, (B) detalhe

Na fração FAcOEt o composto majoritário apresentou um tempo de retenção de 17.403 min. Esse pico possui uma alta pureza e seu espectro apresenta picos de absorbância em 204, 254 e 354 nm (Figura 14).





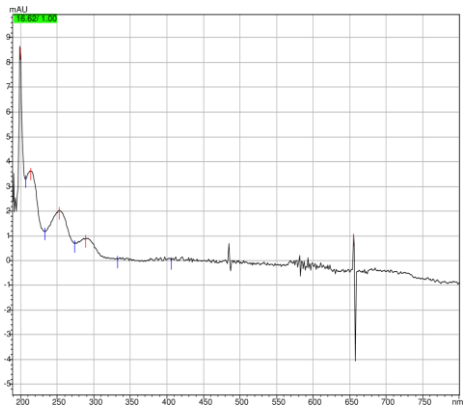
(A) (B)

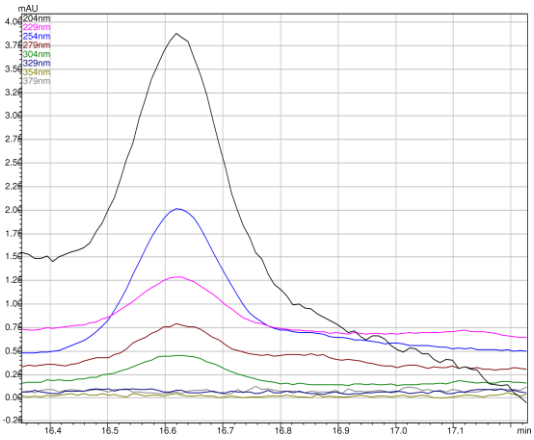


(C)

Figura 14 Espectro obtido por CLAE para o pico de retenção 17.403 min da fração AcOEt de *S. chilensis*. Gradiente de ACN de 5' 24%, 20' 24%, 25' 100%, 30' 100, 35' 5% (A) Picos de absorbância, (B) pureza (C) imagem 3D (eixo x = comprimento de onda, y = fluorescência e z = tempo de retenção.

Essas características também foram encontradas em um dos picos do extrato aquoso com retenção 16.617 min, apesar de não apresentar a mesma pureza (Figura 15).

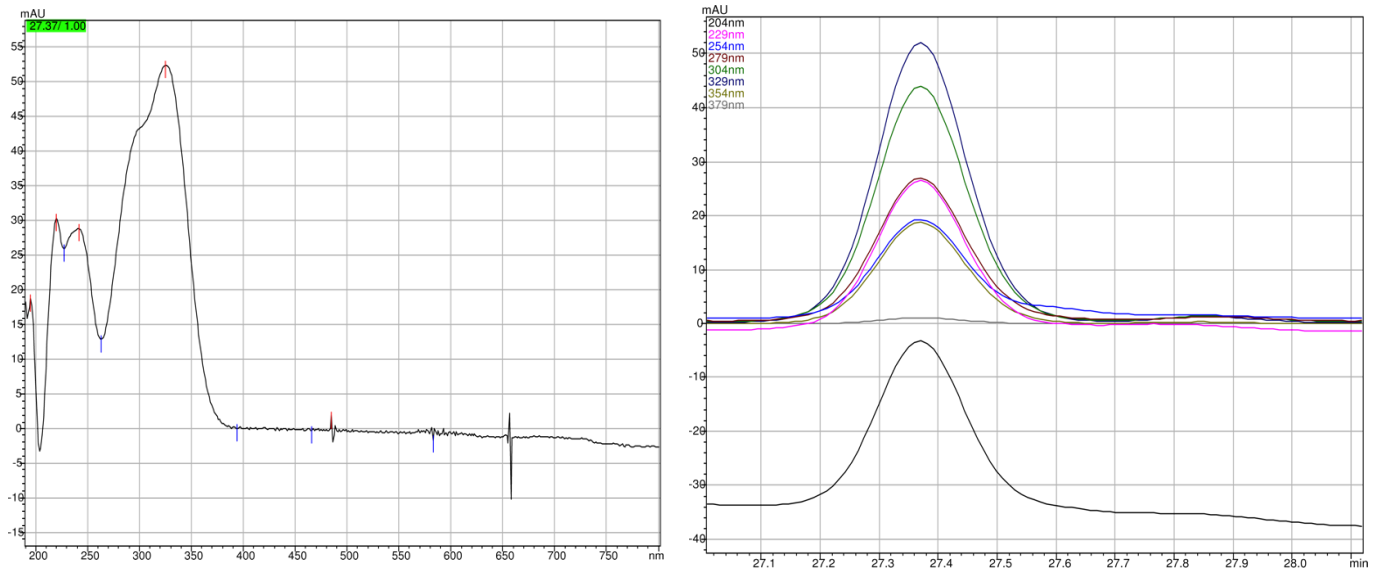




A B

Figura 15 Espectro obtido por CLAE para o pico de retenção 16.62 min da fração aquosa de *S. chilensis*. Gradiente de ACN de 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) Picos de absorbância, (B) pureza

No extrato aquoso o pico majoritário apresenta um tempo de retenção de 27.364 min. e picos de fluorescência em 190, 220, 240 e 325nm (Figura 16)



A B

Figura 16 Espectro obtido por CLAE para o pico de retenção 27.364 min da fração aquosa de *S. chilensis*. Gradiente de ACN de 5' 1%, 65' 40%, 70' 100% 75' 100%, 80' 5% (A) Picos de absorbância, (B) pureza

Uma vez que esta descrito na literatura que nesta espécie vegetal está presente o flavonóide quercitrina, foi realizado um cromatograma (gradiente de ACN de 5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5), utilizando um padrão de quercitrina para comparar seu tempo de retenção Figura 17 e picos de absorbância (Figura 18) com os cromatogramas realizados com as amostras de *S. chilensis*. Foi detectado que apresenta picos de absorbância iguais aos obtidos nas frações AcOEt e aquosa, sendo seu majoritário em 26.154 min. o que fortalece a hipótese de ser o mesmo flavonóide.

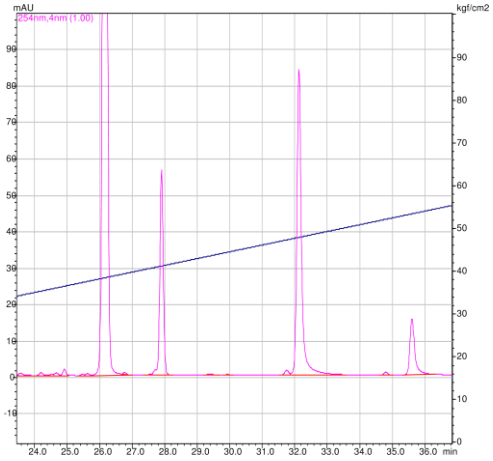
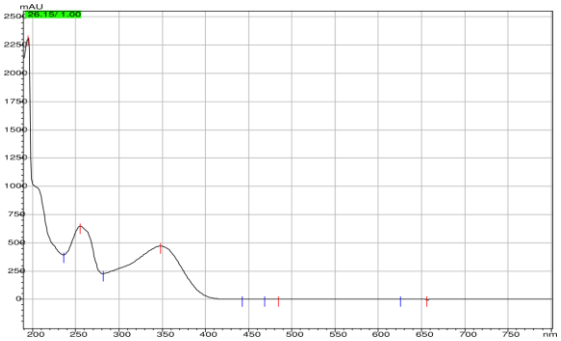
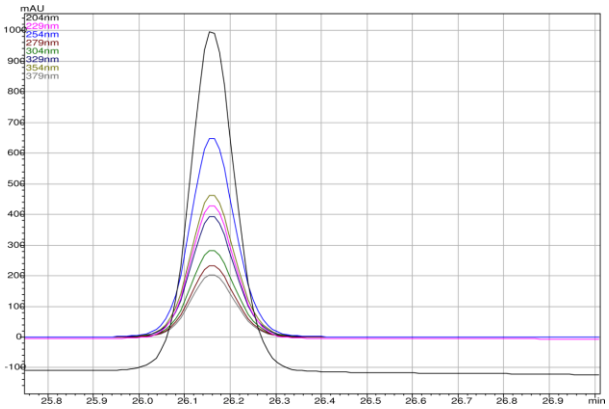
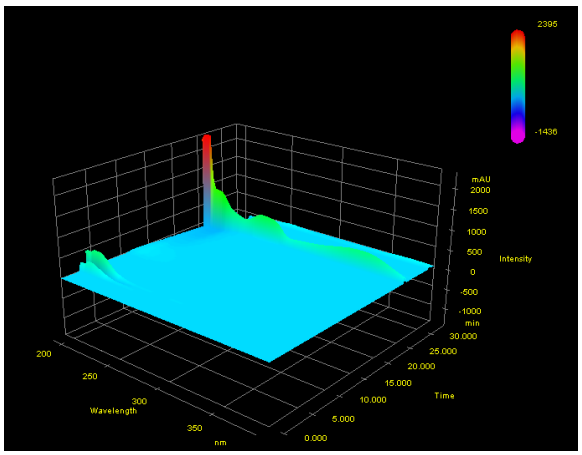


Figura 17 Cromatograma obtido por CLAE para a o padrão do flavonóide quercitrina. Gradiente de acetonitrila de 5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5 (detalhe do cromatograma obtido).





(A) (B)



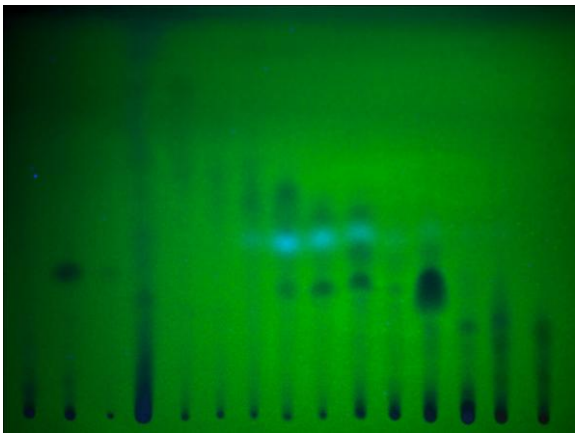
(C)

Figura 18 Espectro obtido por CLAE o padrão de quercitrina. Gradiente de ACN de 5' 10%, 65' 100%, 75' 100%, 80' 100%, 85% 5. (A) Picos de absorbancia, (B) pureza (C) imagem 3D (eixo x = comprimento de onda, y = fluorescência e z = tempo de retenção.

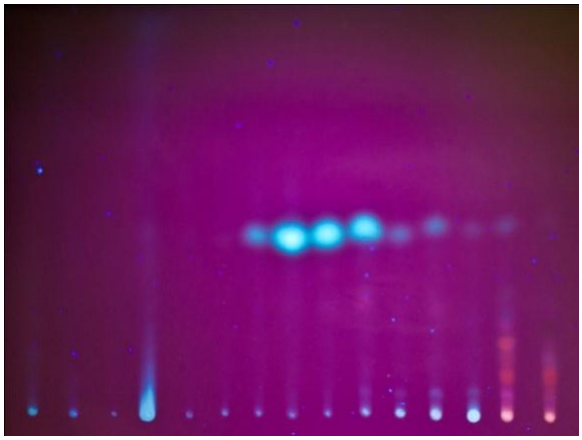
5.3.3.Identificação dos compostos

A fração $CHCl_3$ foi fracionada por cromatografia em coluna com sílica F_{254} devido a sua facilidade em trabalhar na bancada por cromatografia em coluna, comparado à CLAE. Foram coletadas 88 amostras distintas que foram então agrupadas em 28 por similaridade de composição química (avaliada por CCD) e foram numeradas em ordem crescente de polaridade. As 15 primeiras subfrações (já agrupadas) estão apresentadas na Figura 19.

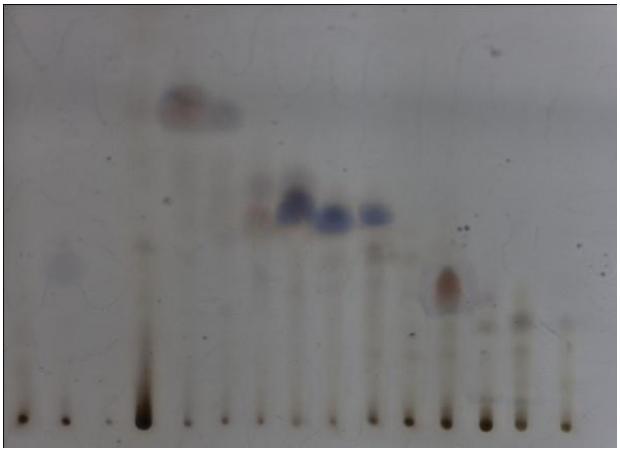
As subfrações 5 e 6 foram plaqueadas juntas numa tentativa de aumentar a quantidade de cada composto. Da subfração 2 foram isolados 3 compostos, no entanto não em quantidade suficiente para a realização de um RMN já das frações 5 + 6 e 7 foram obtidos seis compostos isolados (bandas 7, 8, 9, 10, 13 e 14) (Tabela 2). Destas subfrações foram realizados espectros de H^1 e em seguida C^{13} para as bandas 8,13 e 14 por apresentarem maior massa. A análise destes espectros foi feita pela Profa. Dra. Ingrit Collantes



(A)



(B)



(C)

Figura 19 Cromatogramas obtidos para as 15 primeiras subfrações obtidas a partir do fracionamento da FCHCl3 de S. chilensis. Fase móvel hexano: acetato de etila (9:1). (A) visualização em UV 254nm, (B) visualização em UV 366nm, (C) revelação com ácido sulfúrico a 20% seguido de aquecimento

Tabela 2 Massa das bandas obtidas por fracionamento por cromatografia em coluna da FCHCl3 de S. chilensis.

Subfração	Bandas	Massa (mg)
	1	0,5
	2	7,9
2	3	0,4
	4	0,8
	5	1,6
	6	1,8
	7	10,9
	8	7,9
	9	5,1
5+6	10	4,2
	11	3,2
	12	3,4
	13	10,9
	14	24,4
	15	3,8
7	16	2,9

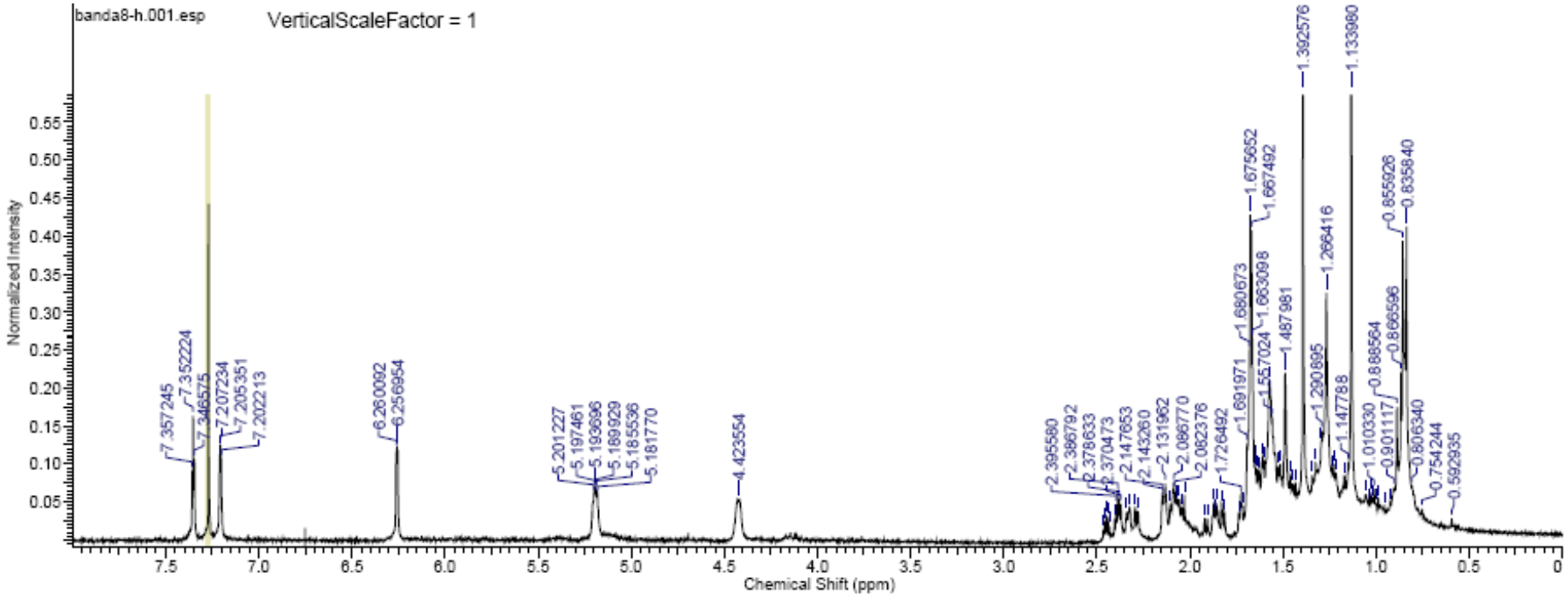


Figura 20 Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz) $CDCl_3$ do composto 1 (presente na banda 8) do extrato $FCHCl_3$ de S.chilensis

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (Figura 20) apresenta sinais características da presença de um anel furánico, como um duplo dubleto (*dd*) em 7.352 *ppm* com constante de acoplamento (*J*) 1.5 Hz, correspondente ao H-16, um *dd* em 7.206 *ppm* com *J* 1.5, 0.94 Hz correspondente ao H-15, um multipleto (*m*) em 6.257 *ppm* correspondente ao H-14, um multipleto em 5.194 *ppm* correspondente ao H-4, também observa-se na região a campo alto, região característica para composto alifático como um singleto largo em 1.672 *ppm* correspondente ao hidrogênios da metila 19, um singleto largo em 0.856 *ppm* correspondente ao hidrogênios da metila 17, um singleto em 1,393 *ppm* correspondente ao hidrogênios da metila 18 e um singleto em 1.10 *ppm* dos hidrogênios da metila 20.

O espectro de RMN-^{13}C apresenta 20 sinais (Figura 21) o que sugere que possa ser um diterpeno como apresentamos na Tabela 3.

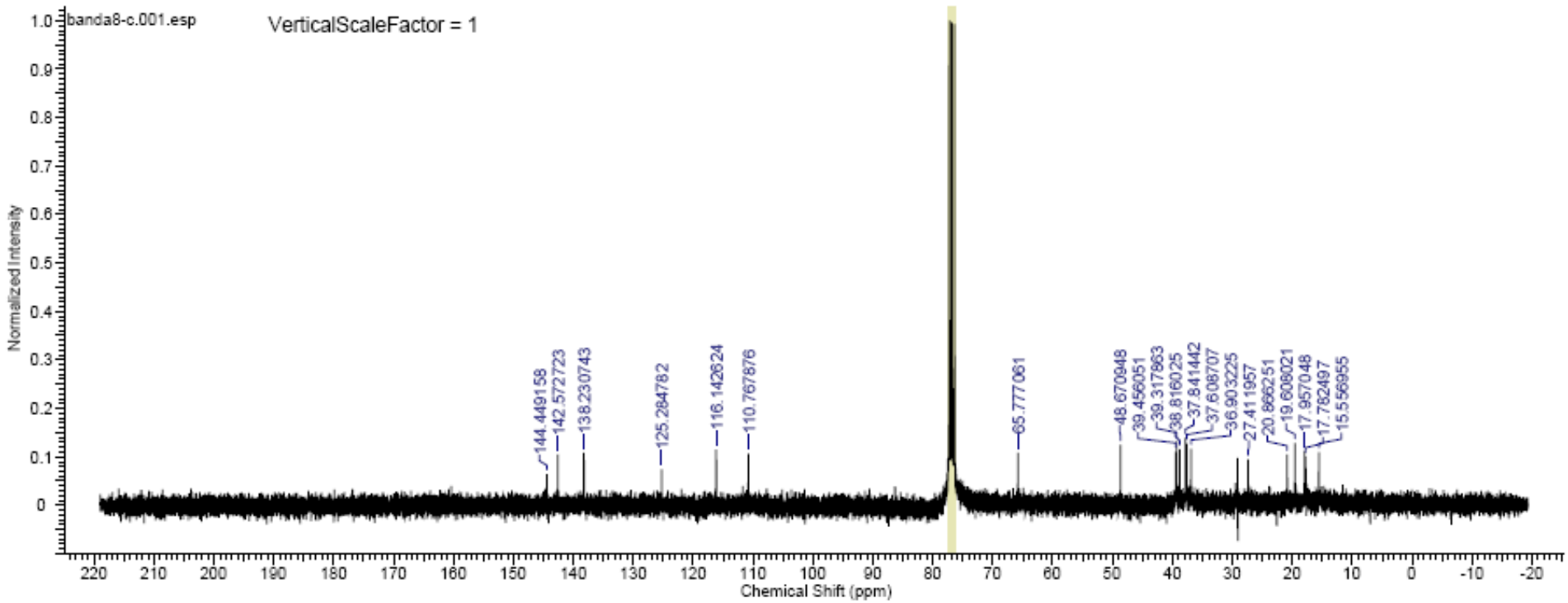


Figura 21 Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (75 MHz) $CDCl_3$ do composto 1 do extrato $FCHCl_3$ de *S.chilensis*

Tabela 3 Deslocamentos químicos de RMN-13C (75 MHz) em CDCl3, do composto presente na banda 8 comparados com da literatura (Torres et al 1989).

N° C	Composto 1	Torres et al 1989
1	65.777	65.5
2	39.456	39.3
3	116.143	116.2
4	144.449	144.2
5	37.841	37.8
6	37.609	37.5
7	27.412	27.3
8	36.903	36.9
9	39.318	39.2
10	48.671	48.6
11	38.816	38.7
12	17.957	17.9
13	125.285	125.2
14	138.231	138.5
15	142.573	142.4
16	110.768	110.7
17	17.957	15.5
18	17.782	17.7
19	19.608	19.5
20	20.866	20.7

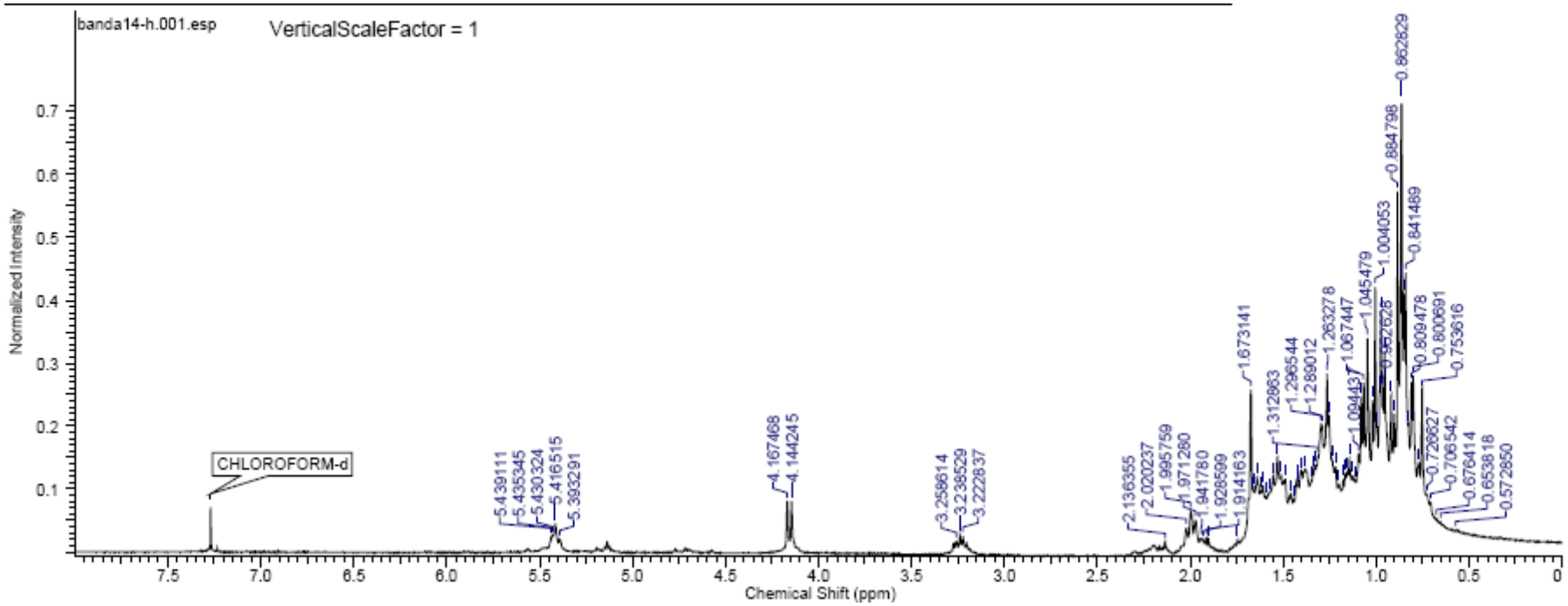


Figura 22 Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz) $CDCl_3$ dos compostos 2 e 3 encontrados na banda n. 14 da subfração 7 do extrato FCHCl3 de *S. chilensis*.

Como o espectro de RMN-^{1}H (Figura 22) é formado por três compostos, apresenta uma grande dificuldade para definir quais os sinais dos hidrogênios de cada molécula. Pode-se afirmar que na região de 5.437 *ppm* estão presentes os sinais dos hidrogênios olefínicos, para α-amirina **H-12** e para bauerenol **H-7**, na região de 3.239 *ppm*. Também é verificada a existência dos sinais dos hidrogênios carbinólicos (**H-3**) para α-amirina e bauerenol. A região de 0-2.5 *ppm* é a região dos hidrogênios alifáticos, e por se tratar de uma mistura de três terpenos, se torna complexo identificar cada hidrogênio de cada molécula.

Os deslocamentos químicos dos compostos 2 e 3 estão apresentados na Figura 23

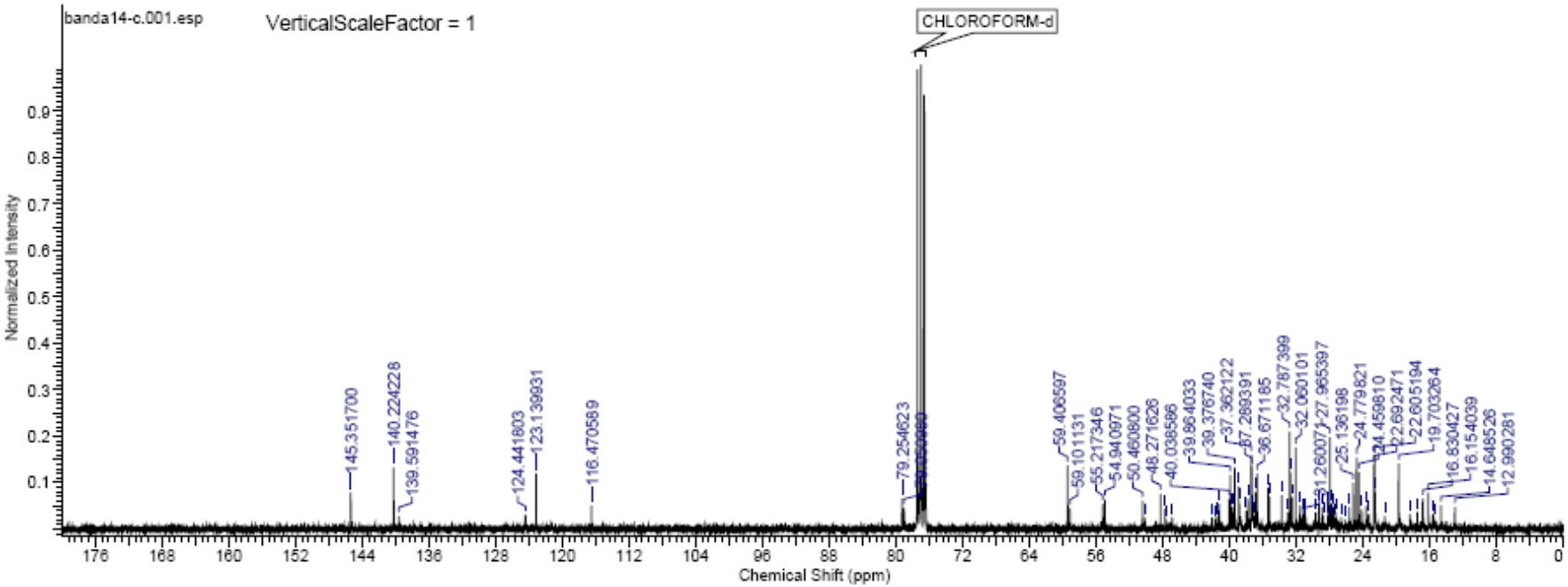


Figura 23 Espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (75 MHz) $CDCl_3$ dos compostos 2 e 3 encontrados na banda n. 14 da subfração 7 do extrato FCHCl3 de *S. chilensis*.

Tabela 4 Deslocamentos químicos de RMN-13C (75 MHz) em $CDCl_3$, do composto 2 e 3 comparados com da literatura.

N° C	Composto 2	α-amirina de Carvalho et. al; 1998	Composto 3	Bauerenol (ilexol) Cerda-García-Rojas et, al; 1996
1	38.86	38.7	36.911	36.92
2	27.289	27.2	27.711	27.74
3	79.051	79.6	79.255	79.21
4	38.78	38.7	38.889	38.88
5	55.217	55.1	50.461	50.48
6	18.365	18.3	24.169	24.19
7	32.962	32.8	116.471	116.49
8	40.039	39.9	145.352	145.31
9	47.661	47.7	48.272	48.29
10	36.912	36.9	35.224	35.23
11	23.645	23.6	16.83	16.86
12	124.442	124.4	32.475	32.49
13	139.592	139.6	37.762	37.76
14	42.104	42.0	41.246	41.26
15	28.744	28.7	28.896	28.91
16	26.634	26.6	37.719	37.71
17	33.755	33.7	32.06	32.06
18	59.101	59.0	54.941	54.97
19	39.617	39.6	35.377	35.39
20	39.675	39.6	32.06	32.06
21	31.26	31.2	29.238	29.26
22	41.246	41.5	31.544	31.56
23	28.118	28.0	27.536	27.56
24	15.616	15.7	14.649	14.66
25	15.492	15.7	12.99	12.99
26	16.830	16.9	23.645	23.65
27	23.369	23.3	22.67	22.67
28	28.219	28.1	37.98	37.99
29	23.267	23.3	25.631	25.65
30	21.369	21.4	22.532	22.55

5.4. Carga microbiana

Os resultados encontrados mostram que a contagem bacteriana está dentro das recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e cinco vezes acima em relação à presença de fungos, porém encontra-se próxima do limite.

Os valores estão apresentados na Tabela 5 juntamente com as recomendações da (OMS).

Tabela 5 Carga microbiana encontrada na droga dizer qual a droga seca e recomendação da Organização Mundial da Saúde.

	Carga microbiana	Max. OMS
Bactérias	9,85 X10^7 UFC/mL	10^7 UFC/mL
Fungos	5,13 X 10^6 UFC/mL	10^5 UFC/mL

5.5. Endotoxinas

A quantidade de endotoxinas foi analisada pelo Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Cosméticos, Domissanitários, Produtos Afins e as Respectivas Matérias-Primas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - CONFAR®, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Terezinha de Jesus Pinto, para o extrato bruto e para as 3 frações (aquosa, AcOEt e $CHCl_3$). Na Tabela 6 estão apresentados os resultados em Unidade Endotóxica (UE) por mL, nanogramas por mL e UE por kilograma.

Tabela 6 Quantidade de endotoxinas encontradas no extrato e nas frações, em EU por mililitro (UE/mL), nanogramas por mililitro (ng/mL) e por kilo

	Quantidade de endotoxinas em EU/mL	Quantidade de endotoxinas em (ng/mL)	Quantidade de endotoxinas em UE por kilo
Extrato bruto	3,16 X 10^5	2,1 X 10^4	9,48 X 10^4
$FCHCl_3$	1,62	1,07 X 10^{-1}	4,86 X 10^{-1}
FAcOEt	2,5	1,6 X 10^{-1}	7,5 X 10^{-1}
Resíduo aquoso	1,99 X 10^1	1,32	5,97

5.6. Ensaios biológicos

Os resultados foram normalizados para que diferentes experimentos pudessem ser comparados, uma vez que diferentes animais de diferentes ninhadas podem apresentar uma resposta absoluta bastante distinta ao mesmo tempo em que suas relações com o controle negativo se mantem similares.

5.6.1. Cultura celular, necrose e apoptose.

Ensaios de cultura realizados com neutrófilos tratados como extrato o LHEE e as frações em diferentes concentrações e/ou com LPS indicam que o extrato induziu a liberação de citocinas, conforme apresentada na Tabela 7 e nas figuras 24, 25, 26 e 27.

Tabela 7 Liberação de algumas citocinas testadas em cultura de neutrófilo com LHEE em relação a um controle recebendo como tratamento solução fisiológica estéril. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos

Concentração (mg/ml)	0,1	0.0100	0.0010	0.0001
Mip	158%	275%	266%	206%
Mip com LPS	152%	187%	196%	181%
TNF - α	141%	153%	161%	158%
TNF - α com LPS	142%	156%	170%	153%
IL-1α	140%	148%	149%	147%
IL-1α com LPS	138%	149%	138%	137%

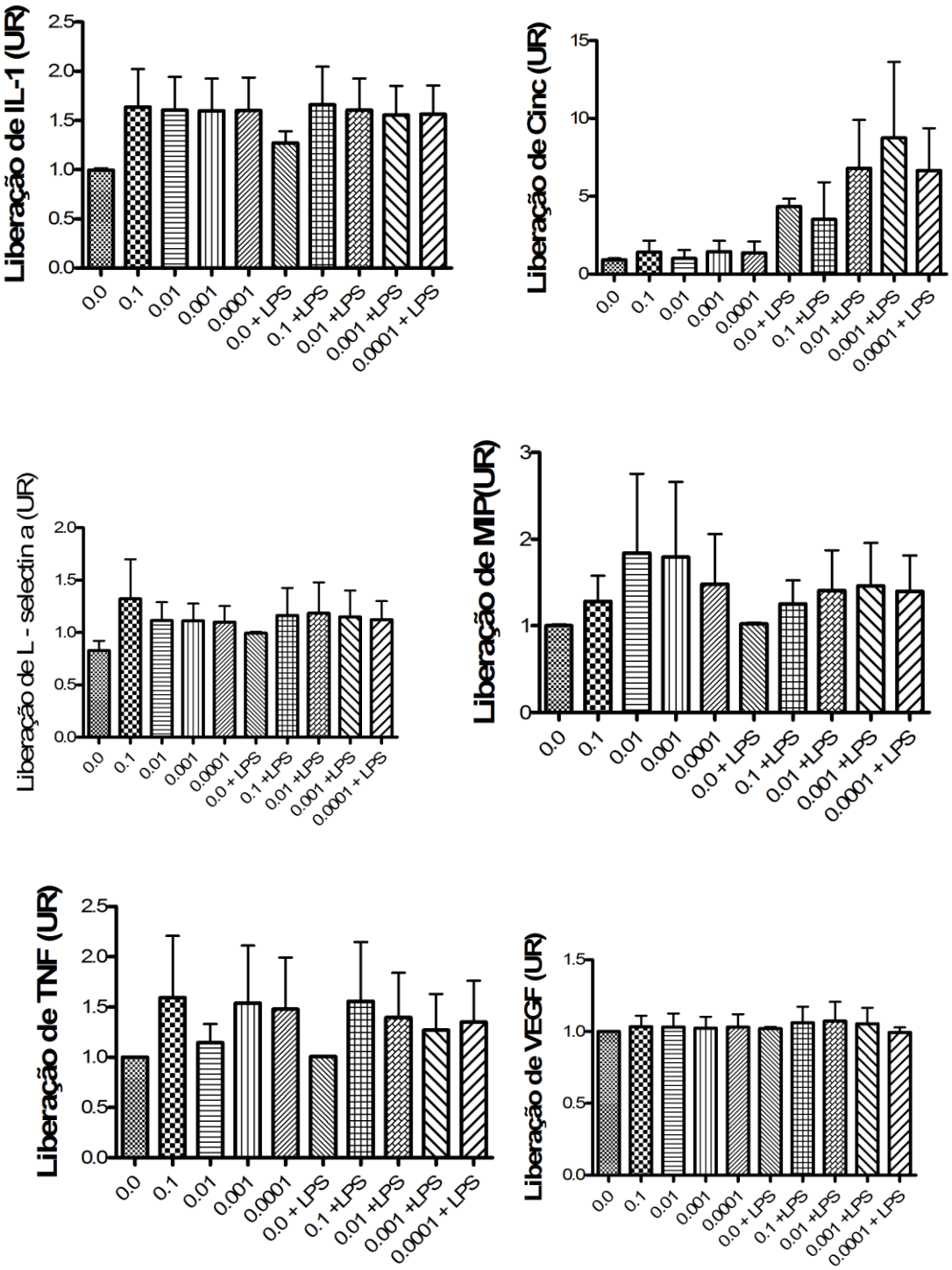


Figura 24 Liberação de citocinas por neutrófilos sob o efeito de LHEEO ensaio de cultura realizada com o FH_2O indica. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos

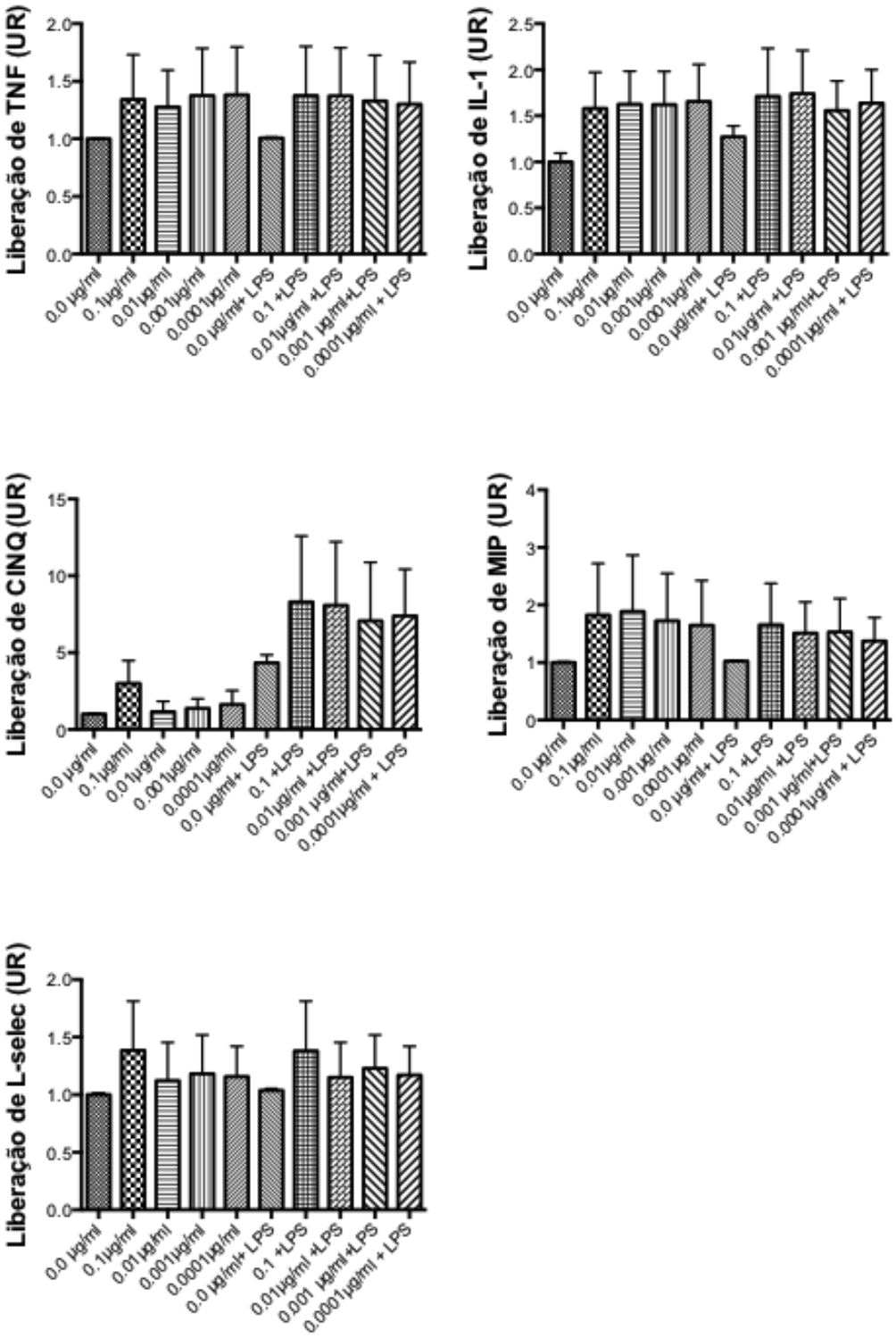
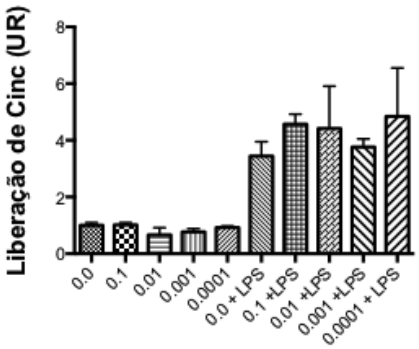
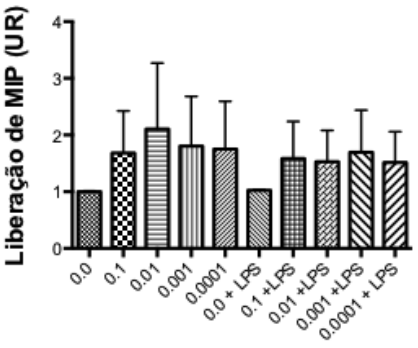
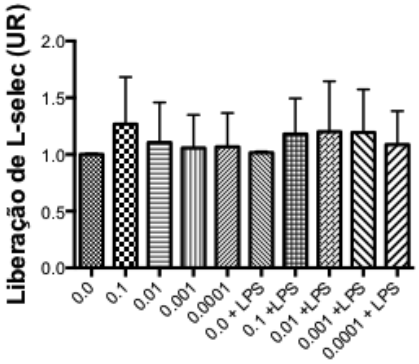
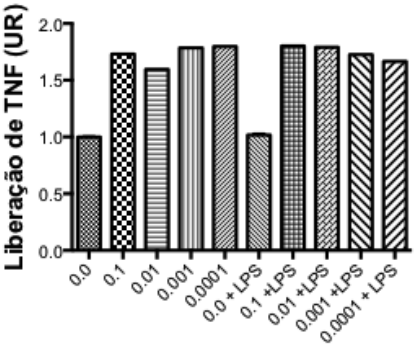


Figura 25 Liberação de citocinas por neutrófilos sob o efeito de FH_2O. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos









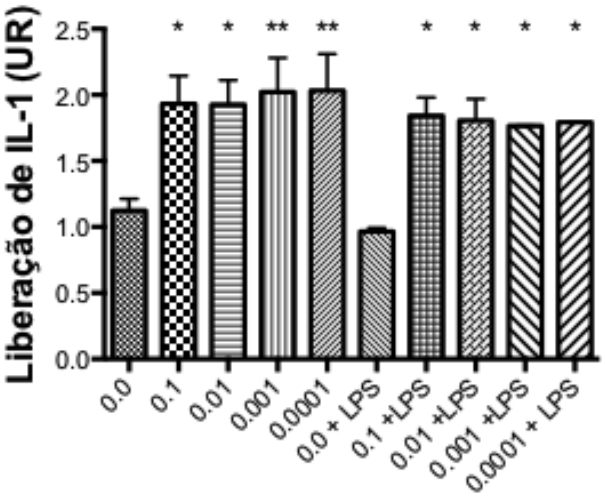


Figura 26 Liberação de citocinas por neutrófilos sob o efeito de FAcOEt. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com $p<0.05$ *, $p<0,01$ **

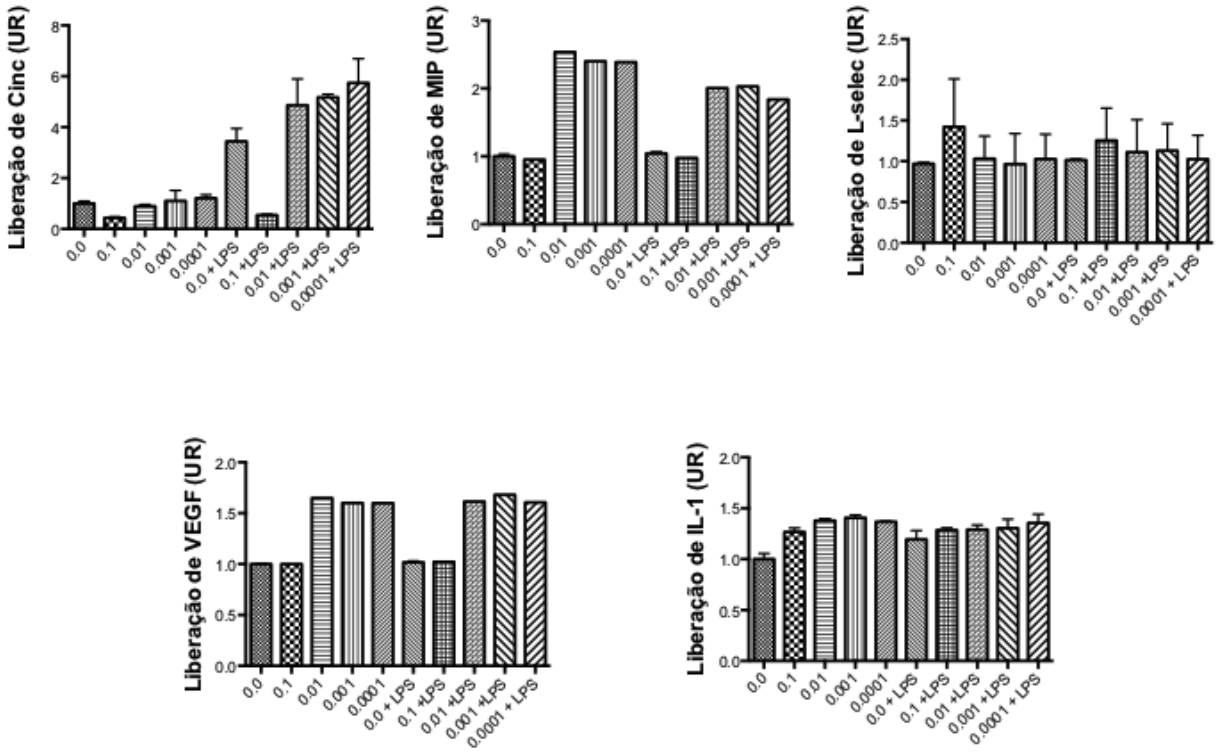
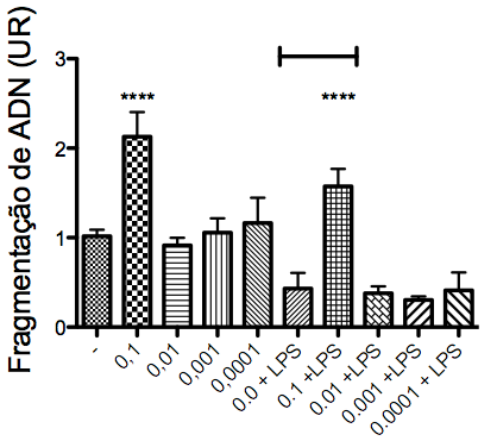


Figura 27 Liberação de citocinas por neutrófilos sob o efeito de $FCHCl_3$. Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos

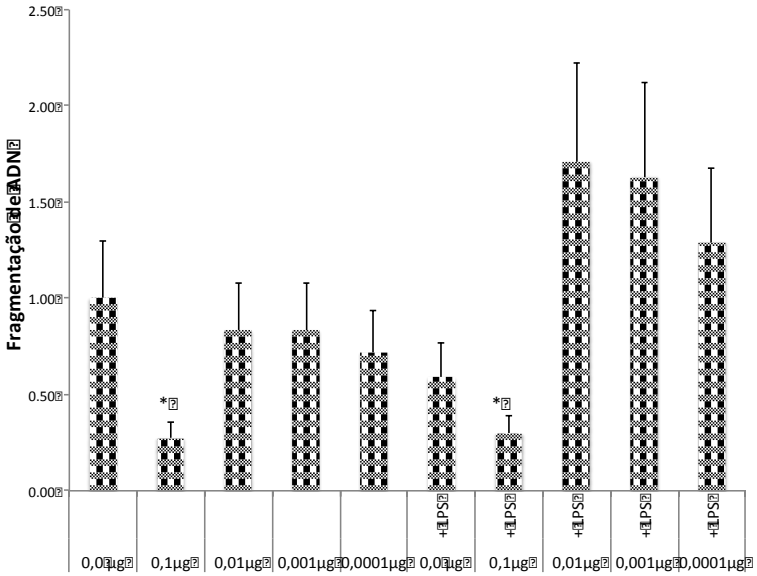
5.6.1.1. Viabilidade celular e fragmentação de ADN

Os resultados indicaram que a concentração de 0,1µg/ml de LHEE e de $FCHCl_3$ causou apoptose Figura 28), uma vez que os baixos valores de fluorescência (PI-H) observados na (Figura 30) em relação à Figura 29, se devem a diminuição de iodeto de propidio ligado a pares de bases de ADN de neutrófilos estimulados pelo extrato LHEE. Na Figura 28 o eixo das abscissas indica a quantidade de fragmentação de ADN. A concentração de 0,1µg/ml de LHEE causou apoptose, por outro lado, as outras concentrações não são estatisticamente diferentes do controle, indicando que não há apoptose. Esse resultado apresentado corresponde ao inverso da fluorescência, de modo que quanto menor o valor de absorbância (indicando uma menor incorporação de iodeto de propidio em pares de bases de ADN integro), maior a fragmentação. Esse resultado foi

normalizado dividindo-se cada um dos valores de fragmentação pelo valor do controle, assim o controle passa a ter o valor de fragmentação 1 e os outros valores passam a ter valores relativos a esse, denominando-se assim unidade relativa (UR).



(A)



(B)

Figura 28 Fragmentação de ADN sob o efeito do extrato LHEE (A) e $CHCl_3$(B) em unidades relativas ((1/absorbância)/controle). Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com $p<0,0001$.

Pelas figuras abaixo se pode perceber a diferença entre uma concentração que causa apoptose na Figura 29 e uma concentração que não causa necrose na Figura 30, sendo estatisticamente diferentes as concentrações 0.0 e 0.1µg/ml com um $p<0,0001$. Na área p15 no gráfico é notável que ocorre uma diminuição da fluorescência em relação à população controle (curva com valores menores de PI-H) quando há apoptose, pois a fragmentação do ADN diminui a quantidade de pares de bases nitrogenadas íntegras para ligar com o fluoróforo, caracterizando um processo de apoptose. Também pode se perceber redução do tamanho celular (em relação à população controle) observada pela diminuição do valor de FSC-A (Forward Scatter, fator de volume celular) e de SSC (Side Scatter, indicador de complexidade celular). As contagens de tamanhos menores indicam a presença de fragmentos celulares, ao invés de celulas íntegras.

*

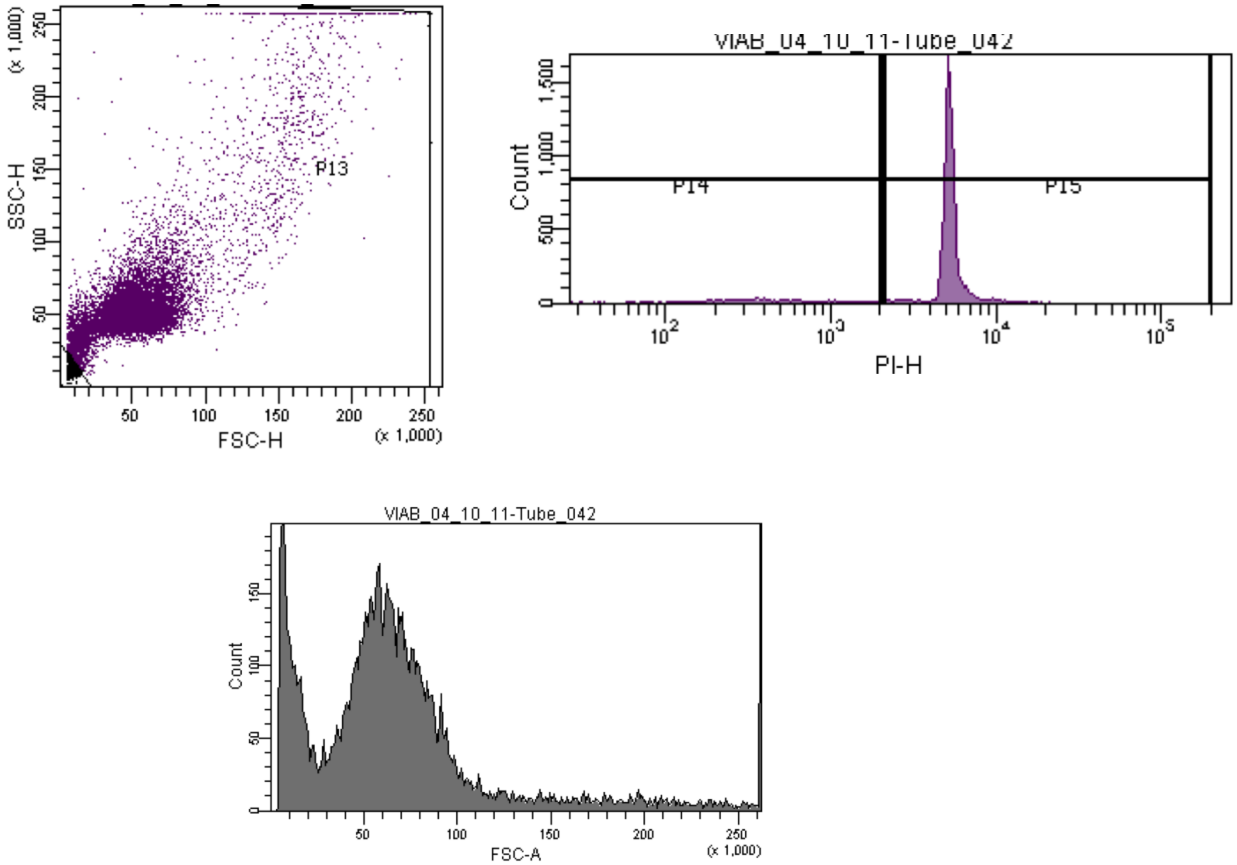


Figura 29 Efeito do tratamento controle sobre a complexidade celular (SSC) volume corpuscular (FSC) e adesão do fluoróforo (iodeto de propídio) à pares de ADN íntegros. Sendo indicativos da quantidade de fragmentação de ADN e morte por apoptose

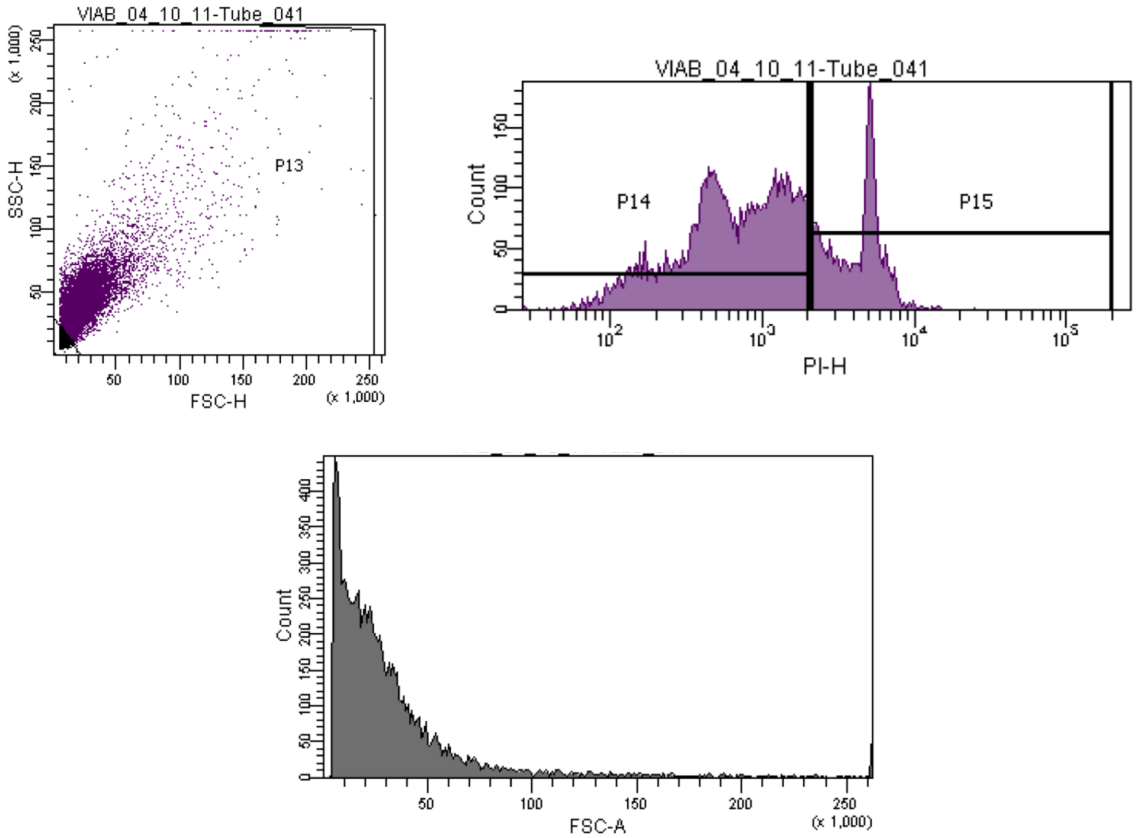
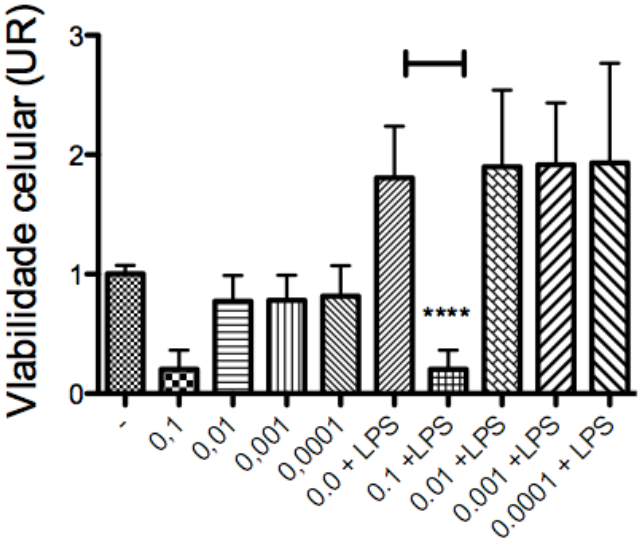
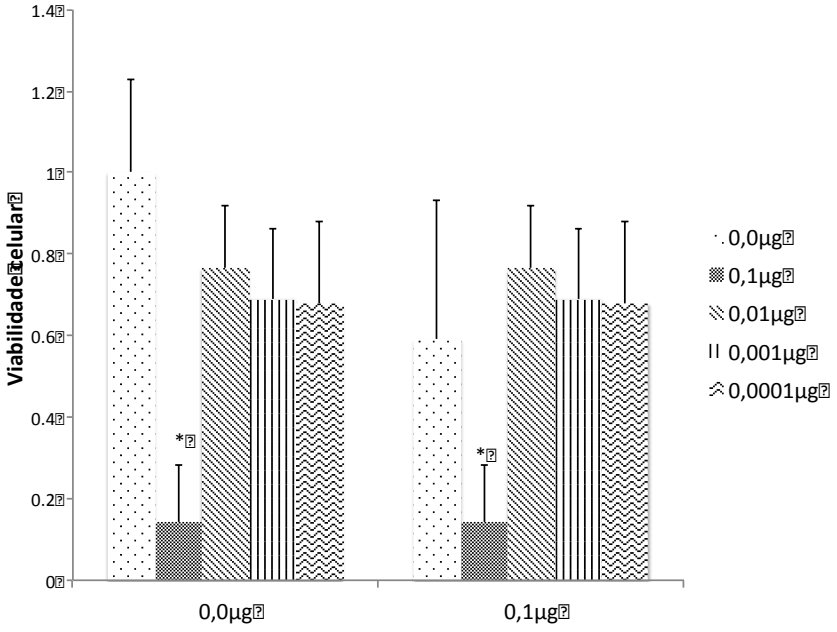


Figura 30 Efeito do LHEE sobre a complexidade celular (SSC) volume corpuscular (FSC) e adesão do fluoróforo (iodeto de propídio) à pares de ADN íntegros. Sendo indicativos da quantidade de fragmentação de ADN e morte por apoptose



(A)



(B)

Figura 31 Necrose celular sob o efeito do extrato LHEE (A) e $CHCl_3$(B) em unidades relativas ((1/absorbância)/controle). Os dados são representativos de 3 experimentos realizados e duplicatas e estão expressos como média ± desvio padrão. Foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos com p<0,0001.

O ensaio de viabilidade celular aponta que a concentração de 0,1µg/ml de LHEE causa necrose (Figura 31) celular. Neste gráfico a unidade do eixo das abscissas é o valor

inverso da absorbância das amostras dividido pelo valor do controle (-),assim o controle passa a ter o valor de fragmentação 1 e os outros valores passam a ter valores relativos a esse denominando assim unidade relativa (UR). Diferentemente do ensaio de viabilidade celular, os altos valores de absorbância observados na Figura 33 em relação à Figura 32 pelo valor de PI-H (área p2) se devem ao iodeto de propídio entrar na célula, o que só pode ocorrer com a ruptura da membrana indicando necrose. Também pode-se observar a redução do tamanho celular (em relação à população controle) indicada pelo fator FSC-A e da complexidade celular pela redução de SSC.

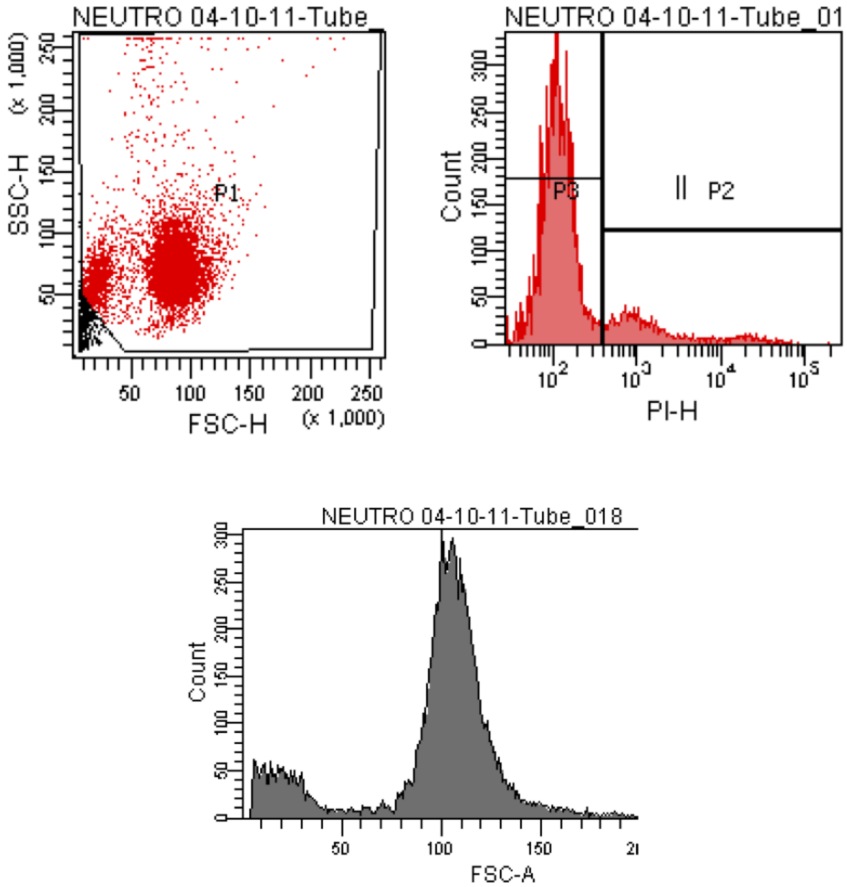


Figura 32 Figura ilustrativa do efeito do tratamento controle sobre a complexidade celular (SSC) volume corpuscular (FSC) e entrada do fluoróforo (iodeto de propidio) na célula. Sendo indicativos da quantidade de degradação da parede celular e morte por necrose

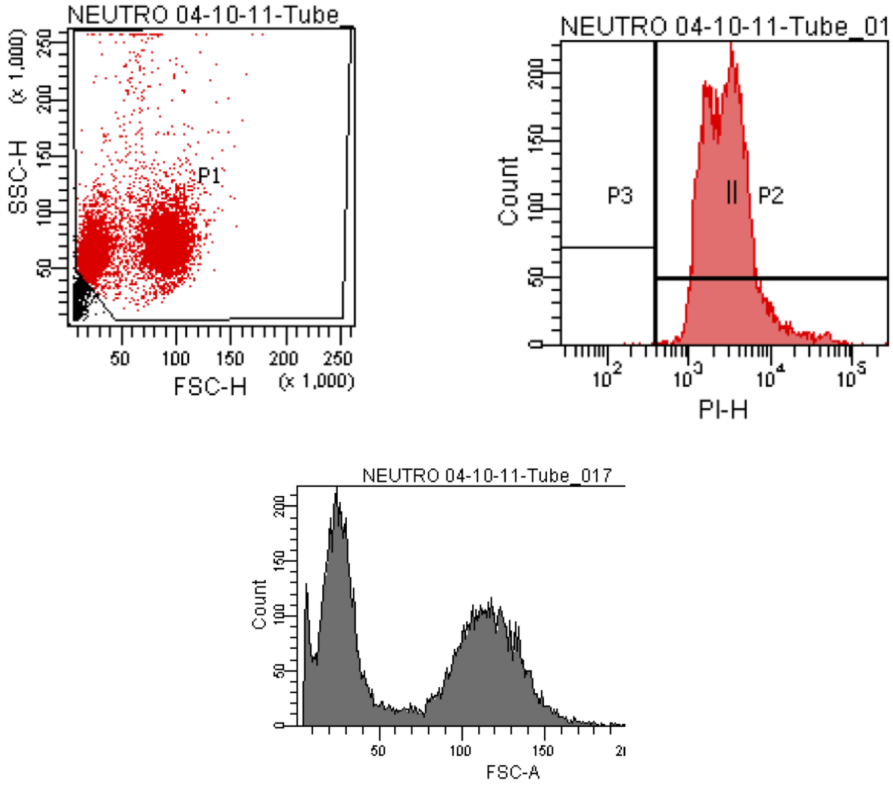


Figura 33 Figura ilustrativa do efeito doLHEE sobre a complexidade celular (SSC) volume corpuscular (FSC) e entrada do fluoróforo (iodeto de propidio) na célula. Sendo indicativos da quantidade de degradação da parede celular e morte por necrose

5.6.2. Ensaio de ferida aberta

O ensaio de ferida foi desenvolvido para simular uma circunstância de cicatrização próxima da real, possibilitando maior interação com o meio externo (mesmo que este seja bastante controlado).

A Figura 34 apresenta a relação entre a porcentagem da área da ferida em relação à inicial ao longo do experimento e fotografias dos resultado obtido no ensaio de cicatrização com o modelo de ferida aberta. É possível observar que o medicamento Dersani, em todas as fases, causou um retardamento do fechamento da ferida, visto que a redução do tamanho é menor em todos os casos, apesar de estudos realizados obterem resultados diferentes (MAGALHÃES, 2007). Ainda assim não retardou o tempo final, uma vez que todas as feridas fecharam dentro de 15 dias. É possível observar ainda que entre o inicio (dia 0) e o 4º o grupo tratado com o extrato LHEE em gel de carbopol obteve um aceleramento da cicatrização justamente a passagem da fase inflamatória para a de granulação, com uma redução do tamanho da ferida de aproximadamente 47% no 4º e 51% no 8º quando comparado ao grupo controle de cada dia.

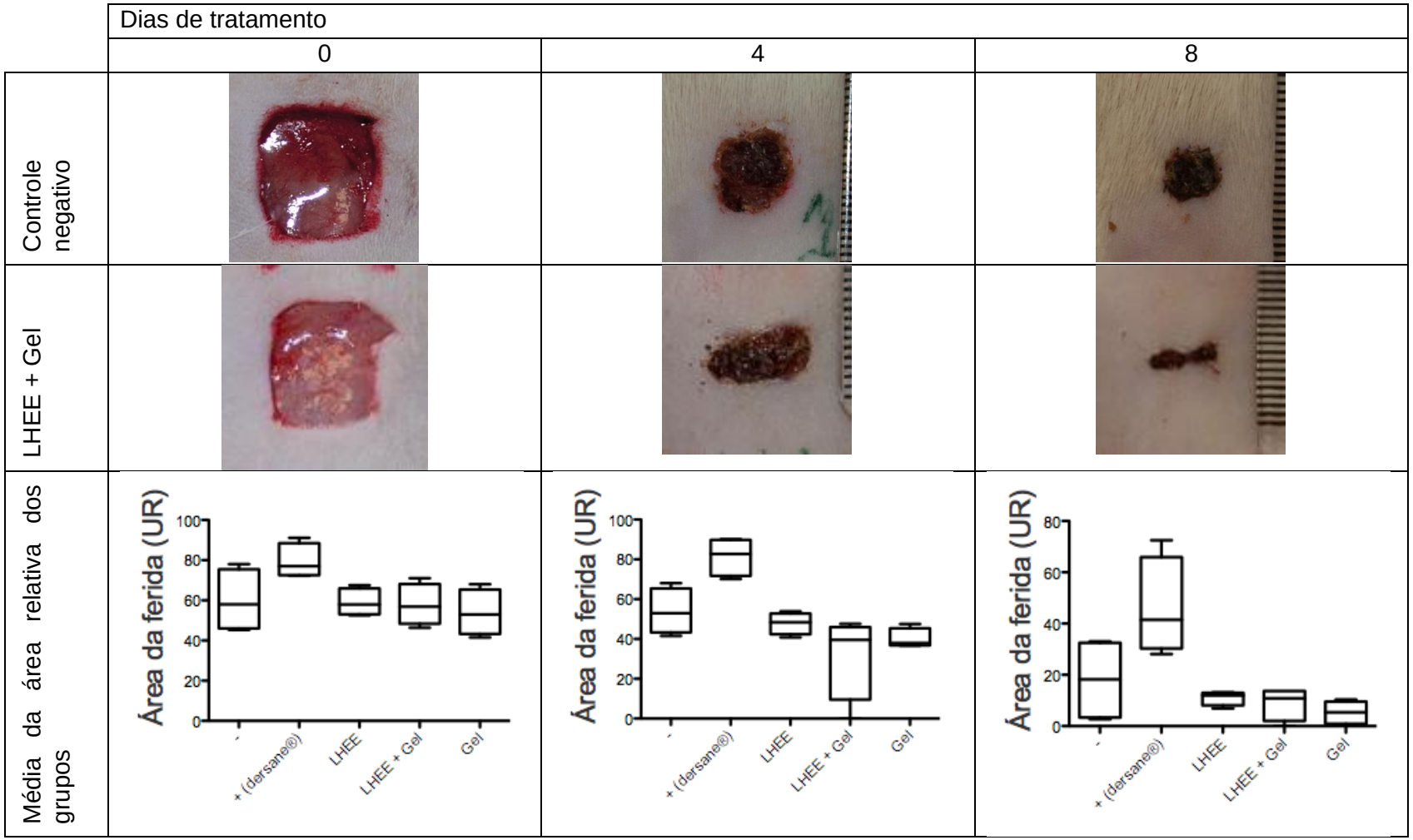


Figura 34 Fotos das feridas dos grupos controle negativo e extrato suspendido no gel de carbopol nos dias 0 4 e 8, correspondendo ao inicio da ferida, fase de granulação e remodelamento, respectivamente. E média da área relativa dos grupos

*

5.6.3. Ensaio de migração de neutrófilos em bolsa de ar estéril

5.6.3.1. Células

Este experimento, realizado com o LHEE, demonstrou uma maior migração de células na bolsa no grupo tratado com LHEE em relação ao grupo controle (solução fisiológica), conforme apresentado na Figura 35. Ainda na mesma figura pode-se perceber um antagonismo entre o extrato e o estímulo positivo LPS, uma vez que a resposta segue um padrão de agonista parcial. A diferença da migração celular entre o extrato (LHEE) e o controle negativo foi considerada significativa, pois o valor de p foi menor que 0,05.

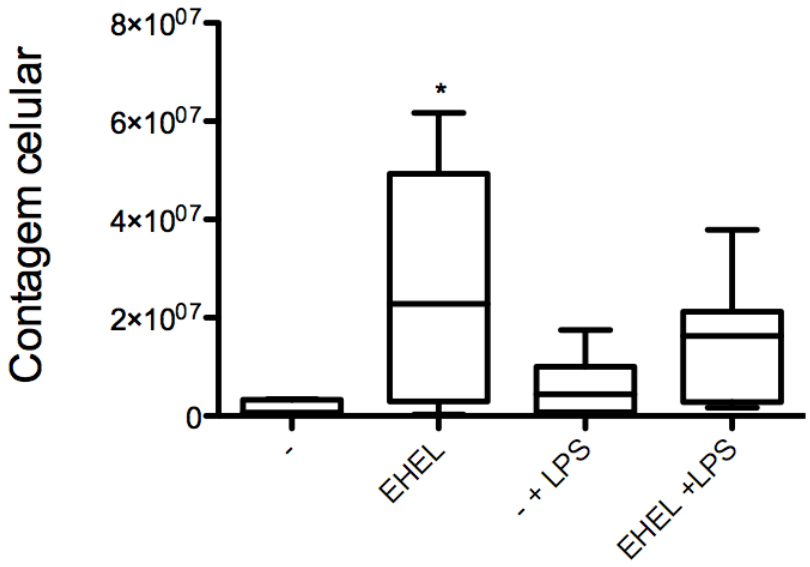


Figura 35 Boxplot relacionando a quantidade de leucócitos encontrados no exsudato inflamatório em relação ao tipo de tratamento utilizado. Os dados são provenientes de 1 experimento com n= 8. p<0,005 * em relação ao controle (-).

Esse resultado demonstra um potencial efeito modulador da resposta inflamatória, uma vez que tem a capacidade de aumentar a inflamação quando esta não ocorre, e também tem a capacidade de diminuí-la perante a presença de outro estimulo inflamatório, diminuindo a lesão em tecidos adjacentes por estresse oxidativo.

5.6.3.2. Citocinas

O sobrenadante da lavagem intraperitoneal dos animais tratados com LHEE teve as citocinas CINC, MIP, IL-6, IL-1, TNF e L-selectina quantificadas por ELISA conforme descrito na metodologia, e os resultados estão apresentados na Figura 36 abaixo.

Foi observado um aumento significativo da liberação de IL-1, IL-6 e L-selectina quando da administração de LHEE, uma redução da liberação de TNF e ainda pode-se perceber que a administração do extrato juntamente com um estímulo inflamatório exerce uma redução da resposta inflamatória em comparação à administração do estimulo inflamatório (LPS) isoladamente, ou da resposta inflamatória causada somente pelo extrato. Isso pode ser observado em todas as citocinas e significativamente diferente em TNF.

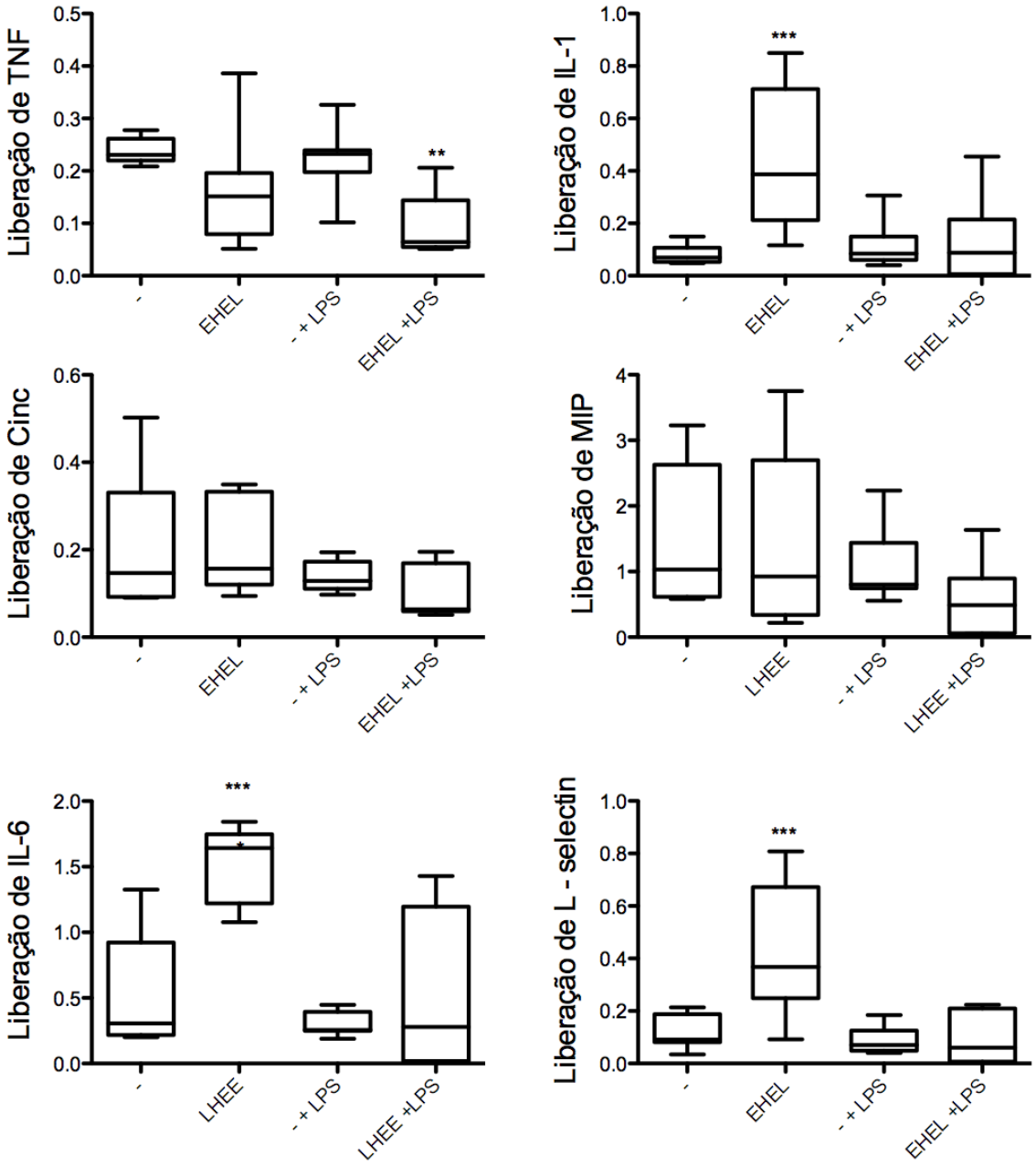


Figura 36 Comparação entre a liberação das citocinas mediante á aplicação de um dos 4 tratamentos (PBS, extrato EtOH 70%, LPS, LPS + extrato EtOH 70%).Observa-se diferença significativa quando p<0,05 *, p<0,01 ** e p<0,001 *** em relação ao controle (-).

6. Discussão

A elaboração do extrato bruto foi realizada com um solvente hidroalcoólico 70% tendo em mente alguns fatores; primeiramente, a grande quantidade de compostos extraídos por esse solvente; em segundo lugar, por ser este o solvente utilizado popularmente para a confecção de tinturas (CECHINEL FILHO, 1998), e, portanto ideal em um estudo etnofarmacológico; por último, este é também um método de assepsia que controla a contaminação microbiana.

A triagem fitoquímica realizada por reagentes colorimétricos corrobora com o descrito na literatura, (TORRES, 1987; CHICOUREI, 1997) indicando a presença de compostos fenólicos nas frações aquosa e AcOEt, e flavonóides na AcOEt como pode ser percebido nas analises colorimétricas e também nos cromatogramas obtidos, e, uma vez que a coleta foi realizada diretamente da coleção do CPQBA – UNICAMP, pode-se afirmar que se trata da espécie vegetal descrita por Meyen.

O resultado das analises de CCD também vai de encontro com as técnicas colorimétricas e pode-se ainda afirmar que foi eficiente para separar componentes em 3 faixas de polaridade diferentes. Isso também pode ser observado nos cromatogramas realizados por CLAE, pois os tempos de retenção da fração aquosa foram menores que os obtidos na fração AcOEt. Nesta última destaca-se um pico com uma absorbância muito maior que dos outros componentes. Esse fenômeno também foi detectado em CCD, de modo que acredita-se que tanto esse pico como a grande banda amarela na CCD sejam relativos ao mesmo composto. Esta espécie vegetal possui em sua descrição química o flavonóide quercitrina (TORRES, 1985), sendo esse, portanto, utilizado como padrão. Ao comparar os cromatogramas obtidos é possível supor que essa banda em destaque seja a referida flavanona, especialmente quando se observa o espectro de ultra violeta. Em Lhuillier (2007), tem-se um espectro desse composto que é compatível com o obtido

experimentalmente neste trabalho. Com base na literatura e nos resultados obtidos é de se esperar que esse pico seja relativo à quercitrina (quercetina-3-o-rhamnosideo).

Os cromatogramas obtidos para a fração aquosa apresentaram uma grande quantidade de picos saindo próximo dos 5', o que indica compostos de alta polaridade. Esta fração, apesar de apresentar picos com uma absorbância menor em comparação à FAcOEt, possui polaridades ligeiramente díspares, tal que sua separação foi rapidamente realizada. Possivelmente a quercitrina também esta presente nesta fração uma vez que a banda da CCD especulada como sendo relativa a esse composto também aparece, contudo em menor quantidade, na fração aqui discutida.

A cromatografia da fração $CHCl_3$ foi realizada por CC e em CCD preparativa devido a sua facilidade de separação de compostos. Do composto presente da banda 8 foram feitos os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-^{1}H) e de carbono 13 (RMN-^{13}C). Verificou-se que este último apresenta 20 carbonos, concordantes com os deslocamentos químicos propostos por Torres, (1989). Pela revisão bibliográfica da espécie em estudo sabe-se que *S. chilensis* apresenta diterpenos, o que permitiu a identificação como diterpeno clerodanico 1-naftalenol, 8-[2-(3-furanyl)etil)-1,2,4a,5,6,7,8,8a-octahidro-4,4a,7,8-tetrametil, (Figura 37) também denominado (1S)-15,16-epoxi-1-hidroxi-3,13(16),14-clerodatrieno, por comparação de seus espectros com a literatura correspondente (TORRES,1989).

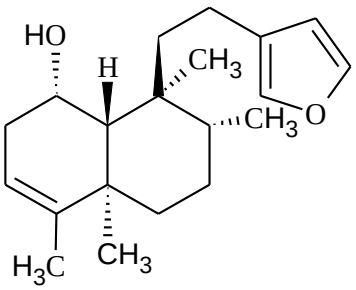


Figura 37 Estrutura química proposta para a substancia encontrada na banda n. 8 (composto 1) da subfração 5+6 do extrato $FCHCl_3$ de *S. chilensis.*

A proposta para a banda 13 é a seguinte molécula, ainda sem referencia bibliográfica que sustente a proposta.

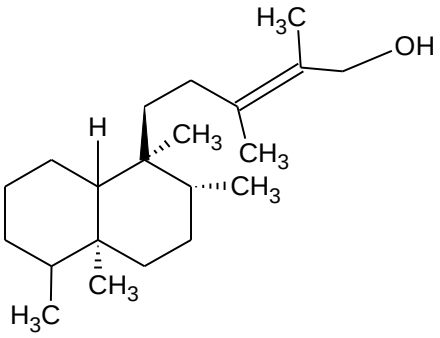


Figura 38 Estrutura química proposta para a substancia encontrada na banda n. 13 (composto 2) da subfração 7 do extrato FCHCl3 de S. chilensis.

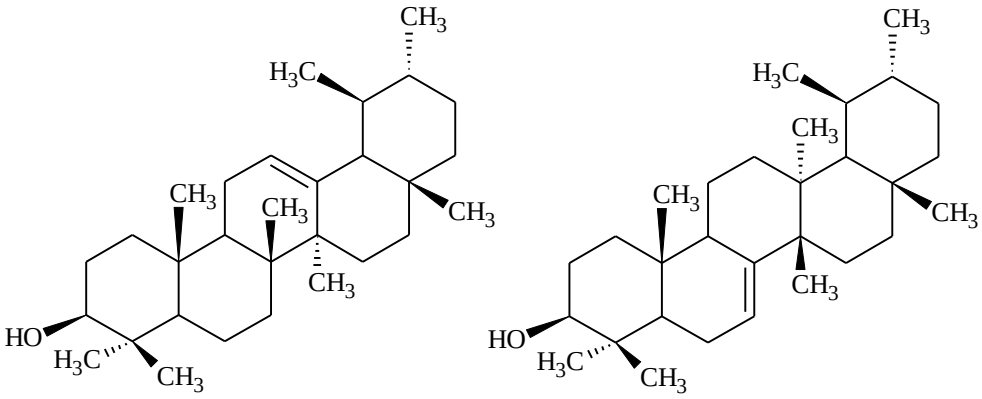


Figura 39 Estrutura química de α-amirina e bauerenol respectivamente encontradas na banda n. 14 (composto 2 e 3) da subfração 7 do extrato FCHCl3 de S. chilensis.

Analisando o espectro de RMN-^{13}C, observamos que o composto da banda 13 é o majoritário, e que os outros dos compostos (triterpenos) foram identificados pela

comparação do espectro com a literatura para α-amirina (DE CARVALHO, 1998) e bauerenol (CERDA-GARCÍA-ROJAS, 1996).

Já a proposta para os espectros de RMN-^{1}H e RMN-^{13}C da banda 14 é a mistura de dois triterpenos (α-amirina e bauerenol) com o composto da banda 13 que esta ainda por definir. Da mistura de triterpenos o primeiro possui esqueleto tipo ursano e o segundo do tipo bauerano.

Os ensaios biológicos foram iniciados com a contagem microbiológica da droga pré-moída que se apresentou dentro dos limites estabelecidos pela OMS para produtos de uso tópico e aqueles que ainda passarão por um processo de descontaminação que é 10^{7} UFC/mL. A maceração com etanol 70% exerce uma dupla função, tanto serve como solvente para a extração de compostos fenólicos, entre vários outros, quanto diminui drasticamente a carga microbiana, agindo como um antisséptico.

A carga microbiana, apesar de ser um grande indício da contaminação capaz de ativar o sistema imune, não basta *per se* para verificar a contaminação, posto que só verifica os microrganismos viáveis presentes. As proteínas presentes na parede de bacterias gram negativas também são capazes de promover a ativação leucocitária e desencadear uma resposta imune, seja ela inata ou adaptativa. Assim é imprescindível a verificação da quantidade destas endotoxinas, justamente por esses compostos serem pirogênicos.

Devido à grande dificuldade de despirogenação do produto final, pensou-se que segundo as boas práticas de fabricação é mais prudente um controle microbiano em todas as etapas, principalmente se tratando de um produto de natureza vegetal no qual pode haver a degradação de algum composto ativo pelo processo de descontaminação.

Assim procedeu-se à analise da carga de endotoxinas. Esta se apresentou elevada no extrato bruto quando comparada com o limite estipulado pelo órgão de vigilância sanitária estadunidense (FDA) para veiculações endovenosas. Essa instituição determina que a dose máxima que um ser humano pode receber sem haver resposta imune é 5 UE por kilograma,

por mililitro por hora. As frações AcOEt e $CHCl_3$ estão bem próximas desse limite não permitido para uso em humanos, porém nos ensaios biológicos utilizados não são utilizados administrações endovenosas, de modo que essa norma á utilizada como referência para os ensaios de cultura celular.

É sabido que endotoxinas podem desencadear uma reação inflamatória no organismo, porém se esse estímulo for muito grande a resposta inflamatória diminui por uma ação reguladora endógena contra os efeitos nocivos da inflamação. Assim é importante a análise de contaminantes para que se possa detectar sua influencia na resposta obtida. De uma forma geral, acreditamos que a manipulação de extratos vegetais de uso popular e preparo caseiro, seja realizada sem ensaios de controle de endotoxinas e que a maioria dos efeitos desses extratos observados até o momento podem ser uma somatória do efeito do extrato mais contaminantes.

Para a determinação da concentração de trabalho tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro* foram realizados ensaios de toxicidade visando à obtenção das concentrações capazes de induzir apoptose e ou necrose em neutrófilos

Quando uma célula ou tecido são sobrecarregados por estímulos diversos os mesmos podem ser danificados, fato que pode resultar na morte celular. Essa pode ocorrer de forma agressiva como por rompimento de membrana (morte por necrose celular) ou ainda de forma controlada e sem grandes danos para os tecidos vizinhos, como a morte celular programada (por apoptose) (BONINI, 2000). A apoptose é a morte celular programada que leva a uma degradação “limpa” da célula e sua eliminação. Quando a apoptose é desencadeada ocorre uma série de reações em cadeia que não danificam o tecido, nesses casos apenas a célula que sofreu apoptose é eliminada do tecido. A apoptose é identificada morfologicamente através de alteração da membrana celular (estrangulamento de vesículas, chamados de “corpos apoptóticos”), diminuição do núcleo celular, condensação da cromatina e fragmentação do ADN. A necrose por outro lado é uma

reação mais violenta em que a própria membrana celular é rompida antes que haja sinalização intracelular para isso. A necrose celular é caracterizada por uma lesão mais intensa com dano em tecidos adjacentes e liberação de conteúdo intracelular para a matriz extracelular (COTRAN, 1996).

Foi demonstrado que tanto no LHEE quanto na fração clorofórmica ($FCHCl_3$) concentrações acima de 0,1 µg/ml de extrato são toxicas para as células. Nesses casos, observa-se a ocorrência tanto de necrose, percebida pela ruptura da membrana celular e entrada do fluoróforo na célula, quanto por apoptose, percebida pela fragmentação do ADN e diminuição de sua ligação com o iodeto de propidio. Como esse fenômeno só foi observado em LHEE e $FCHCL_3$ pode se supor que a atividade citotóxica é resultado de componentes presentes nessa fração mais apolar que obviamente estariam presentes em menor concentração no estrato bruto (LHEE). Diterpenos podem ter atividade tóxica como aponta Sobral (2009) e estão presentes em maior concentração na fração $CHCl_3$. Esses compostos foram encontrados em alguns extratos vegetais mas não contam com estudos biológicos aprofundados. Dos componentes identificados, na $FCHCl_3$ foi encontrada a α-amirina, que também está presente em outros extratos vegetais associados com atividade toxica (SOBRAL, 2009), podendo assim contribuir com os resultados citotóxicos encontrados tanto no LHEE quanto na fração clorofórmica ($FCHCl_3$), principalmente sabendo que justamente nessa fração é encontrada a menor quantidade de endotoxinas. Outro componente presente em extratos com auferida atividade toxica é o diterpeno soligagenona, também presente nas frações mais apolares (BENEVIDES, 2004) de extratos desta planta (TORRES, 1985).

Os ensaios de cultura celular realizados apontam para uma ação pró-inflamatória principalmente para as citocinas IL-1, TNF, e MIP, no entanto, essa ação não é observada quando o tratamento é feito em conjunção com um agente pró-inflamatório. Como já dito anteriormente, essa atividade é muito importante no inicio do processo de cicatrização. No

entanto, maiores estudos devem ser realizados neste sentido para que se possa chegar a uma relação dose-resposta mais precisa, uma vez que o processo de purificação de neutrófilo de rato é iniciado usado o glicogênio de ostra com estímulo quimiotático, o que pode levar a uma ativação parcial destas células.

Com base nos dados obtidos, observam-se indícios de que o LHEE acelera o estabelecimento da fase de formação de tecido de granulação apontando uma ação anti-inflamatória, uma vez que no inicio desta o grupo tratado com o extrato em gel de carbopol apresentou a maior redução da aérea da ferida quando comparado a todos os outros grupos (solução fisiológica, LHEE puro, o tratamento utilizado como referencia Dersani®, e o gel puro). O gel formulado foi escolhido por possuir um carbômero de fácil dispersão, assim sendo mais rápido e fácil de preparar, evitando o surgimento de grumos (CONTRERAS, 2002). Ele foi usado para aumentar o tempo de interação entre o tratamento LHEE e o ferimento, e por aumentar a umidade na região, condição indispensável para uma cicatrização eficiente.

No decorrer do experimento a formação de uma camada de coagulo formada justamente para fechar a ferida, separando-a do meio externo, dificulta a interação entre os tratamentos e a ferida, então pode se supor que a influencia deles seja maior nos dias iniciais do experimento.

O controle positivo usado foi o Dersani, que é uma mistura de ácidos graxos (caprílico, cáprico, capróico. láurico e linoleico principalmente) com vitamina A, E e lecitina. Apesar de seu registro na ANVISA como risco grau 2 (produtos cosméticos) é amplamente utilizado como medicamento voltado para o tratamento de escaras e lesões da pele, como mostra Magalhães (2007). No referido trabalho aponta um aumento de fibras colágenas e da densidade vascular quando tratado com a mistura de óleos presentes no Dersani®, enquanto que Pereira (2007) mostra a ação benéfica na cicatrização de alguns compostos isolados desse óleo por causar um aumento da migração celular e degranulação de citocinas

inflamatórias, o que facilitaria o inicio do processo de cicatrização, fatores esses que levaram a escolhê-lo como medicamento referência no fechamento da ferida. O efeito pró-inflamatório do Dersani® é notado nos experimentos aqui realizados, pois a área da ferida aumenta nos dias iniciais da cicatrização. Contudo, a utilização desse produto nas fases subsequentes dificulta o reestabelecimento da homeostase, pois, faz perdurar o processo inflamatório. Isso é notado quando há um retardamento do fechamento da feria ao longo do experimento em relação ao controle.

O resultado obtido, se analisado com o da cultura celular na qual foi verificada a atividade inflamatória (por liberação de citocinas inflamatórias), juntamente com a anti-inflamatória observada na ferida aberta, assinala para uma ação modulatória da inflamação, tornando mais aguda a curva inflamatória (ascensão e descensão mais rápidas dos fenômenos inflamatórios), diminuindo a duração dessa fase e acelerando a passagem para a fase de granulação.

O ensaio de bolsa de ar realizado ajuda a entender melhor o mecanismo de ação por minimizar os interferentes externos e por fornecer dados celulares e humorais. O ensaio com LHEE traz resultados que corroboram com a hipótese anterior, uma vez que mostra significativo aumento de recrutamento celular e ao mesmo tempo um efeito agonista parcial quando administrado juntamente com um estímulo sabidamente inflamatório (fMLP). Os agonistas parciais atuam como antagonistas por competição quando são administrados juntamente com os agonistas totais, diminuindo a resposta inflamatória, por exemplo. As citocinas dosadas mostram um aumento significativo de L-selecina, uma molécula de adesão celular indicando um aumento da migração leucocitária, IL-1 sendo liberada por neutrófilos, que são o principal tipo celular da fase inflamatória, e IL-6, uma citocina liberada por macrófagos, que age com o mediador inflamatório (tanto pró quanto anti-inflamatório) e com fator quimiotático para neutrófilos (HATANAKA, 2007).

De acordo com os nossos resultados acreditamos que o extrato LHEE tenha quantidade suficiente de endotoxinas para ativar o sistema imune quando este se encontra na condição basal. Porém em condições onde a ativação seja realizada por outro estimulo como LPS ou até mesmo o próprio ferimento (pico da fase inflamatória do processo de cicatrização) há o predomínio dos efeitos anti-inflamatórios dos compostos químicos presentes no extrato como a quercitrina.

Dessa forma extratos da espécie vegetal poderiam ser bons agentes cicatrizantes, uma vez que poderiam iniciar a fase inflamatória e “desativa-la”, tornando-a curta e autolimitada como deve ser.

Essa ação mediadora é bastante encontrada em diversos extratos vegetais (FANG, 2008), no entanto nenhum trabalho discute a influencia nos resultados do contaminante (LPS) inerente ao cultivo vegetal. Esses compostos podem ser os responsáveis pela predominância inicial da ação inflamatória (e indispensável para o processo de reparo tecidual) que, ao ultrapassar um limiar, desencadearia a resposta anti-inflamatória possivelmente atribuída aos compostos fenólicos. Estando presentes em todos os cultivos, é bastante improvável que não estejam em todos os extratos, principalmente os realizados popularmente e sem medidas assépticas, e ainda podem ser componentes indispensáveis para a ação cicatrizante atribuída a muitas plantas, principalmente quando associados a substancias anti-inflamatórias, como os flavonóides. A somatória da resposta destes 2 componentes (pró e anti-inflamatórios) pode ser decisiva para tornar a curva inflamatória mais aguda. É fundamental que se saiba qual o papel executados pelas endotoxinas no processo de cicatrização e ainda qual o tipo de sinergismo entre esse contaminante e outro componentes químicos do extrato. De modo geral nao se encontra na literatura trabalhos que levem em conta esses dois fatore levantados aqui, como pode-se observar em Facury Neto (2004), Fang (2008), Goulert (2007), Liz (2008), Manga (2004) e Tamura (2009).

Além das endotoxinas, outros componentes também podem proporcionar a inflamação necessária para iniciar o processo de cicatrização. Fang (2008) demonstra que compostos com atividade antagônica estão presentes em *Phyllanthus urinaria* e destaca o papel anti-inflamatório da quecitrina, com inibição de TNF–α e IL-6 e também com diminuição da fase log e aumento da fase estacionária de macrófagos. A inibição do fator de necrose tumoral também é percebido no extrato LHEE de *S. chilensis*.

Ainda com relação à quercitrina, vários trabalhos mostram que ela está presente em extratos com atividade anti-inflamatória (ERDEMOGLU, 2008; FANG, 2008; MANGA, 2004). Noreen(1998) demonstraram que esse flavonol possui a capacidade de inibir a produção de COX – 1, e ainda, Hammer (2007) demonstrou a inibição da produção de PGE_2 a uma concentração de 5 – 20 μM, mostrando outro aspecto da referida atividade.

Medina (2002) também demonstrou capacidade desse flavonóide de diminuir a inflamação por reduzir o estresse oxidativo e a infiltração de neutrófilos, porém ficou evidente que esse efeito é restrito a concentrações entre 1 e 5 mg/kg, assim possuindo um estreito índice terapêutico (aspecto também percebido por Facury Neto (2004) ou um efeito modulatório mediado por sua concentração.

É interessante perceber que Comalada (2005) afirma que a atividade anti-inflamatória da quercitrina é devida à clivagem do glicosídeo e liberação de sua genina, a quercetina.

Esses efeitos encontrados na administração isolada do referido composto não são necessariamente detectados no extrato vegetal, pois outras substâncias modificam a sua resposta. Contudo, esta molécula deve desempenhar um papel substantivo na ação anti-inflamatória atribuída à espécie vegetal.

A espécie vegetal em questão é estudada por alguns autores. Facury Neto e colaboradores (2004) realizam um experimento de ferida aberta com observações no 7º e 14º dia, a partir de uma infusão das partes aéreas de *S.chilensis*, aplicada por via

intraperitoneal. Observam uma redução da ferida no 14º dia e que a DL_{50} é igual a 54,7mg/kg, sendo 3.4X maior que a dose terapêutica. Afirmam que em trabalhos de outros autores não foi verificada a ação cicatrizante e que esse resultado pode ser devido a efeitos antagonistas de componentes da planta.

Liz (2008) utiliza o rizoma da planta para preparar uma infusão e realiza posteriormente um fracionamento resultando em uma fração n-butanol e o resíduo aquoso. O ensaio utilizado foi o de bolsa de ar e avaliou a atividade anti-inflamatória frente à pré-inoculação de um estimulo inflamatório (carragenina). No ensaio foi ainda medida a atividade da mioloperoxidase e da adenosina desaminase (ambos marcadores de ativação leucocitária), concentração de nitrato/nitrito e niveis de IL-1 e TNF - α. Foi detectada uma redução da migração celular em doses acima de 50mg/kg e especialmente na fração butanolica em concentrações acima de 10mg/kg. Igualmente as doses acima de 50mg/kg e na fração butanolica em concentrações acima de 10mg/kg inibiram a atividade da mioloperoxidase e da adenosina desaminase.

Goulart (2007), pertence ao mesmo grupo de pesquisa de Liz (2008) e utiliza as três partes (rizoma, folhas e inflorescências) para fazer três infusões. Da mesma maneira testa o extrato aquoso e as frações n-butanolicas e resíduo aquoso do extrato aquoso do rizoma. O ensaio utilizado também foi o de bolsa de ar e avaliou a atividade anti-inflamatória frente à pré-inoculação de um estimulo inflamatório (carragenina). No ensaio também foram medidas a atividade da mioloperoxidase e da adenosina desaminase, concentração de nitrato/nitrito e niveis de IL-1 e TNF - α. Os resultados mostram que as concentrações de 10, 25, 50 mg/kg e acima diminuem a migração leucocitária, mas a inibição de exsudação celular ocorre somente em concentrações maiores que 50mg/kg.

Tamura (2009) não descreve a parte da planta utilizada e realiza uma extração com etanol 93%. Foram testados: edema de orelha, migração em bolsa de ar, leucograma, microscopia intravital, e CLAE - MS. As doses usadas para o edema de orelha e para a

bolsa de ar foram de 12.5 25 e 50 mg/kg. Os resultados indicaram diminuição do edema nas 3 concentrações usadas para as vias tópica e intraperitoneal; redução da migração celular especialmente de células polimorfonucleares; e diminuição do rolamento celular. os principais componentes encontrados foram o ácido 5-*O*-*E*-, 3,4- e 4,5-di-*O*- *E*-cafeico e rutina.

Os três primeiros trabalhos utilizam o extrato aquoso para iniciar o estudo. Esse tipo de extrato é mais eficiente para extrair compostos com uma maior polaridade como taninos e alguns flavonóides. os taninos são moléculas capazes de complexar proteínas e assim são indicados por sua ação como antissépticos e por facilitar a formação do coagulo. Eles também são antioxidantes e portanto diminuem a lesão causada pelas espécies reativas do oxigênio. Contudo os compostos com atividade anti-inflamatória mais consagrada são os flavonóides e esses demandam um solvente mais apolar para serem extraídos.

Os 3 últimos trabalhos utilizam uma dose acima de 50mg/kg, dose essa que Facury Neto (2004) afirma ser toxica (DL_{50} 54,7mg/kg). Como pode-se observar em Liz (2008) e Goulart (2007), as frações mais apolares possuem uma menor migração de leucócitos. Possivelmente esse resultado seja devido à morte celular, uma vez que os compostos tóxicos indicados por Facury Neto tem essa característica.

Ainda pode-se apontar que nenhum dos 4 trabalhos analisa a quantidade de pirogenicos presentes na amostra e sua parcela de responsabilidade nos resultados. Como já explicitado, um estresse celular demasiado causa apoptose e, em casos mais acentuados, necrose.

No presente trabalho fica claro que concentrações maiores que 0,1mg/mL causam tanto necrose quanto apoptose de neutrófilos. Dos 4 trabalhos supra citados o que utiliza a menor dose é o de Tamura (2009), que se utiliza de uma dose de 12.5 mg/kg em 1ml, o que corresponde a uma concentração de 3,75 mg/mL. Nessa concentração certamente haverá morte celular, impedindo a inflamação de acontecer e esse efeito será muito mais evidente

em concentrações maiores, como os resultados demonstram. Bagatini (2008) ainda demonstram que a infusão das folhas à concentração de 1,75mg/kg e 14mg/kg possuem atividade citotóxica e antiproliferativa. Esses resultados deixam claro que a concentração do extrato utilizado faz muita diferença nos resultados obtidos e é de fundamental importância para a finalidade que se deseja o medicamento, uma vez que é preciso que haja inflamação no inicio do processo de cicatrização e depois que essa inflamação cesse.

7. Conclusões

Com base nos resultados obtidos e na literatura, pode-se afirmar que a espécie vegetal é capaz de causar diferentes modificações no processo de reparação tecidual. Também é claro que diferentes fases deste processo necessitam de diferentes estímulos, para que sejam maximizadas. Assim, essas diferentes atividades apresentadas pela espécie em questão podem ser aproveitadas nos diferentes momentos desse processo.

Fica evidenciada uma atividade moduladora da inflamação, uma vez que não somente diferentes concentrações são capazes de gerar respostas pró ou anti-inflamatórias, como - e mais importante - o nível inflamatório também é capaz de mudar a resposta obtida de pró-inflamatório para anti-inflamatório, com na presença de diferentes concentrações de compostos pró inflamatórios (como LPS e fMLP) ou anti-inflamatórios (como a quercitrina). Esses resultados sugerem que a espécie possa ser interessante para tratamento de pessoas com dificuldade de inflamação, uma vez que estimulam essa fase, ao mesmo tempo em que é desestimulada quando atinge sua acrofase, permitindo e acelerando a passagem para a fase seguinte (fase de formação de tecido de granulação).

8. Referências bibliográficas

- ABBAS A. K, *et al.* Citocinas em **Imunologia Celular e Molecular**. Ed Revinter Ltda, 253-276, 1998

- ANVISA (Brasil). **Produtos Registrados das Empresas de Medicamentos e Hemoderivados**, 2010. Disponível em http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/Consulta_Produto/consulta_medicamento.asp

- ASOLINI, F. C., TEDESCO, A. M., CARPES, S. T., FERRAZ, C. ALENCAR, S. M., Atividade Antioxidante E Antibacteriana Dos Compostos Fenólicos Dos Extratos De Plantas Usadas Como Chás, **Brazilian Journal Of Food Technology**, V. 9, N.3, P. 209-215, 2006

- BABIOR BM, NADPH oxidase: an update. **Blood** 93: 1464-1476,1999

- BAGATINI, M. D. BAGATINI, M. D.; FACHINETTO, J. M.; SILVA, A. C. F. TEDESCO, S. B., Cytotoxic effects of infusions (tea) of *Solidago microglossa* DC. (Asteraceae) on the cell cycle of *Allium cepa*. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 632-636, 2009.

- BARRETT, M., **The hand book of clinicaly tested herbal remedies**, The Hawoeth Herbal Press, v. 2, parte 3 , 1 ed, 2004

- BENEVIDES, J, C, P,; YOUNG, M, C, M; BOLZANI; Biological Activities of Constituents from Psychotria spectabilis; **Pharmaceutical Biology**; v.42, n8, pg. 565-569, 2004

- BLOTNIK S, *et al.* T lymphocytes synthesize and export heparing-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells. **Proc Natl Acad SCI** 91: 2890-2894, 1994

- BONINI, A.L.; MOURA, A.R.; FRANCO, M. Revisão: apoptose em glomerulopatias. **Jornal. Brasileiro de. Nefrologia**, n.22 p. 70-77, 2000

- BORREGAARD N, *et al.* Human neutrophils granules and secretory vesicles. **European Journal of Hematology** 51:187-198, 1993

- BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, p.195-202, 2006.

- BRETTBART, A.S., *et al*. Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts transuced retrovirally with PDGF-B and VEGF121 genes. **Annals of Plastic Surgery** 46: 555-561, 2001

- BROINIZI, P.R.B.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, A.M.O.; NOVOA, A.J.V.; TORRES, R.P.; AZEREDO, H.M.C.; ALVES, R.E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (Anacardium occidentale L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.902-908, 2007.

- CANDOLLE, A.P. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis**. Parsiis: Sumptibus Sociorum Treuttell et Würtz, 1836. v.5, p.332. disponivel em http://www.tropicos.org/Name/2703264

- CARDOSO, C.R., *et al.* Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair Regen** 12:235-43, 2004

- CECHINEL FILHO, Valdir; YUNES, Rosendo A.. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 1, Feb. 1998.

- Cerda-García-Rojas, C.M.; Hernández-Vidal, H.H.; Joseph-Nathan, P. 1996, ^{13}C NMR Assignments of D:C-Friedours-7-ene Derivatives. Evidence of na Abnormal Methyl Group Che

- CHICOUREI, E.L.; Pimenta, D.S.; Jorge, L.I.F.; Ferro, V.O. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.7, p.59-66, 1997.

- CHIZZOLA, R. et al. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: Comparison of different extracts and essential oil chemotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** [S.I.], v. 56, n. 16, p. 6897-6904, 2008.

- CLARK, R.A., Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Invest Dermatology** 11: 647-661, 1993

- CLARK, R.A.F., *et al*. In: **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. 1. ed. New York: Plenum, 1988

- COMALADA, M.; CAMUESCO, D.; SIERRA, A.; BALLESTE, I.; XAUS,J.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A.; In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-jB pathway; European Journal of Immunology;n 35, p. 584 - 592, 2005

- CONTRERAS M.D, SANCHEZ R, Application of a factorial design to the study of the flow behavior, spreadability and transparency of a Carbopol ETD 2020 gel, **International Journal of Pharmaceutics**, v.234, p. 149-157, 2002,

- CORRAL CJ, *et al*. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblast growth factor during ischemic wound healing. **Archives of *Surgery*** 134:200-205, 1999

- COSTA, A.F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 1117 pag. [v.3: Farmacognosia experimental].

- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T. Robbins: **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1996.

- De Carvalho, M.G.; Velandia, J.R.; de Oliveira, L.F.; Bezerra, F.B. 1998, Triterpenos isolados de *Eschweilera longipes* MIERS (Lecythidaceae), Quimica Nova, 21(6), 740-743.

- DE FREITAS, M. V. et al. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology in Vitro** [S.I.], v. 22, n. 1, p. 219-224, 2008.

- DEF 2007/2008: **Dicionário de Especialidades Farmacêuticas**. 36. ed. Rio de Janeiro: Publicações Científicas, 2007.

- DIAS, Larissa Funabashi de Toledo et al. Atividades antiúlcera e antioxidante Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae). Revista brasileira de farmacognosia, João Pessoa, v. 19, n. 1b, Mar. 2009. disponivel em http://www.scielo.br

- DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology** [S.I.], v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

- ENGELHARD E, *et al* Chemokines IL-8, Groα, MCP-1, IP-10, and Mig are sequentially and differentially expressed during phase-specific infiltration of leucocyte subsets in human wound healing**. American Journal of Pathology** 153: 1849-1860, 1998

- ERDEMOGLU, N., AKKOL, E.K., YSILADA, E., CALIS, I., Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. Leaves, **Journal of Ethnopharmacology**, v.119, p. 172–178, 2008

- FACURY NETO, M.A.; FAGUNDES, D.J.; BELETTI, M.E.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y.PENHA-SILVA, N. Systemic use of *Solidago* microglossa DC in the cicatrization of open cutaneous wounds in rats. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.21, n.4, p.207-210, 2004.

- FANG, S. H. RAO, Y. K., TZENG, Y. M., Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 333–340, 2008

- FARMACOPÉIA Brasileira. 1. ed. 1926. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/

- FARMACOPÉIA Brasileira. 2. ed. 1959. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/

- FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. 2010. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/

- GAO, F., LI, H., CHEN, Y.-D., YU, X.-N., WANG, R., CHEN, X.L., Upregulation of PTEN involved in scorpion venom-induced apoptosis in a lymphoma cell line; **Leukemia and Lymphoma**, v. 50, 2009

- GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, O.J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de Passiflora edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, supl.3, p.55-66, 2006.

- GILLITZER R, *et al.* Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology** 69: 513-21, 2001

- GOULART S, GOULARTE, Maria Izabel Moritz, LANG, Karen Luise, LIZ Rafael, SCHENKEL, Eloir Paulo, FRODE Tania Silvia, Anti-inflammatory evaluation of *Solidago chilensis*, **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 346 a 353, 2007

- GUIDUGLI-NETO J, The effect of roentgen radiation on the capillary sprontsonal superficial loops of granulation tissue I: quantitative study of the vascular volume. **Veterinaria e Odontologia**. Univ. São Paulo, v. 1, p. 6-8, 1987

- GUYTON, A. C., HALL, J. E., **Tratado de Fisiologia Médica**, 11. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2006

- HAMMER, K. P. D., HILLWIG, M. L., SOLCO, P. K., DELATE, K., MURPHY, P. A., WURTELE, E. S., BIRT, D. F., Inhibition of Prostaglandin E2 Production by Anti-inflammatory *Hypericum perforatum* Extracts and Constituents in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells, **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, p. 7323−7331, 2007

- HARTLAPP I, *et al.* Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo. **FASEB J** 15:2215-24, 2001

- HATANAKA E, CURI R. Fatty acids and wound healing: a review. ***Revista Brasileira de Farmácia*** 88:53-58, 2007

- HUETHER, S.E., MCCANE, K.L., **Understanding Pathophysiology**, 4. ed., Missouri: Elsevier, 2008

- IPNI, The International Plants Names Index, 2010 disponível em http://www.ipni.org

- KNIGHTON DR, *et al.* Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. **Surgery** 90: 262-270, 1981

- LETONA L. de, C., Remédios oftálmicos en la materia médica de Dioscórides (I). **Arch Soc Esp Oftalmol**, Madrid, v. 81, 2006

- LHUILLIER A., FABRE N., MOYANO F., MARTINS N., CLAPAROLS C., FOURASTE I., MOULIS C.; Comparison of flavonoid profiles of *Agauria salicifolia* (Ericaceae) by liquid chromatography-UV diode array detection-electrospray ionisation mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, n.1160 p. 13-20, 2007

- LIMA, C.R. Atividade cicatrizante e estudo toxicológico pré-clínico do fitoterápico Sanativo®. **Acta Farmacêutica** Bonaerense, v.25, p.544-549, 2006.

- LIMULUS AMEBOCYTE LYSATE (LAL): Kinetic-QCL, LONZA, Walkersville 2010 Bula de medicamento

- LIU HL, *et al.* Role of cytokines in neutrophil functions. In: AGGARWAL, B.B., PURI, R., eds. **Human cytokines**: their role in disease and therapy. **Science** 1995; 71-86

- LIZ R, VIGIL SV, GOULART S, MORITZ MI, SCHENKEL EP, FRÖDE TS. The anti-inflammatory modulatory role of Solidago chilensis Meyen in the murine model of the air pouch. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v.60,n.4 p. 515-521, 2008

- LOPES, C. de Lyra JL, MARKUS, RP, MARIANO, P, Circadian rythm in experimental granulomatous inflamation is modolated by melatonin, **Journal of Pineal Res.**, Munksgaard, Copenhagen, v 23, p. 72-78, 1997

- LORENZI, H., MATOS, F. J. A., **Plantas medicinais no Brazil: nativas e exoticas**, Nova Odessa : Instituto Plantarum, São Paulo, 2002, p. 170-171

- MAGALHÃES, M.S.F. Avaliação do efeito de dersani e da água de coco liofolizada no modelo cutâneo de cicatrização por segunda intenção em ratos wistar. Fortaleza, 2007. 179p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará.

- MAGDALON, J. et al. Oral Administration of Oleic or Linoleic Acids Modulates the Production of Inflammatory Mediators by Rat Macrophages. **Lipids,** v. 47, n. 8, p. 803-812, Aug 2012. ISSN 0024-4201. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000306789700006 >.

- MANGA, H. M., Brkic, M., Merie, D. E. P., In vivo anti-inflammatory activity of Alchornea cordifolia (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 209–214, 2004

- MARTIUS, C.F.P. **Flora brasiliensis: enumeration plantarum in brasilia**. Monachii: R. Oldenbourg, 1882. v.6, pt.3, p.10. disponivel em http://www.tropicos.org/Name/2703264

- MEDINA, F. S.; VERA, B.; GALVEZ, J.; ZARZUELO, A; Effect of quercitrin on the early stages of hapten induced colonic inflammation in the rat; **Life Sciences**; n. 70, p. 3097 - 3108, 2002

- MIRANDA, Letícia Tereza Gomes Saraiva. **Uso da tintura de arnica em feridas cutâneas abertas em ratos**. São Paulo, 2001. Tese (Doutorado em Ciências)-Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

- MOHSEN, S. M.; AMMAR, A. S. M. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. **Food Chemistry** [S.I.], v. 112, n. 3, p. 595-598, 2009.

- MOLLÍNEDO F, *et al.* Novel tren ds in neutrophil structure, function and development. **Immunology Today.** 20: 537-539, 1999.

- MONTESANO R, *et al.* Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: imolications for wound healing. **Prc Nati Acad Sci** 85: 4894-4897, 1988

- MOREL, A.F.; Dias, C.P.; Simionatto, E.; Stuker, C.Z.; Dacol, I.I. Antimicrobial activity of extratives of *Solidago microglossa*. **Fitoterapia**, v.77, p.453-455, 2006.

- NAHRSTEDT, A., BUTTERWECK, V., Lessons Learned from Herbal Medicinal Products: The Example of St. John's Wort, **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 1015–1021, 2010

- NOREEN, Y., SERRANO, G., PERERA,P., BOHLIN, L., Flavan-3-ol isolated from some medicinal plants inhibiting COX – 1 and COX – 2 catalysed prostaglandin biosynthesis, **Planta Medica**, v. 64, pg. 520-524, 1998

- OLIVEIRA, F., Akisue, G.; Akisue, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Ateneu, 1998. 412p. (Série Farmácia. Veterinária).

- OMS, Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges [in] The World Medicines Situation 2011, Organização Mundial da Saúde, Geneva, 2011

- PARK JE, *et al.* Understanding the role of immune regulation in wound healing. **American Journal of Surgery** 187: 11-16, 2004

- PEREIRA LM, HATANAKA E, MARTINS EF, OLIVEIRA F, LIBERTI EA, FARSKY SH, CURI R, PITHON-CURI TC, Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats, Cell Biochemistry and Function, n. 26, v. 2, p.197-204, 2008

- RODRIGUES, Eloy. “Biological activities of sesquiterpene lactones.” **Phytochemistry** 15 (1976): 1573 - 1580.

- RODRIGUES, H. G. et al. Oral Administration of Oleic or Linoleic Acid Accelerates the Inflammatory Phase of Wound Healing. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 132, n. 1, p. 208-215, Jan 2012. ISSN 0022-202X. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:000298237000029 >.

- ROGERO, Sizue Ota; LUGAO, Ademar Benévolo; IKEDA, Tamiko Ichikawa and CRUZ, Áurea Silveira. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. ***Materials Research*** [online]. 2003, vol.6, n.3, pp. 317-320. ISSN 1516-1439.

- SARABIA, J. E. L., CLARE, V. P. R., HERNÁNDEZ, V. P. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante Del ungüento rectal de *Aloe vera* l.(sábila), **Revista Cubana de Plantas Medicinales**,v.4 1999

- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RODRIGUEZ, J., ASTUDILLO, L., Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 111-115, 2002

- SEILER, A., Improvement of an in vitro stem cell assay for developmental toxicity: the use of molecular endpoints in the embryonic stem cell test, **Reproductive Toxicology**, v. 18, 2004

- SHAW TJ, KISHI K, MORI R., Wound-associated skin fibrosis: mechanisms and treatments based on modulating the inflammatory response, **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets,** v. 10 n.4 p. 320-330, 2012

- SILVA, A. G., SOUSA, C. P. G., KOEHLER, J., Fontana, J., Fontana, A. G., Guedes-Bruni, R. R., Evaluation of an Extract of Brazilian Arnica (Solidago chilensis Meyen, Asteraceae) in Treating Lumbago, **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 283–287, 2010

- SILVA, F. A. M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.22, p.94-103, 1999.

- SILVA, G. A. **Estudo farmacognóstico de *Croton urucurana* baillon (Sangra D’agua).** São Paulo, 1999. 285p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1102p.

- SMOLAREK F. S. F., CANSIAN P. M. P, MERCALI F. C., CARVALHO J. L. S., DIAS J. F. G., MIGUEL O. G., Abordagem Fitoquímica E Das Atividades Biológicas Da Espécie Vegetal *Solidago Microglossa* D.C, **Visão Acadêmica,** Curitiba, v. 10, n. 1, 2009

- SOBRAL, Ivoneide S. et al. **Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae**. *Rev. bras. farmacogn.* [online]. 2009, vol.19, n.3, pp. 686-689. ISSN 0102-695X.

- SOUZA, Tatiane P. de; LIONZO, Maria I. Zulian and PETROVICK, Pedro R.. Avaliação da redução da carga microbiana de droga vegetal através do processamento tecnológico: decocção e secagem por aspersão. ***Revista brasileira de farmacognosia*** [online]. 2006, vol.16, n.1, pp. 94-98. ISSN 0102-695X.

- SUGIURA, H.; LIU, X.; DUAN, F.; KAWASAKI, S.; TOGO, S.; KAMIO, K.; WANG, X.Q.; MAO, L.J.; AHN, Y.; ERTL, R.F.; BARGAR, T.W.; BERRO, A.; CASALE, T.B.; RENNARD, S. Cultured lung fibroblasts from ovalbumin-challenged ‘‘asthmatic’’ mice differ functionally from normal. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.37, n.4, p.424-430, 2007.

- TAMURA EK, JIMENEZ RS, WAISMAM K, GOBBO-NETO L, Lopes NP, MALPEZZI-MARINHO EA, MARINHO EA, FARSKY SH, Inhibitory effects of Solidago chilensis Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation, **Journal of Ethnopharmacology.** N.122, v.3, p.478-485, 2009

- TORRES, L.M.B. **Estudo químico da espécie *Solidago microglossa* D.C**. São Paulo, 1985, 175p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

- TROPICOS. Quick Name Search: ***Solidago microglossa* DC**. Saint Louis: Missouri Botanical Garden, 2009. Disponível em: http://www.tropicos.org/Name/2703264. Acesso em: 7 set 2009.

- WAGNER, C.; FACHINETTO, R.; CORTE, C.L.D.; BRITO, V.B.; SEVERO, D.; DIAS, G.O.C.; MOREL, A.F.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. **Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro**, Brain Research, v.1107, p.192-198, 2006.

- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: **Springer-Verlag**; New York: Heidelberg, 1996. 384p.

- WERNER S, *et al.* Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiol Rev**. 83: 835-70, 2003

9. Anexos

Aprovação do comitê de ética em experimentação animal

Universidade Cruzeiro do Sul

www.cruzeirodosul.edu.br

Anália Franco
Av. Regente Feijó, 1295
03342 000 São Paulo SP
T F 55 11 2672 6200

Pinheiros
R. Butantã, 285
05424 140 São Paulo SP
T F 55 11 3030 4000

Liberdade
R. Galvão Bueno, 868
01506 000 São Paulo SP
T F 55 11 3385 3000

São Miguel
Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225
08060 070 São Paulo SP
T F 55 11 2037 5700

Comitê de Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética da Universidade Cruzeiro do Sul **APROVOU** o protocolo do projeto de pesquisa intitulado ***"Ação da solidago microglossa DC (Arnica Brasileira) nos mecanismos de cicatrização de feridas em ratos"***, protocolo CE/UCS-074/2011, apresentado por ***Elaine Hatanaka***.

São Paulo, 01 de Julho de 2011.

Prof. Dr. **José Angelo Barela**
Vice-Presidente do Comitê de Ética
-em exercício -
Universidade Cruzeiro do Sul

Observação: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a Comissão de Ética, o relatório final sobre a pesquisa (RESOLUÇÃO DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE Nº 196, 10/10/1996, inciso 9.2, letra "c")

Reconhecida pela Portaria Ministerial nº 893, D.O.U. 25/06/1993.