



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

Mosar Lopes da Silva

**Uso do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* Nyl no
tratamento de feridas cutâneas de ratos Wistar**

Recife

2012

Mosar Lopes da Silva

**Uso do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* Nyl no
tratamento de feridas cutâneas de ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Noemia Pereira da Silva Santos

Recife

2012

Mosar Lopes da Silva

“Uso do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* NYL (líquen) no tratamento de feridas cutâneas em ratos Wister”

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Bioquímica e Fisiologia pela
Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva
Presidente

Profa. Dra. Maria Teresa Janssem de Almeida Catanho

Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva

Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão

Data: 28 / 02 / 2012

Dedico aos meus pais, pois exemplo maior de amor não há.

AGRADECIMENTOS

Iniciar os agradecimentos é uma tarefa que, apesar do que dizem considero ‘complexa’. O trabalho é produto de períodos distintos, de investimentos, diálogos, debates, acúmulos. Indicar os “colaboradores” significa reviver experiências e sentimentos que marcaram esses encontros. É relembrar de debates, questões, dúvidas, que foram sendo elaborados constantemente.

Agradeço, acima de tudo e todos, a DEUS, presente em todos os momentos de minha vida e por ter me dado saúde e o dom da sabedoria. Nada seria possível sem Ele.

À minha Mãe, Maria do Carmo, pelo amor, compreensão e apoio irrestrito em todos os momentos dessa longa jornada.

Ao meu Pai, Moisés, pelo carinho, força e por todo exemplo de vida que sempre me deu.

Aos meus Irmãos, André, Marcelo, Carmélio e Jainiton pelo amor e carinho. Sua preocupação e força dada a todo o momento, foram muito importantes.

Aos sobrinhos e cunhada, Wesily, Marcelo filho, Natália Virginia, Jessica, Rebecca, Célia Maria, Tereza e Maryoline, por todos compreenderem minha ausência em eventos e recepções familiares assim como aqueles pequenos momentos familiar de brincadeiras, risadas e até mesmo os de tristeza.

Aos meus Avôs, Adolpho, Manoel, Virginia e Emília, (em memória) e em especial Virgínia por não ter nunca largado a minha mão na caminhada na estrada da vida.

Ao meu netinho Pedro Henrique, jóia bruta que nós, como responsáveis, procuraram lapidar durante toda a nossa vida, por suportar todo o meu nervosismo e impaciência, quando me chamava pra brincar ou pra visita-ló eu, quase sempre falava ... NÃO POSSO... , quando o rumo traçado para a dissertação não se concretizava exatamente como o esperado. Amo você.

Agradeço ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva pela confiança depositada em mim e especialmente pelo apoio dado para desenvolver esta dissertação. Pela amizade e também pelas críticas, muitas vezes severas, mas que foram necessárias para meu crescimento como pessoa e como mestre.

Agradeço à Profª Drª Noemia Pereira da Silva Santos por ter me incentivado e dado um sólido conhecimento científico. Agradeço também pelos incentivos, oportunidades e pela convivência agradável durante o tempo que estive no laboratório de Produtos Naturais.

Agradeço à Prof^a Dr^a Márcia Vanusa da Silva, Prof^a Dr^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira pela contribuição nesse trabalho dando apoio, me encorajando e tirando dúvida que surgirão ao longo dessa jornada e também pela amizade que me foi concedida.

Agradeço à Prof^a Dr^a Falba Bernadete Ramo dos Anjos e Prof^o Dr. Jeymesson Vieira do departamento de Histologia da UFPE, Prof^a D^a Edna Sales Histopatologista –HC, Dr^a Josinete Maximo Maciel, sempre estiveram bem perto de mim, nos momentos difíceis na vida acadêmica e pessoal.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior do Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória, no auxílio da interpretação das análises histopatológicas.

Às alunas de Iniciação Científica Marllyn Marques da Silva e Maria Claudiana Santos Rodrigues pela preciosa ajuda na realização dos ensaios *in vivo* e processamento dos tecidos no Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, Centro Acadêmico de Vitória.

À FACEPE, pelo suporte financeiro para realização desta pesquisa

A todos os professores, amigos e funcionários da pós-graduação da Bioquímica Djalma, Miron e etc, na Fisiologia o Márcio, no departamento de Nutrição no (biotério) o veterinário responsável Edeones Tenório de França, ao Técnico do Laboratório da Bioquímica Sr^o João Virgínio da Silva e Sr^a Helena, são pessoas que, de certa forma, colaboraram para a realização dessa etapa, meu muito obrigada.

Às “doutorandas” Mônica Cristina Barroso Martins, Camilla Vila Nova, pela generosidade, pela coerência intelectual e sistêmica.

Os “meninos” Thiers Araújo Campos, Alexandre Gomes da Silva, Cleyton Clementino da Silva, pelos bons momentos e incentivo, especialmente pelos momentos de descontração, após um dia extressante e também pela a Amizade.

A todos os professores doutores que compuseram a banca examinadora e gentilmente aceitaram o convite. Além de todas as obrigações diárias se dispuseram a ler este trabalho e dar grandes sugestões e colaborações.

Provavelmente esqueci alguns.... A todos muito obrigado.

RESUMO

Os líquens são associações simbióticas entre fungos, algas e/ou cianobactérias, os quais produzem diversas substâncias a partir do seu metabolismo secundário, com algumas ações farmacológicas. O ácido barbático (BAR) é um depsídeo isolado de *Cladonia salzmannii* que apresenta diversas propriedades biológicas (antiviral, antibiótico, antifúngico, antipirético e antiinflamatório). Todavia seu uso na terapêutica é limitado devido sua baixa hidrofiliabilidade. As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos capazes de interagir com moléculas hidrofóbicas, formando complexos de inclusão promovendo assim um aumento na solubilidade. O objetivo deste trabalho foi preparar complexos de inclusão entre o ácido barbático e 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (BAR-HP- γ -CD), incorporar em gel tópico e avaliar a contração de feridas cutâneas induzidas em ratos. O diagrama de solubilidade de fases foi obtido a partir da concentração do ácido barbático em função da concentração de HP- γ -CD. O complexo de inclusão foi preparado por liofilização. O ácido barbático em suspensão e complexos de inclusão (BAR-HP- γ -CD) foi incorporado em formulações semi-sólidas tipo gel de natrosol. Estudos *in vivo* do processo de reparo tecidual foi realizados em ratos machos Wistar. O diagrama de solubilidade de fases resultou em uma curva do tipo linear, onde se comprovou que o ácido barbático em presença de 100 mM de HP- γ -CD aumenta 45 vezes sua solubilidade em água. O complexo de inclusão preparado apresentou um rendimento de 98 % e um teor de 95 % \pm 0, 021% do ácido barbático. A evolução das feridas produzidas nos animais durante o tratamento demonstrou a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e proliferação vascular, culminando com uma evidente reepitelização e colagenização. O ácido barbático demonstrou, neste estudo, ser capaz de auxiliar no processo de regeneração tecidual.

PALAVRAS CHAVE: líquens; ácido barbático; reparo tecidual

ABSTRACT

Lichens are symbiotic associations between fungi, algae and / or cyanobacteria, which produce various substances from their secondary metabolism, with some pharmacological actions. Barbatic acid (BAR) is a depside isolated from *Cladonia salzmannii* which has biological properties (antiviral, antibiotic, antifungal, antiinflammatory and antipyretic). However its use in therapy is limited due to its low hydrophilicity. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides capable of interacting with hydrophobic molecules to form inclusion complexes thus promoting an increase in solubility. The objective of this work was to prepare inclusion complexes between the barbatic acid and 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (BAR-HP- γ -CD), incorporated into topical gel and to evaluate the contraction induced skin wounds in rats. The solubility phase diagram was obtained from barbatic acid concentrations depending on the concentration of HP- γ -CD. The inclusion complex was prepared by lyophilization. Barbatic acid in suspension and inclusion complexes (BAR-HP- γ -CD) was incorporated in such formulations semisolid gel nanosol. Study gel *in vivo* tissue repair process was performed in male Wistar rats. The solubility phase diagram resulted in a curve of the linear type, which proved that barbatic acid in the presence of 100 mM increases of HP- γ -CD 45 times its solubility in water. The inclusion complex prepared showed a yield of 98% and a content of $0 \pm 95\%$, 021% of the barbatic acid. The evolution of the wounds produced in the animals during treatment showed the presence of crust, increased fibroblast proliferation and vascular proliferation, culminating with an evident reepithelialization and collagen. Barbatic acid demonstrated in this study be able to assist in the process of tissue regeneration.

KEY WORDS: lichens; barbatic acid; tissue regeneration

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1. Estrutura química do ácido barbático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996). 17
- Figura 2. Estrutura química da ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) mostrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (CHALLA *et al.*, 2005; DEL VALLE, 2004). 19

ARTIGO

- Figura 1. Cromatograma (CCD) das amostras orgânicas eluídas em seus respectivos solventes, e aplicadas em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ Merck de 20 x 20 cm, e desenvolvida de forma ascendente no sistema de solvente A (n-hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 5:4:1 v/v/v). Legenda: 1- Padrão de atranorina; 2- Padrão de ácido barbático; 3- Extrato etéreo; 4- Extrato clorofórmio; 5- Extrato acetônico; 6- Ácido barbático purificado. 46
- Figura 2. Cromatograma (HPLC), demonstrando a presença do ácido barbático (BAR) no extrato orgânico e seu percentual de pureza em relação ao padrão. A - Padrão, B - Ácido purificado, C - Extrato etéreo a frio. 47
- Figura 3. Diagrama de solubilidade de fases do ácido barbático em função da concentração de HP β -CD em água a 25°C. 48
- Figura 4. Complexo de inclusão BAR: HP γ -CD liofilizado. 49
- Figura 5. Formulações semi-sólidas tipo géis de natrosol contendo complexos de inclusão BAR: HP γ -CD (A) e ácido barbático (B). 50
- Figura 6. Áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais tratados: (Gel base) = gel natrosol base; (Gel: AB) = gel natrosol contendo ácido barbático e (Gel: BAR: HP γ -CD) = gel natrosol contendo complexos de inclusão (n=27). 51
- Figura 7. Ferida cirúrgica após o período operatório (PO) em intervalos de tempos pré-determinados: (1) = 3 dias PO; (2) = 7 dias PO; (3) = 14 dias PO e (4) = 21 dias PO. Grupos experimentais: A= Gel base; Grupo; B= Gel: BAR e C= Gel: BAR: HP γ -CD. 52
- Figura 8. Análises histopatológicas dos cortes transversais obtidas a partir da ferida cirúrgica no 7º dia PO. Grupos experimentais: (A) = Controle (Gel base); (B) = Gel: BAR e (C) = Gel: BAR: HP γ -CD. Legenda: Crosta fibrino-leucocitária=C, Tecido de granulação =G, Fibroblasto =fb e célula inflamatória= ci, corados com Hematoxilina e Eosina (HE). 54
- Figura 9. Análises histopatológicas dos cortes transversais obtidas a partir da ferida cirúrgica no 14º dia PO. Grupos experimentais: A= Controle (Gel base); B= Gel: BAR e C= Gel: BAR: HP γ -CD. Legenda: Crosta fibrino-leucocitária (C), Reepitelização (E), Fibroblasto (fb), célula inflamatória (ci) e fibras colágenas (fc). Coloração H.E(Hematoxilina e Eosina) e PS (Picosírius). 55

Figura 10. Análise histomorfométrica dos grupos de animais controle e tratados com as formulações tipo gel de natrosol contendo ácido barbático. Legenda: A= Contagem de células inflamatórias; B= contagem de vasos sanguíneos; C= Contagem de fibroblastos. * ($p < 0,05\%$ ou 5%) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle (tratado com gel base). Corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
AB	Ácido barbático
BAR: HP- γ -CD	Ácido barbático complexado com 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina
(CD)s	Ciclodextrina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
G	Gramma
Hr	Hora
HP- γ -CD	2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina
Kg	Quilograma
Kda	Kilodalton
Mg	Miligrama
Min	Minuto
Mm	Milímetro
ML	Mililitro
Mm	Milimolar
Rpm	Rotação por minuto
UV	Ultravioleta
γ cd	γ -ciclodextrina
Bcd	β -ciclodextrina
Acd	α -ciclodextrina
MRB	Modificadores da resposta biológica
TIMPs	Inibidor tecidual de metaloproteinases
TGF- beta	Fator de crescimento transformador beta
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina

TNF	Fator de crescimento neutrófilo
HE	Hematoxilina-eosina
PS	Picrosírus

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução	14
2. Objetivos	15
2.1. Geral	15
2.2. Específicos	15
3. Revisão da Literatura	16
3.1. Líquens	16
3.2. Ácido barbático: generalidades e propriedades biológicas	17
3.3. Ciclodextrinas	18
3.3.1. Complexos de inclusão	20
3.4. Géis para uso tópico	21
3.5. Reparos teciduais: processo de cicatrização	24
3.6. Usos de produtos naturais no tratamento de feridas	28
4. Referências	30
ARTIGO	
Efeito do ácido barbático de <i>Cladonia salzmannii</i> Nyl (Líquén) sobre o reparo tecidual de lesões induzidas em ratos Wistar	36
Resumo	37
Abstract	38
1. Introdução	39
2. Materiais e Métodos	40
3. Resultados e Discussão	46
4. Conclusões	58
5. Referências	59

1. Introdução

Na presença da luz, os líquens produzem uma variedade de produtos altamente complexos e peculiares com propriedades biológicas diversas. Estas substâncias vêm despertando grande interesse de pesquisadores em diversas áreas como farmacologia, microbiologia e indústria de cosméticos. A eficiência de tais compostos justifica pesquisa por novas substâncias liquênicas. Recentes pesquisas revelam que os metabólitos secundários de líquens exibem atividades interessantes e podem ser úteis como antivirais, analgésicos e antipiréticos. (PIOVANO *et. al.*, 2002). E também são considerados bons filtros solares, por absorverem radiações ultra-violetas (RANCAN *et.al.*, 2002).

O ácido barbático é um depsídeo isolado de *Cladonia salzmannii* com fórmula química ($C_{19}H_{20}O_7$), formado por dois anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster. Um dos anéis, apresenta um grupo carboxílico (HUNECK e YOSHIMURA, 1996; HONDA e VILEGAS, 1998). Têm uma massa molecular de 360 Kd e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em éter, acetona e clorofórmio. Seus cristais possuem cor amarelo-pálido em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão de 187°C (EDWARDS;NEWTON;WYNN-WILLIAM. 2003). Dentre as atividades biológicas citados na literatura, destacam-se os efeitos antiviral, antibiótico, antifúngico (PERRY *et al.*, 1999; PIOVANO *et al.*, 2002), inibidor do crescimento de plantas superiores e inibidor enzimático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos conhecidos por sua habilidade de incorporar moléculas apolares, ou parte delas, dentro de sua cavidade hidrofóbica, constituindo uma verdadeira incorporação molecular. O complexo obtido exibe novas características físico-químicas quando comparado às moléculas livres; com a complexação pode ser visualizados uma melhoria na estabilidade, maior hidrossolubilidade e biodisponibilidade e redução dos efeitos indesejáveis de compostos lipofílicos (DEL VALLE, 2004; DEVARAKONDA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento de formulações semi-sólidas transdérmicas é uma estratégia interessante para o transporte de diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos relacionados às características

farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos medicamentos quando utilizados por outras vias (TEICHMANN *et al.*, 2007).

A cicatrização de ferimentos tem recebido muita atenção por parte dos profissionais de saúde, campo este que vem se destacando com o crescente aumento de desenvolvimento de formulações de uso tópico (KINCAID, 2002; HELMKE, 2004). Uma vez que, a aplicação destas preparações pode produzir resultados positivos em tratamentos de fissuras anais, úlceras venosas e diabéticas e cicatrizes hipertróficas (HELMKE, 2004).

O objetivo deste trabalho consiste em melhorar a hidrosolubilidade do ácido barbático através da preparação de complexos de inclusão com a 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina, incorporar este complexo em formulações semi-sólidas tipo gel e avaliar no tratamento de feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar.

2. Objetivos

2.1 Geral

Avaliar o efeito do ácido barbático de *Cladonia salzmanii* no tratamento de feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar.

2.2 Específicos

- Coleta da *Cladonia salzmanii* Nyl;
- Extração, isolamento, purificação e identificação do ácido barbático;
- Avaliar a solubilidade de fases do ácido barbático em 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD);
- Preparar complexos de inclusão formados por ácido barbático- hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (BAR: HP- γ -CD);
- Desenvolver formulações tópicas do tipo gel contendo o ácido barbático e complexos de inclusão (BAR: HP- γ -CD);
- Estudo *in vivo* do processo de reparo tecidual submetido em ratos Wistar.

3. Revisão de Literatura

3.1 Líquens

Os líquens são organismos simbióticos compostos por fungos (microbionte) e uma ou mais algas e/ou cianobactérias (fotobionte) (NASH III, 1996). Calcula-se que existem cerca de 13.500 espécies (aproximadamente 600 gêneros) de fungos liquenizados, o que corresponde a 20% dos fungos conhecidos (HAWKSWORTH e HILL, 1984; SMITH e DOUGLAS, 1987). A grande maioria (98%) dos fungos liquênicos correspondem aos Ascomicetos e 47% desses são liquenizados. Os Deuteromicetos ou fungos imperfeitos representam apenas uma dezena de gêneros, ou pouco mais. Os Basidiomicetos formam diversas associações semelhantes a líquens em regiões tropicais e são encontrados com algas azuis. Algumas espécies do gênero *Dictyonema* ocorrem como Basidiomiceto liquenizado (HAWKSWORTH e HILL, 1984). Algas mais comuns encontradas em associação são as clorofíceas e destas a mais freqüente são do gênero *Trebouxia*, em aproximadamente 70% dos gêneros de líquens. Além desse, ocorrem também espécies de *Coccomyxa* e *Trentepohlia*. Entre as cianobactérias, as mais comuns são a *Nostoc* e *Scytonema* (AHMADJIAN, 1967).

Estas substâncias vêm despertando grande interesse de pesquisadores em diversas áreas como farmacologia, microbiologia e indústria de cosméticos, dentre outras. A eficiência de tais compostos justifica pesquisa por novas substâncias liquênicas. Recentes pesquisas revelam que os metabólitos secundários específicos de líquens exibem as mais variadas atividades tais como: antivirais, analgésicos e antipiréticos (PIOVANO, 2002). Também são considerados bons filtros solares, por absorverem radiações ultravioletas (RANCAN *et al.*, 2002). A identificação de líquens em nível de gênero e espécie tem sido conduzida pela análise morfológica, reações de coloração no talo, cromatografia, microcristalização e em alguns casos análises por espectrometria de massas de micro-extratos.

Estudos sistemáticos de substâncias resultantes do seu metabolismo secundário tiveram início a partir dos trabalhos de Bebert em 1831, Alms em 1832 e Knopp em 1844, os quais isolaram os ácidos vulpínico (*Letraria columbina*), picrolíquênicos e úsnico *Cladonia substellata* Vainio) respectivamente, de algumas espécies liquênicas (ALMS, 1832).

Em geral, uma espécie pode ocorrer de um a três ou mais em alguns casos, compostos resultantes do metabolismo secundário. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 630

compostos provenientes do metabolismo secundário de líquens. São ácidos alifáticos, meta e para-depsídeos, depsídeos, ésteres benzílicos, dibenzofuranos, xantonas, antroquinonas, ácidos úsnicos, terpenos e derivados do ácido pulvínico (HONDA & VILEGAS,1998). A concentração destes metabolitos secundários pode variar de 0,1 a 10% em relação ao peso seco do talo embora em alguns casos essa concentração possa ser mais alta (HALE, 1983; GALUN;SHOMER-ILAN.1988; HUNECK, 1973).

3.2 Ácido barbático: generalidades e propriedades biológicas

O ácido barbático tem uma massa molecular de 360 Kd e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em éter, acetona e clorofórmio. Seus cristais possuem cor amarelo-pálido em forma de pequenas agulhas, como ponto de fusão de 187 °C (EDWARDS; NEWTON; WYNN-WILLIAMS 2003).

Dentre as atividades biológicas citadas na literatura, destacam-se os efeitos antiviral, antibiótico, antifúngico (PERRY *et.al.*, 1999; PIOVANO *et.al.*, 2002), inibidor do crescimento de plantas superiores e inibidor de enzimático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996). Huneck & Yoshimura (1996) destacam a seguinte estrutura química para o ácido barbático:(Figura 1).

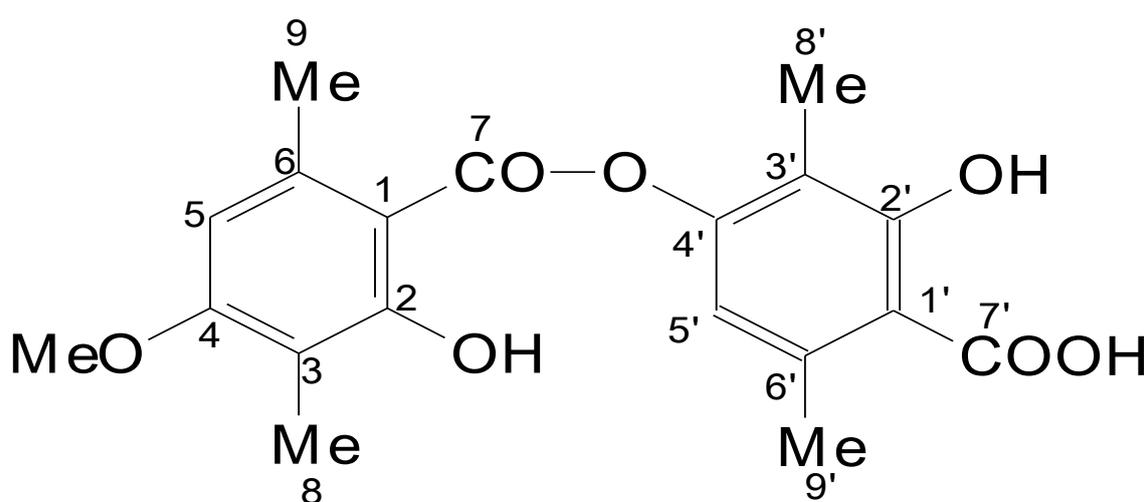


Figura 1. Estrutura química do ácido barbático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996).

3.3 Ciclodextrinas

As ciclodextrinas têm sido utilizadas no desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos com a finalidade de aumentar a incorporação de fármaco, estabilizá-lo, modelar a liberação e até vetorizá-lo para determinada população celular (LOFTSSON e BREWSTER, 1996).

Para uma determinada função biológica ocorrer, em nível de receptores ou enzimas, há a formação de um complexo “pequena molécula-macromolécula”, uma nova entidade química, envolvendo a formação de interações de natureza variada (hidrofóbicas, de Van der Waals, dipolo-dipolo, hidrogênio, transferência de carga, etc.). Também no reconhecimento molecular se forma um complexo e se tal formação implica a entrada da pequena molécula, pelo menos parcialmente, para o interior da macromolécula não biológica a nova entidade química formada é designada de “complexo de inclusão” (ITO *et.al.*, 1988).

As ciclodextrinas (CDs) se tornaram nos últimos anos um cobiçado alvo de pesquisa em diferentes áreas de aplicação, com especial interesse no âmbito farmacêutico, onde se publicaram mais de 20.000 trabalhos científicos e cerca de 8.000 patentes foram registradas, segundo a base de dados Scifinder Scholar (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2006). Nos últimos tempos, tem-se verificado a presença de vários sistemas de liberação disponíveis no desenvolvimento de produtos para a pele.

Apesar de serem consideradas como uma nova classe de excipientes farmacêuticos, as CDs já desde 1891 eram conhecidas. Schardinger, em 1903, foi o responsável pela primeira descrição detalhada da preparação e isolamento destes oligossacarídeos cíclicos. A primeira patente com CDs foi registrada em 1953 por Freudenberg;Cramer;Plieninger e já inferia sobre sua possível utilização em medicamentos baseada na sua capacidade de incrementar a solubilidade e estabilidade de fármacos (FREUDENBERG;CRAMER;PLIENING 1953).

A ciclodextrina consiste numa molécula de glicose de forma anelar, criada em 1993, na Universidade de Osaka, no Japão. Consiste, geralmente, em 6 a 8 moléculas de glicose ligadas entre si num anel, deixando um espaço no seu centro de 4,5 a 8 angstroms, capaz de sustentar uma pequena molécula como a do benzeno. As ciclodextrinas são muito utilizadas como aditivos alimentares, em cápsulas de fármacos, como agentes de separação de moléculas ou íons e como catalisadores em reações químicas. Estas moléculas podem ser unidas de modo a formarem um tubo ainda menor do que o do ADN, e o seu comprimento e diâmetro podem

ser controlados. Poderiam, hipoteticamente, ser utilizadas na produção em grande escala de sistemas integrados de computadores.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cristalinos, solúveis em água, cíclicos, não redutores, construídas a partir de seis, sete ou oito unidades de glicopiranosose. Todos os grupos hidroxila das ciclodextrinas são orientados para fora do ringue, enquanto o oxigênio glicosídico e dois anéis de átomos de hidrogênio não-trocáveis são direcionados para o interior da cavidade. Esta combinação dá as ciclodextrinas uma cavidade hidrofóbica interior e um exterior hidrofílico. A cavidade interna hidrofóbica fornece a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas hidrofóbicas, por exemplo, compostos aromáticos, álcoois, haletos, ácidos graxos, ésteres, etc. (DEVARAKONDA *et al.*; 2005).

Ciclodextrinas têm uma forma truncada específica: um cilindro apertado cônico com um exterior hidrofílico (devido à presença de radicais hidroxila) e uma cavidade hidrofóbica de um tamanho específico. Geralmente 6-8 unidades de açúcar. Existem três tipos de ciclodextrinas: Os mais comuns são as ciclodextrinas alfa, beta e gama de seis (α), sete (β), ou oito unidades (γ) anidrogucose na estrutura do anel. Entre elas, ciclodextrina beta é principalmente a mais utilizada (HAMILTON; PARK; HEADY1970).(Figura 2).

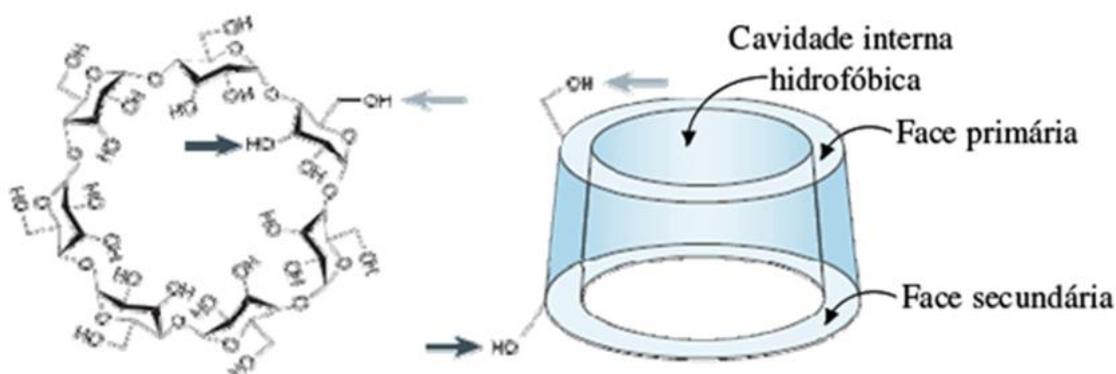


Figura 2. Estrutura química da ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) mostrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (CHALLA *et al.*, 2005; DEL VALLE, 2004).

Quando modificadas quimicamente as ciclodextrinas apresentam um aumento substancial na solubilidade e propriedade de inclusão de compostos lipofílicos. Esta propriedade de complexação consiste em um fenômeno molecular em que geralmente apenas

uma molécula hóspede interage com a cavidade de uma molécula de ciclodextrina para tornar-se aprisionado e formar uma associação estável. Moléculas ou grupos funcionais que são menos hidrofílicos do que a água pode ser incluída na cavidade de ciclodextrina na presença de água (CARDELLO & CELESTINO, 1996).

As ciclodextrinas oferecem diversas aplicações em vários setores, tais como alimentos, produtos farmacêuticos, industriais, cosméticos e diagnósticos. As ciclodextrinas como hidroxipropil β e γ -ciclodextrina são exemplos desses ciclodextrinas quimicamente modificadas.

As CDs são potencialmente interessantes quando se deseja a estabilização de um fármaco (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; FERIOLI *et.al.*, 2001) Assim sabendo que, a ciclodextrina pode ser modificada, pode-se utilizar-la como complexo de inclusão.

3.3.1 Complexos de inclusão

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos solúveis em água que possuem a capacidade de formar complexos de inclusão reversíveis com moléculas apolares, incrementando a forma exponencial sua solubilidade aquosa. A capacidade de encapsular fármacos proporciona importantes incrementos na biodisponibilidade e estabilidade de inúmeros fármacos (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; SZEJTLI, 1988).

Para que ocorra a complexação, a "molécula hóspede" deve caber, pelo menos parcialmente, na cavidade de ciclodextrina. No tamanho da cavidade, bem como modificações químicas é possível determinar a afinidade da ciclodextrinas as várias moléculas. No caso de algumas moléculas de baixo peso molecular, mais de uma molécula hóspede pode caber dentro da cavidade. Ao contrário, moléculas de alto peso molecular podem vincular mais de uma molécula de ciclodextrina. Um dos exemplos interessantes de reconhecimento molecular artificial é a formação de complexos de inclusão entre moléculas variadas, nomeadamente fármacos, e as ciclodextrinas (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; SZEJTLI, 1988). O interior das ciclodextrinas é de natureza hidrofóbica enquanto os bordos e o exterior, contendo grupos hidroxilas, conferem um caráter hidrofílico a esse ambiente (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; SZEJTLI, 1988).

Conforme Cardello & Celestino (1996), um bom agente encapsulante deve apresentar as seguintes propriedades: estabilidade em emulsão, boa capacidade de formação de película, baixa hidrofobicidade, baixa viscosidade, gosto suave, ausência de aroma e baixo custo. As ciclodextrinas apresentam grandes vantagens no que diz respeito à encapsulação molecular: permitem encapsular grande número de compostos; apresentam modificações vantajosas nas propriedades físicas e químicas das moléculas encapsuladas e o método utilizado é barato e simples.

A formação de compostos de inclusão de β e γ -ciclodextrinas com óleos essenciais de limão, laranja e camomila foram estudados. Os óleos de limão e de laranja resultaram na união com β e γ -ciclodextrina. A indústria cosmética e farmacêutica utiliza a formação de complexos de ciclodextrinas com o objetivo de melhorar as características do produto final (solubilidade, estabilidade e fotoestabilidade), assim como para facilitar a absorção e liberação dos princípios farmacologicamente ativos (PERSECA *et.al.*, 1979). A encapsulação entre fármacos e CDs, tais como nifedipina, ciclosporina e tamazepan foram realizados com grande sucesso (MENDES, 1994).

3.4 Géis para uso tópico

Segundo os autores (BARRY, 2001; KENDAL; CHONG; COCK 2007) a via tópica tem sido considerada como uma alternativa de interesse para a administração de fármacos, visto que, estas terapias apresentam boa aceitação por parte dos pacientes (TORSIELLO e KOPACKI 2000; ISRAEL, 2003). O desenvolvimento de formulações é uma estratégia interessante para transportar fármacos cuja ação é na própria pele, representando uma alternativa para superar aspectos indesejados relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas dos fármacos.

A pele, que constitui a principal interface biológica entre o organismo humano e o meio ambiente (HADGRAFT, 2001; MARQUELE-OLIVEIRA, *et.al.*, 2007; WILLIAMS, 2006; CEVEC e VIERL, 2007; SILVA, 2007), apresenta fundamental importância na manutenção da homeostase, atuando no controle de perda de água, proteção contra agentes químicos e físicos provenientes do meio ambiente (HADGRAFT, 2001; SILVA, 2007). Em função destas propriedades, a pele representa a principal barreira a ser vencida pelos

fármacos, principalmente, devido à sua camada mais externa, o estrato córneo (EC) (HADGRAFT, 2001; WILLIAMS, 2006; CEVEC e VIERL, 2007). O EC é um tecido queratinizado e se comporta como uma membrana artificial semipermeável. As moléculas das substâncias ativas, geralmente, penetram essa membrana por difusão passiva. Assim, a velocidade de difusão de um fármaco através dessa camada da pele depende da concentração do mesmo no veículo, de sua solubilidade, do coeficiente de difusão e do coeficiente de partição entre o EC e o veículo. As substâncias que têm características de solubilidade tanto em água quanto em lipídios são boas candidatas à difusão através do EC, bem como nas camadas epidérmica e dérmica (SURBER, *et.al.*, 1990, FREITAS, 2005).

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Diante de mecanismos involutórios que o tecido lesionado passa os cientistas vem pesquisando forma para auxiliar nesse processo regeneração tecidual lançam mão de produtos e métodos que poderão contribuir para o objetivo final. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas que têm os leucócitos como um de seus mais importantes protagonistas.

Sendo assim, o desenvolvimento de formulações transdérmicas é uma estratégia interessante para o transporte de diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos medicamentos quando utilizados por outras vias (TEICHMANN, *et.al.*, 2007; BADRAN; KUNTSCHE; FAHR 2009). Nesse sentido, em um mundo cada vez mais globalizado e competitivo, a eficácia terapêutica dos medicamentos de liberação transdérmica tem chamado a atenção da sociedade contemporânea (BADRAN; KUNTSCHE; FAHR 2009). A utilização da via transdérmica oferece vantagens em diversas circunstâncias quando comparada às outras vias de administração. Segundo Zhao; Brown; Jones (2009a) descrevem que fármacos de diversas classes têm sido incorporados em formas farmacêuticas para serem administrados pela via transcutânea, entre os quais a heparina, a lidocaína e muitos hormônios sexuais que têm sido incorporados em aerossóis, além da betametasona e do minoxidil, que são incorporados sob a forma de espumas.

Outros pesquisadores fazem colocações consideráveis como a de Leal *et.al.*, (2008), a isotretinoína, um retinóide usado no tratamento da acne nodulocística, apresenta severas reações adversas advindas do uso pela via oral, tais como teratogenicidade, irritação cutânea,

depressão nervosa, aumento dos ácidos graxos livres no sangue e complicações pulmonares, sendo esses efeitos minimizados quando é administrada pela via cutânea.

Oliveira (2008) relata que fármacos que apresentam uma elevada hidrofília, quando incorporados em formulações destinadas à permeação da via cutânea, terão dificuldade em penetrar o estrato córneo. Por outro lado, se apresentar elevada lipofília, terá tendência a ficar retido. Por esse motivo, é importante que o fármaco não apresente um grau de lipofília muito elevado, mas que o seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) permita a sua partição, o que acontece quando o seu coeficiente de partição situar-se entre cerca de 1 a 3mn (OLIVEIRA, 2008). Como se pode observar, a natureza de alguns fármacos influencia diretamente o processo de permeação cutânea.

Diversas estratégias têm sido pesquisadas e os modernos estudos farmacêuticos apontam para o uso de promotores de permeação, bem como o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento e produção de sistemas de liberação de fármacos com capacidade de promover sua permeação através da pele (SILVA, *et.al.*, 2010). Os desafios implicados no desenvolvimento de formas farmacêuticas transdérmicas são direcionados, sobretudo, a favorecer da eficiente liberação e permeação dos princípios ativos através das camadas da pele, que se apresentam como barreira à penetração de fármacos. Sobre isso, destacando-se novas formas farmacêuticas, como as microemulsões e formulações semi-sólidos tio gel, que apresentam propriedades físico-químicas e parâmetros farmacotécnicos adequados para o uso transdérmico (SILVA *et.al.*, 2009; ZHAO *et.al.*, 2009b).

As formulações semi-sólidas ou hidrogéis podem sob a forma de gel transparente, amorfo ou placa. As placas são geralmente compostas por água, propileno glicol e carboximetil celulose ou água e polivinilpirrolidona.

Existem ainda os hidrogéis que possuem associação com alginato, o que lhes confere capacidade de maior poder de absorção e desbridamento químico, indicados para feridas com tecido necrótico e com tecido desvitalizado.

O Elasto-gel possui em sua formulação 65% de glicerina e 17,55% de água destilada, o que lhe confere alto poder bacteriostático e fungicida. São utilizados em feridas secas ou com pouco exsudato, com necrose, pois auxilia na remoção de crostas. Quando associado ao alginato, pode ser utilizado em feridas com moderado exsudato; feridas limpas, superficiais,

como lacerações, cortes, abrasões; áreas doadoras e receptoras de enxerto; úlceras diabéticas e úlceras de pressão (arteriais, venosas e mistas); queimaduras de primeiro e segundo grau.

3.5 Reparos teciduais: processo de cicatrização

Segundo Ansel, Popovich e Allen (2007), a resposta biológica a um fármaco é resultado de sua interação com os receptores celulares ou sistemas enzimáticos importantes, e decorrem de uma alteração dos processos biológicos anteriores à administração do fármaco. A magnitude da resposta biológica relaciona-se com a concentração que o fármaco atinge em seu local de ação, e essa concentração depende da dose administrada, da quantidade absorvida e da distribuição no local, e da velocidade e da quantidade eliminada do corpo. A constituição física e química do fármaco, particularmente a solubilidade lipídica, o grau de ionização e o tamanho molecular determinam, em grande parte, sua capacidade de produzir sua atividade biológica.

A capacidade auto-regenerativa é um fenômeno universal nos organismos vivos. Nos organismos unicelulares, esta restrita à presença de enzimas responsáveis pela recuperação de elementos estruturais (como os constituintes do citoesqueleto, membranas e paredes celulares) e de moléculas de alta complexidade (como proteínas de elevada complexidade estrutural, RNAs e o DNA) (BALBINO; PEREIRA; CURI 2005).

Existem dois tipos de cicatrização: a cicatrização por primeira intenção e a cicatrização por segunda intenção. A diferença básica entre estes dois tipos é a intensidade (de organização, de reparação, de formação de cicatriz). Um exemplo clássico de cicatrização por primeira intenção é quando é feito um corte na pele durante uma cirurgia e os bordos da ferida são aproximados (por exemplo, com pontos). A perda de tecido neste caso é muito pequena, e daí há menos organização, menos formação de tecido conjuntivo. Uma cicatrização por segunda intenção é quando a ferida é muito grande, os bordos da ferida não são aproximados, vai haver mais organização, mais deposição de colágeno, mais formação de cicatriz (SCHMIDT, 2006).

A cicatrização de feridas consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Tal evento é um processo dinâmico que envolve fenômenos bioquímicos e fisiológicos

que se comportem de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (BALBINO; PEREIRA; CURI 2005).

Conforme Mendonça e Coutinho-Netto (2009), o processo de cicatrização ocorre em três estágios: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por um de proliferação e finalizando com o reparo em um estágio de remodelação. Também são relatos de Mendonça e Coutinho-Netto (2009), uma classificação de uma forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida, remodelação.

Coagulação

A formação do coágulo serve não apenas para coaptar as bordas das feridas, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Inflamação

O macrófago é a célula inflamatória mais importante dessa fase. Permanece do terceiro ao décimo dia. Fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento de tecido de granulação. O uso de laser de baixa energia em pele de ratos favorece a cicatrização. Alta atividade fagocitária dos macrófagos é observada após trauma (PETROVA; KORTNER; SCHMIDT 1992). Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz (MOSHER e FURCHT, 1981).

Proliferação

A primeira das fases da proliferação é a reepitelização. Faz-se a migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens nas de espessura total. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelos aumentos das mitoses e hiperplasia do epitélio (CHRISTOPHER, 1972).

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia formação da matriz, que é extremamente importante na formação do tecido de granulação (coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno). Inicialmente as células endoteliais migram para a área ferida, a seguir ocorre proliferação das células endoteliais, acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Contração da ferida

É o movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). As feridas de espessura parcial não contam com essa fase. Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida (STEGMAN et al, 1982). Em cicatrizes por segunda intenção a contração pode reduzir 62% da área de superfície do defeito cutâneo (LAWRENCE; COMAISH; DAHL 1986).

Remodelação

Essa é a última das fases; ocorre no colágeno e na matriz; dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. A neovasculatura diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatrização normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (MANDELBAUM ; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

A matriz extracelular é um elemento muito importante durante a reparação celular e que precisa de se manter íntegro para que ocorra regeneração. Esta consiste basicamente, em proteínas estruturais fibrosas (que incluem vários tipos de colágeno e glicoproteínas de adesão), e numa matriz intersticial constituída por proteoglicanos. A matriz extracelular tem

um papel muito importante na estimulação da proliferação e diferenciação celular, direciona a migração celular entre os tecidos e permite a adesão das células aos tecidos. As células parenquimatosas ligam-se à matriz extracelular através de integrinas. Assim, as integrinas, medeiam o contacto entre as células e a proteínas da matriz (colágeno e fibronectina) e permitem também a transmissão de estímulos da matriz para o núcleo da célula. Estes estímulos induzem proliferação, diferenciação e síntese de proteínas que interferem na migração celular. Para que se processe a reparação, regeneração e cicatrização são essenciais a comunicação entre as células do parênquima e os elementos da matriz (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Devido à grande proliferação celular e à desorganizada secreção de matriz extracelular é essencial a existência de um processo que organize a cicatriz, processo denominado remodelação. Este processo é regulado por metaloproteínases (*metalo*, porque são dependentes de metais para funcionar, como o zinco) e a sua função é a degradação do colágeno. Os TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinase) são ativados conjuntamente com as metaloproteínases, e sua função é regular o desempenho destas. Para além dos TIMPs, existem outros inibidores das metaloproteínases, como o TGF- beta (Fator de crescimento transformador beta) e os corticosteróides. Por outro lado, o PDGF (Fator de crescimento derivado das Plaquetas), o IGF (fator de crescimento semelhante a Insulina), as citosinas (interleucinas e TNF (fator de crescimento neutrófilo)) estimulam a síntese das Metaloproteínases (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

Segundo Ayello e Franz (2003), o sucesso no tratamento de feridas depende mais da competência e do conhecimento dos profissionais envolvidos, de sua capacidade de avaliar e selecionar adequadamente técnicas e recursos, do que da disponibilidade de recursos e tecnologias sofisticadas.

Agentes tópicos são aqueles aplicados diretamente sobre o leito da ferida ou destinados à limpeza ou proteção da área em seu redor. Curativo, também chamado por alguns autores de cobertura, é o recurso que cobre uma ferida, com o objetivo de favorecer o processo de cicatrização e protegê-la contra agressões externas, mantendo-a úmida e preservando a integridade de sua região periférica (DEALEY, 2001).

3.6 Uso de produtos naturais no tratamento de feridas

Um novo enfoque vem sendo proposto para o tratamento de diversas lesões cutâneas causadas por injúrias ou processo patológico a partir de substâncias que atuam modificando a respostas no processo de cicatrização. Diversos estudos vêm sendo analisados frente a diversos modificadores da resposta biológica (MRB) proveniente de diversas fontes naturais e mecanismos de ação que se encontram presentes nestes agentes cicatrizantes (HAN *et al*, 1999).

No tratamento de feridas tem-se intensificado a pesquisa de produtos naturais para auxiliar a cicatrização, como óleos essenciais, cumarinas, taninos (EURIDES *et al.*, 1988; BONDI 1989; SANCHES NETO *et al.*, 1993). Existem diversos relatos sobre a utilização de extratos de plantas e líquens para o tratamento de diversos tipos de doenças. Entre os líquens utilizados na medicina popular brasileira *Cladonia salzmannii* ocupa lugar de destaque (RIBEIRO, 2007).

Consistindo assim em utilizar-se da resposta da primeira e segunda intenção para buscar uma melhora frente a uma determinada enfermidade, diversos estudos vêm sendo analisados frente a diversos modificadores da resposta biológica (MRB) proveniente de várias fontes e mecanismos de ação que se encontram presentes (HAN *et al*, 1999)

Do ponto de vista dos usuários dos serviços de saúde, as plantas medicinais são vistas na maioria das vezes apenas como uma alternativa aos elevados custos dos medicamentos convencionais e não como uma opção terapêutica devido às propriedades curativas das plantas (NESS; SHERMAN 1999).

O Brasil possui uma das maiores diversidades vegetal do mundo e inúmeras experiências vinculadas ao conhecimento popular das plantas medicinais e tecnologia para correlacionar o saber popular e científico (COUTINHO *et al*, 2004; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). No contexto do uso de plantas medicinais, a prática da fitoterapia vem recebendo amparo legal significativo nos últimos anos (RIBEIRO, 2005; SILVA *et al*, 2006; CARVALHO *et al*, 2008; MARLIÉRE *et al.*, 2008; VEIGA-JÚNIOR, 2008).

A exemplo tem-se o acetato de celulose, permeável ao vapor (Biofill), possui uma composição semipermeável e semitransparente. Tendo ação de manter o meio úmido, tem permeabilidade seletiva e sempre tem indicações para ferimentos de queimaduras, para áreas

doadoras de enxerto. Como todo produto farmacológico ou natural tem suas vantagens que é do tipo fácil aplicação e remoção; pode ser cortado e adaptado; visibilidade, barreira eficaz; custo baixo. Quanto as desvantagens é que não é indicado na ruptura do curativo em regiões de articulação, assim como possui baixo poder de absorção.

Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas não só na compreensão acerca dos diversos fatores e fenômenos envolvidos com o processo de reparação tissular, mas, simultaneamente com a crescente pesquisa e a descoberta de novos recursos e tecnologias para nele intervir, muito há que ser descoberto, em especial nos países subdesenvolvidos, em que ainda são elevadas a incidência e a prevalência de lesões crônicas, particularmente as úlceras.

REFERÊNCIAS

- AHMADJIAN, V. *Phycologia*. 1967.
- ALBUQUERQUE, UP; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev Bras Farmacogn*. v. 16 (Supl.) p. 678-689. 2006.
- ANSEL, HC; POPOVICH N, G; ALLEN L, VJR. *Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8 ed. São Paulo: Artmed. 2007.
- AYELLO, EA; FRANZ, RA .Prevenção de úlceras de pressão e tratamento: baseada na competência currículos de enfermagem. 2003.
- BADRAN, MM, KUNTSCHE J, FAHR A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *Eur J Pharm Sci*. v.36(4-5).p.511-23. 2009.
- BALBINO, CA; PEREIRA, L M; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* São Paulo, v. 41, n.1. 2005.
- BARRY, BW. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur J Pharm Sci*, Amsterdam, v.14, p.101-114. 2001.
- BEBERT.; *J. Pharm. Sci. Access*. **1831**, 17, 696; ALMS, I.;*Ann. Pharm.* **1832**, 1, 61; KNOPP, W.; *Ann. Chem. Pharm.***1844**, 49, 103; apud HUNECK, S.; YOSSHIMURA, I.; *Identification of lichen substances*, Springer, Berlin, 1996.
- BONDI, EE. Topical tretinoin therapy. *Am Fam Physician*. v. 39, n. 5, p. 269-272. 1989.
- CARDELLO, HM; CELESTINO, EM; Encapsulação de aromas e sabores: utilização de amidos como agentes encapsulantes. *B. SBCTA*, v. 30, n. 2, p. 166-171. 1996.
- CARVALHO, ACB; BALBINO, EE; MACIEL. A, PERFEITO JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. v. 18, p. 314-319. 2008.
- CEVEC, G; VIERL, U. Spatial distribution of cutaneous microvasculature and local drug clearance after drug application on the skin. *Journal of Controlled Release*, v.118, p. 18-26. 2007.
- CHALLA, R.;AHUJA,A.;ALI,J.& KHAR,R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*. v. 6, n. 2. 2005.
- CHRISTOPHER, E. Kinetic aspects of epidermal healing. In: MAIBACH, H.; ROOVE, D. (Ed.). *Epidermal wound healing*. St. Louis: Mosby, 1972.

- CONTRAN, RS; KUMAR, V; COLLINS, T. ROBBINS: Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- COUTINHO, HDM; BEZERRA, DAC; LÔBO, K; BARBOSA, IJF. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos*. v.5, p. 77-85. 2004.
- DEALEY, C. Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras. 2 ed. São Paulo: Atheneu, p. 68-89. 2001.
- DEL-VALLE, EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 1033-1046. 2004
- DEVARAKONDA, B.; HILL, R.A.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M. and de VILLIERS, M.M. Comparation of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine dendrimers and cyclodextrins. *Intern J Pharm*, v. 304, p. 193–209, 2005.
- EDWARDS, HGM; NEWTON, EM; WYNN-WILLIAMS, DD. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *Journal of Molecular Structure*. v. 651-653, p.27-37. 2003.
- EURIDES, D.; MAZZANTI, A.; GONÇALVES, G.F.; BELETTI, M.E.; SILVA, L.A.F.; FIORAVANTI, M.C.S.; CHAVES, N.S.T.; BOMBONATO, P.P.; OGATA, A.S.; et al. Aspectos morfológicos, morfométricos e histológicos da reparação tecidual de feridas cutâneas de camundongos tratadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii*). *Veterinária Notícias*, v. 4, n. 1, p.77-82. 1998.
- FERIOLI, V. RUSTICHELLI, C.; PAVESI, G.; GAMBERINI, G. New combined treatment of hypermelanosis: analytical studies on efficacy and stability improvement. *Inter J Cosmetic Sci*. v. 23, p.333-340. 2001.
- FREITAS, ZMF. Avaliação Biofarmacotécnica de Formulações Dermatológicas Semi-Sólidas de Cetoconazol. 2005. 154 f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2005.
- FREUDENBERG, K; CRAMER, F; PLIENINGER, H. Verfahren zur Herstellung von Einschlußverbindungen physiologisch wirksamer organischer Verbindungen. Knoll A.-G. Chemische Fabriken, Germany, Patent No. 895,769, 5 November 1953.
- GALUN, M; SHOMER-ILAN, A. Secondary metabolic products. In *CRC Handbook of Lichenology*, v. III, M. Galun; Ed. CRC Press Inc. Boca Raton, Flórida. 1988.
- HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. *Int J Pharm*. v.224, p.1-18. 2001
- HALE Jr, ME. *The Biology of Lichens*. Baltimore: Edward Arnold, 1983.

- HAMILTON,R.M.;PARK,L.A.;HEADY,R.E.Eliminating undesirable taste from coffee and tea extracts and products., v.3. p. 528-819. 1970.
- HAN, SS; LEE, CK; SHIN, KY; CHUNG, HM; PARK, IY; LEE, KS; KIM, SY. Prevention of ultraviolet radiation-induced supression of contact hypersensitivity by *Aloe vera* gel components. *Int J Immunopharmacol.* v. 19, p. 303-10. 1999.
- HAWKSWORTH, DL; HILL, DJ. *The lichen-forming fungi.* Blackie & Sons. Lt Glasgow, 1984.
- HELMKE, CD. Wound Healing – part 1. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* v.8, n.4, p. 269-274. 2004.
- HONDA, NK; VILEGAS, W. Química dos liquens-Divulgação.*Química Nova*,São Paulo,v. 21, p. 110-125. 1998.
- HUNECK, S. Nature of lichen substances. In: AHMADJIAN, V.; HALE, M. E. *The Lichens.* New York: Ed. Academic Press. 1973.
- HUNECK, S; YOSHIMURA, I. *Identification of Lichen Substances.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 1996.
- ISRAEL, A. Topical gel for the treatment of a refractory leg ulcer; case report. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* v.7, n.3, p.176-178. 2003.
- ITO, K; KIKUCHI, K; OKAZAKI, N; KOBAYASHI, S. Retention of aroma components in liquors with cyclodextrins. *Agric Biol Chem.* v. 52, n.11, p. 2763-2769. 1988.
- KENDAL, MAF; CHONG, Y; COCK, A. The mechanical properties of the skin epidermis in relation to targeted gene and drug delivery. *Biomaterials.* v. 28, p. 4968 – 4977, 2007.
- KINCAID, MR. Options in wound care. *International Journal of Pharmaceutical Compounding.* v. 6, n. 2, p.92 – 95, 2002.
- KNOPP, W. Chemisch-physiologische Untersuchung über die Flechten. *Ann Chem Pharm.* v. 49, p. 103–124. 1844.
- LAWRENCE, CM; COMAISH, HS; DAHL, MGC. Excision of skin tumors without wound closure. *Br J Dermatol.* v.115, p. 563. 1986.
- LEAL,L.B.;ALMEIDA,A.D.T.;MELO,E.K.S.;BEDOR,D.C.G.;SANTANA,D.P.
Desenvolvimento tecnológico de preparações tópicas de isotretinoína. *Rev Bras Farm.* v. 789, n. 4, p. 327-32. 2008.
- LOFTSSON, T; BREWSTER, M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci.* v. 85, n.10, p. 1017-1025. 1996.

- MANDELBAUM, SH; DI SANTIS, EP; MANDELBAUM, MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An bras Dermatol.* v. 78, n.5, p.525-542. 2003
- MARLIÈRE, LDP; RIBEIRO, AQ; BRANDÃO, MGL; KLEIN, CH; ACURCIO, FA. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn.* v.18 (Supl.), p. 754-760. 2008.
- MARQUELE-OLIVEIRA,F.;FONSECA.YM.;DEFREITAS.O.;FONSECA.MJV. Development of topical functionalized formulations added with própolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics.* v. 342, p. 40-48. 2007.
- MENDES, C. R.; *Dissertação de Mestrado.* Escola Paulista de Medicina, 1994, São Paulo.
- MENDONÇA, RJ; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *An Bras Dermatol.* v. 84, n. 3, p. 257-62. 2009.
- MOSHER, DF; FURCHT, LT. Fibronectin: review of its structure and possible functions. *J Invest Dermatol.* v. 77. p. 175. 1981.
- NASH III, TH. Lichen Biology – Introduction. In: Nash III, T. H. *Lichen Biology.* Cambridge: Ed. Cambridge University Press, 1996.
- NESS, J; SHERMAN, FT. Alternative medicine: What the data say about common herbal therapies. *Geriatrics.* v.54, p. 33-38. 1999.
- OLIVEIRA, RCS. Desenvolvimento, formulação e avaliação de sistemas de libertação transdérmica incorporando sistemas ternários de complexação (Fármaco/Ciclodextrina/Polímero). Tese de doutorado. Portugal: Universidade do Porto; 2008.
- PERRY, EK; PICKERING, AT; WANG, WW; HOUGHTON, PJ; PERRY, NS. Medical Research Council, Newcastle General Hospital, Newcastle upon Tyne. *J Pharm Pharmacol.* v.51, n. 5, p. 527-534. 1999.
- PERSECÁ, T; DORDE, A; CORDOREAN, V.THE FREE AMINO-ACID PATTERN IN SEVERAL LICHEN SPECIES.*Studia Univ. Babeş-Bolyai, XXIV,* n. 26, 1979.
- PETROVA, O; KORTNER, G; SCHMIDT, I. Norepinephrine infusion delays the onset of excess fat deposition in fa/fa Zucker rat pups. *Int J Obese.* v.16, n.1, p. 41-46. 1992.
- PIOVANO,M.;GARBARINO,J.A.;GIANNINI,F.A.;CORRECHE,E.R.;FERESIN,G.;TAPIA, A.;ZACCHINO,S and ENRIZ,R. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.* v. 47, p. 235-240. 2002.

- RANCAN, F; ROSAN, S; BOEHM, K; FERNANDEZ, E; HIDALGO, ME; QUIHOT, W; RUBIO, C; BOEHM, F; PIAZENA, H; OLTMANNNS, U. Protection against UVB irradiation by natural filters extracted from lichens. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. v. 68, Issues 2–3, p.133–139. 2002.
- RIBEIRO, AQ; Leite, JPV; Dantas-Barros. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev Bras Farmacogn*. v.15, n, 65-70. 2005.
- RIBEIRO, PRTH. Efeito do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* (Nyl.) nanoencapsulado sobre *Trypanosoma cruzi*. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2007.
- SANCHEZ NETO, R.;BARONE,B.;TEVES,D.C.;SIMÕES,M.J.;NOVO,N.F.;JULIANO,Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual deferidas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.8, n.1, p.18-23. 1993.
- SCHARDINGER, F.Z. *Unters. Nahf. Genusssm* v.6,p. 865-80,1903.
- SCHMIDT, W. Iron Stress responses in roots of strategi I plants. In: BARTON, L.L.; ABADÍA, J. (Eds.). *Iron nutrition in plants and rhizospheric microorganisms*. Springer, Netherlands, p.229-250, 2006.
- SILVA, MIG; GONDIM, APS; NUNES, IFS; SOUSA, FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn*. v.16, p.455-462. 2006.
- SILVA, CL; TOPGAARD, D; KOCHERBITOV, V; SOUSA, JJS et al , "Stratum corneum hydration: Phase transformations and mobility in stratum corneum, extracted lipids and isolated corneocytes" *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, v.1768.p.2647-2659.2007.
- SILVA, JA; SANTANA, DP; BEDOR, DGC; BORBA, VFC; LIRA, AAM; Egito, EST. Estudo de liberação e permeação In Vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*. v. 32, n. 6, p. 1389-93. 2009
- SILVA, JA; APOLINÁRIO, AC; SOUZA, MSR, DAMASCENO, BPGL, MEDEIROS, ACD. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. v. 31, n. 3, p.125-131. 2010
- SMITH, DC; DOUGLAS, AE. *The Biology of Symbiosis*. London: Edward Arnold, 1987.

- STEGMAN, SJ; TROMOVITCH, TA, GLOGAU, RG. Grafts. In: *Basics of Dermatological Surgery*. St Louis: Mosby, 1982.
- SURBER,C.;WILHELM,K-P.;HORI,M.;MAIBACH,H.I and GUY,R.H.Optimization of topical therapy: partitioning of drug into stratum corneum. *Pharm Res*. v.7, n.12, p. 1320-1324. 1990.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrins. In: SZEJTLI, J., ed. *Cyclodextrin technology*. London: Kluwer Academic. p 1-78. Publishers,1988
- TEICHMANN, A; HEUSCHKEL. S; JACOBI, U; PRESSE, G. NEUBERT, RHH; STERRY, W; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 67, n. 3, p. 699-706. 2007.
- TORSIELLO, MJ; KOPACKI, MH. Transdermal Nifedipine for wound healing: case reports. *Int J Pharm Compounding*. v.4, n.5, p.356-358. 2000.
- VEIGA-JUNIOR, VF. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn*. v.18, p. 308-313. 2008.
- WILLIAMS, FM. In vitro studies – how good are they at replacing in vivo studies for measurement of skin absorption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. v.21, p.199-203. 2006.
- ZHAO,Y.;BROWN,M.B.;JONES,S.A.Engineering novel topical foams using hydrofluoroalkane emulsions stabilized with pluronic surfactants. *Eur J Pharm Sci*. v. 37, n. 3-4, p. 370-377. 2009a
- ZHAO,Y.;MODARESI,M.;JONES,S.A.;BROWN,M.B.A dynamic topical hydrofluoroalkane foam to induce nanoparticle modification and drug release in situ. *Eur J Pharm Biopharm*. v.72, n. 3, p. 521-8. 2009b.

ARTIGO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL OF BIOMEDICINE AND BIOTECHNOLOGY

Efeito do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* NYL (Líquén) sobre o reparo tecidual de lesões induzidas em ratos Wistar

Mosar Lopes da Silva^{1,2}; Marllyn Marques da Silva³, Thiers Araújo Campos^{3,4}, Maria Claudiana Santos Rodrigues³, Francisco Carlos Amanajás Aguiar-Junior³, Noemia Pereira da Silva Santos^{3,4}, Nicácio Henrique da Silva^{1,2*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia- Centro de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica/UFPE; ² Laboratório de Química de Produtos Naturais - Departamento de Bioquímica/UFPE; ³ Laboratório de Biotecnologia e Fármacos - Centro Acadêmico de Vitória/UFPE; ⁴ Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)/UFPE, Recife-PE, Brasil.

* Autor para correspondência:

Dr. Nicácio Henrique da Silva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas

Laboratório de Química de Produtos Naturais

Avenida Professor Moraes Rego s/n,

Cidade Universitária 50670-420,

Recife, PE – Brasil

Telefone: 55 (81) 2126-8540

Fax: 55 (81) 3126-8570.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi preparar complexos de inclusão com o ácido barbático e a 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (BAR-HP- γ -CD), incorporar em gel tópico e avaliar a contração de feridas cutâneas induzidas em ratos. O diagrama de solubilidade de fases foi obtido a partir da concentração do ácido barbático em função da concentração de HP- γ -CD. O ácido barbático e o complexo de inclusão (BAR-HP- γ -CD), em suspensão, foi liofilizado e incorporado em formulações semi-sólidas tipo gel de natrosol. Estudos *in vivo* do processo de reparo tecidual foi realizados em ratos machos Wistar. O diagrama de solubilidade de fases resultou em uma curva do tipo linear, onde se comprovou que o ácido barbático em presença de 100 mM de HP- γ -CD aumenta 45 vezes sua solubilidade em água. O complexo de inclusão preparado apresentou um rendimento de 98,03% e um teor de 95,04% \pm 0,021% do ácido barbático. A evolução das feridas produzidas nos animais durante o tratamento demonstrou a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e proliferação vascular, culminando com uma evidente reepitelização e colagenização. O ácido barbático é capaz de auxiliar no processo de regeneração tecidual.

Palavras-chave: liquens, ácido barbático; 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrinas; cicatrização.

Abstract

The objective of this study was to prepare inclusion complexes between the acid barbatic and 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (BAR-HP- γ -CD), incorporate into topical gel and to evaluate the contraction induced skin wounds in rats. The solubility phase diagram was obtained from the barbatic acid concentration depending on the concentration of HP- γ -CD. The inclusion complex was prepared by lyophilization. The barbatic acid in suspension and inclusion complexes (BAR-HP- γ -CD) was incorporated in such semisolid formulations like gel natrosol. In vivo studies of the tissue repair process was performed in male Wistar rats. The solubility phase diagram resulted in a curve of the linear type, which proved that barbatic acid in the presence of 100 mM of HP- γ -CD increases 45 times its solubility in water. The inclusion complex prepared showed a yield of 98.03% and a content of 95.04% \pm 0.021% of acid barbatic. The evolution of the wounds produced in the animals during treatment showed the presence of crust, increased fibroblast proliferation and vascular proliferation, culminating with an evident re-epithelialization and collagen. The barbatic acid is able to assist in the process of tissue regeneration.

Keywords: lichens, barbatic acid, 2-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin; healing.

1. Introdução

A interação do líquen com o meio ambiente depende, sobretudo, do microclima da área e da pureza do ar, visto que a umidade atmosférica é fator crucial para sua sobrevivência. Recentes pesquisas revelam que os metabólitos secundários específicos de líquens exibem as mais variadas atividades tais como: analgésicos e antipiréticos (PIOVANO *et al.*, 2002).

Foram utilizados alguns procedimentos para a utilização do líquen assim como a obtenção do BAR para o estudo descrito. Dentre eles, foi utilizado o método de HIGUCHI & CONNORS (1965), para o estudo de solubilidade de fases, que foi realizado, colocando 3mg do BAR adicionada em uma solução aquosa contendo concentrações diferentes de HP- γ -CD, submetida a vigorosa agitação e temperatura de 25°C, por 72 horas, seguindo por processos que serão descritos adiante.

A cicatrização das feridas é processo altamente complexo com várias fases. Inúmeras substâncias têm sido usadas desde os tempos remotos para estimulá-la. Nestes últimos anos a descoberta de novos agentes cicatrizantes tem recebido muita atenção por parte dos profissionais de saúde, campo este que vem se destacando com o crescente aumento de desenvolvimento de formulações de uso tópico (KINCAID, 2002; HELMKE, 2004). Uma vez que, a aplicação destas preparações pode produzir resultados positivos em tratamentos de fissuras anais, úlceras venosas e diabéticas e cicatrizes hipertróficas (HELMKE, 2004).

O ácido barbático é um depsídeo presente na *Cladonia salzmannii* com fórmula química (C₁₉H₂₀O₇), formado por dois anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster e em um dos anéis, apresenta um grupo carboxílico (HUNECK e YOSHIMURA, 1996; HONDA e VILEGAS, 1998). Têm uma massa molecular de 360 Kd e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em éter, acetona e clorofórmio. Seus cristais possuem cor amarelo-pálido em forma de pequenas agulhas, com ponto de fusão de 187°C (EDWARDS *et al.*, 2003). Dentre as atividades biológicas citados na literatura, destacam-se os efeitos antiviral, antibiótico, antifúngico (PERRY *et al.*, 1999; PIOVANO *et al.*, 2002), inibidor do crescimento de plantas superiores e inibidor enzimático (HUNECK & YOSHIMURA, 1996). Todavia seu uso em estudos farmacológicos ainda é limitado devido sua baixa solubilidade.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos conhecidos por sua habilidade de incorporar moléculas apolares, ou parte delas, dentro de sua cavidade hidrofóbica, constituindo uma

verdadeira incorporação molecular. O complexo obtido exibe novas características físico-químicas quando comparado às moléculas livres; com a complexação pode ser visualizados uma melhoria na estabilidade, maior hidrossolubilidade e biodisponibilidade, bem como uma redução dos efeitos indesejáveis de compostos lipofílicos (DEL VALLE, 2004; DEVARAKONDA, *et al.* 2005).

O desenvolvimento de formulações semi-sólidas transdérmicas é uma estratégia interessante para o transporte de diversas classes de fármacos, tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, representando uma alternativa para superar aspectos relacionados às características farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos medicamentos quando utilizados por outras vias (TEICHMANN *et al.*, 2007).

Os objetivos deste trabalho consistem em preparar complexos de inclusão contendo ácido barbático: 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina no intuito de melhorar sua solubilidade e conseqüentemente incorporar em formulações semi-sólidas tipo gel para avaliar sua ação no tratamento de feridas cutâneas induzidas em ratos Wistar.

2. Materiais e Métodos

Coleta e armazenamento do material liquênico

Cerca de 450g de *Cladonia salzmannii* Nyl, foram coletados no município de Alhandra, Estado da Paraíba, no mês de Abril de 2010. O líquen foi acondicionado em sacos de papel e conservado à temperatura ambiente (28 ± 3 °C) até a realização dos testes. A espécie foi identificada através do estudo taxonômico da mesma que foi realizada a partir dos caracteres morfológicos e químicos do talo, no laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco. Uma exsicata foi depositada no Herbário da UFPE, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco.

Preparação dos extratos orgânicos e extração/purificação de ácido barbático

Extração por esgotamento a frio

Amostra de 20g do talo *in natura* de *C. salzmannii* Nyl limpo, foi triturada em almofariz e colocado em 1(um) erlenmeyer e, a partir do solvente orgânico, éter etílico (150ml), foi submetido a duas extrações sucessivas a frio em agitador mecânico por 1h. Após 24h em repouso no refrigerador, o extrato foi filtrado, concentrado em banho-maria em rota evaporador e mantido em dessecador, sendo posteriormente utilizado nos ensaios biológicos.

O resíduo foi submetido subsequentemente a extrações com clorofórmio e acetona, de forma similar ao descrito com o extrato etéreo (PEREIRA *et al.*, 1996).

Isolamento e purificação do ácido barbático

O talo *in natura* de *C. salzmannii* Nyl apresenta como composto principal o ácido barbático que foi isolado e purificado a partir do extrato etéreo, obtido por extração a quente em Soxhlet conforme metodologia Ashina & Shibata (1954). Este após filtração e concentração até a secura, foi lavado em funil de fundo poroso G-4, com clorofórmio quatro vezes de acordo com a metodologia citada acima e modificada por Pereira, 1998.

Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os extratos orgânicos do talo *in natura* *C. salzmannii* NYL foram analisados através cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se a metodologia descrita por Culberson (1972). Foram utilizados como padrões os ácidos barbático e úsnico (Merck).

As amostras foram diluídas em seus respectivos solventes, e aplicadas em placas de sílica Gel 60 F254+366 Merk de 20 x 20 cm, e eluídos de forma ascendente no sistema de solvente A (n-hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 5:4:1,v/v/v). Após evaporação dos solventes, as bandas foram visualizadas sob luz UV curta (256 nm) e longa (366 nm). Posteriormente as placas foram borrifadas com ácido sulfúrico a 10%, e aquecidas a 60°C por 15 min., para que fossem evidenciadas as bandas por reação de coloração, segundo Culberson (1972). Os resultados foram avaliados mediante cálculo dos valores de RF, que foram comparados ao padrão utilizado (ácido barbático).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos orgânicos e o ácido barbático purificado de *C. salzmannii* NYL foram analisados quantitativamente através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os extratos orgânicos e o ácido barbático purificado foram dissolvidos na fase móvel (metanol/água/ácido acético, 80:19;5:0,5 v/v/v) a 0,1 mg/mL para a substância pura e 1,0 mg/mL para os extratos os mesmos foram filtrados em filtros millipore (diâmetro do poro-0,45µm) e previamente degaseificado. As análises foram realizadas em cromatógrafo em líquido HITACHI acoplado a um detector de UV a 254 nm, sob um fluxo de 1,0 mL. min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, atenuação de 0,04 e temperatura ambiente de 25±3°C. Foi utilizada coluna de fase reversa C18, com desenvolvimento isocrático de análise, segundo

metodologia de Legaz & Vicente (1983). Foi utilizado como padrão ácido barbático e os resultados foram avaliados mediante área dos picos e tempo de retenção das substâncias na coluna.

Estudo de solubilidade de fases do ácido barbático (BAR) e 2-hidropropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD)

O estudo da solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método de Higuchi e Connors (1965). O ácido barbático (3 mg) foi colocado em microtubo contendo 1 mL de água deionizada ou soluções aquosas de HP- γ -CD em diferentes concentrações (0,0; 20; 40; 60; 80 e 100 mM), sendo submetidos a uma agitação vigorosa na temperatura de 25°C. Após 72 horas de agitação, uma alíquota da mistura foi retirada, centrifugada (15.000 rpm/15min), foi determinada por espectrofotometria UV em 275 nm (LIRA *et al.*, 2009). O diagrama de solubilidade de fases foi obtido a partir da concentração do ácido barbático em função da concentração de HP- γ -CD. Os dados foram analisados por regressão linear e a equação da reta ajustada $[BAR] = a [HP-\gamma-CD] + b$, onde a e b correspondem à inclinação e a ordenada na origem, respectivamente, foi utilizada para o cálculo da constante de associação ($K_{1:1}$), considerando uma relação molar na formação do complexo BAR: HP- γ -CD e a solubilidade do ácido barbático em água na ausência da HP- γ -CD (S_0), pela seguinte fórmula:

$$K_{1:1} = a/([BAR] - S_0) (1 - a)$$

A eficiência de complexação (CE) do ácido barbático foi determinada a partir de dados do estudo de solubilidade de fases de acordo com a equação abaixo (LOFTSSON; BREWSTER, 2005):

$$CE = a/(1-a)$$

Preparação do complexo de inclusão ácido barbático: 2-hidropropil- γ -ciclodextrina (BAR:HP- γ -CD)

Os complexos de inclusão BAR: HP- γ -CD foram obtidos pela técnica de *freeze-drying* (LIRA *et al.*, 2009). Para este procedimento, 88,48 mg de 2-hidropropil- γ -ciclodextrina (HP- γ -CD) foi inicialmente solubilizada em água e o ácido barbático (20 mg) posteriormente adicionado o ácido BAR. O complexo ácido barbático e a 2-hidropropil- γ -ciclodextrina em

solução permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente até atingir condições de equilíbrio (72 h), sendo em seguida congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o processo de liofilização. Os complexos liofilizados foram acondicionados em dessecador à temperatura ambiente. O rendimento do BAR presente nos complexos de inclusão foi realizado através da espectrofotometria UV. Uma curva padrão do ácido barbático (0,5 a 8 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada com objetivo de determinar as concentrações das amostras analisadas.

Preparação das formulações semi-sólidas tipo gel natrosol

Foi preparada uma base geleificante de característica hidrofílica empregando-se como polímero o hidroxietilcelulose (Natrosol®250) comumente empregado na farmacotécnica de formas farmacêuticas semi-solvidas, na qual foi incorporado o ácido barbático na forma livre e complexado a 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina (BAR-HP- γ -CD). Para o preparo da base, foram pesados separadamente o natrosol, propilenoglicol, propilparabeno (Nipazol®), metil parabeno (Nipagin®) e água destilada q.s.p.

O Nipagin® e Nipazol® foram solubilizados no propilenoglicol com auxílio de banho ultrasônico e adicionados a água destilada sob agitação e aquecida a $60^{\circ} \pm 2,0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida o natrosol foi adicionado em pequenas porções à mistura sob agitação até tornar-se completamente geleificada. Na preparação dos géis contendo o ácido barbático na forma livre este foi solubilizado em propilenoglicol e adicionado a mistura antes do Natrosol®. Na preparação dos géis contendo complexo de inclusão (BAR-HP- γ -CD), este foi solubilizado em água e adicionado durante o processo de geleificação. Obtida a dissolução, a mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 2 horas. Todos os componentes e as proporções empregados na formulação estão descritos na Tabela 1.

A quantificação do BAR presente nas formulações semi-sólidas tipo gel foi através da espectrofotometria UV. Uma alíquota (1g) da formulação tipo gel obtida foi adicionada a um balão volumétrico (10 ml) contendo metanol, permanecendo em agitação constante (banho ultrasônico), até dissolver os componentes da formulação. Uma curva padrão do ácido barbático (0,5 a 8 $\mu\text{g/mL}$) foi realizada com objetivo de determinar as concentrações das amostras analisadas. Uma alíquota do gel base (placebo), também foi submetida ao mesmo procedimento, objetivando analisar a presença de interferentes na leitura das amostras em espectrofotometria UV.

Tabela 1. Formulação da base do gel de natrosol (20g).

COMPONENTES	PESO	%
HEC (Natrosol®)	0,2g	1
Nipargim®	0,004g	0,02
Niparzol®	0,036g	0,18
PEG	1g	5
H₂O	18,64g	93,2
Ácido barbático	0,120 g	0,6

Estudo do reparo tecidual em lesões induzidas em ratos machos Wistar

Para os ensaios *in vivo* de reparo tecidual foram utilizados 27 ratos machos Wistar pesando entre 200 a 300g. Todos estes animais foram procedentes do biotério do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acondicionados à temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e aclimatizados para um ciclo de 12h: 12h claro: escuro e alimentados com ração e água *ad libitum*. Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da UFPE, Processo n 23076.007284/2009-23.

Os animais foram marcados e separados aleatoriamente em três grupos experimentais (n=27): A= animais que receberam o tratamento com o gel base (placebo); B= animais que receberam o tratamento com o gel contendo o BAR em suspensão e C= animais que receberam o tratamento com o gel contendo o complexo de inclusão (BAR:HP- γ -CD). Os grupos experimentais (n=9) foram subdivididos em três subgrupos (n=3) (A1; B1 e C1). Os subgrupos (n=3) foram acondicionados em gaiolas plásticas apresentando dimensões de 60 x 50 x 22 cm.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina/xilazina por via intramuscular na dose de 15 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Cada animal foi pesado, e disposto em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e submetidos à depilação por tração manual. Com auxílio de uma *punch* metálico

foi incisado o fragmento cutâneo de 7 mm³ de diâmetro, no centro da área depilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal (PRATA *et al.*, 1988). A hemostasia foi realizada com leve compressão de uma gaze sobre o leito cirúrgico, por cinco minutos. As aplicações foram realizadas imediatamente após a cirurgia, período pós-operatório (PO), utilizando cinco aplicações por semana, uma vez ao dia e no mesmo horário, dando um intervalo de dois dias (SEGUNDO *et al.*, 2007).

Todos os animais foram examinados diariamente quanto as suas condições físicas (mobilidade, disenteria, ritmia) e avaliando também as feridas, observando a presença de crosta, secreção ou necrose. As feridas foram medidas diariamente com o auxílio de um paquímetro digital. Para o cálculo da área das feridas, foi realizada a medição de suas bordas no momento da biópsia, observando-se o maior e menor diâmetro. A partir desses elementos, a área foi calculada, utilizando-se a equação matemática recomendada por Prata *et al.*, (1988), $A = \pi \cdot R \cdot r$, onde A corresponde a área da ferida; “ π ” o pi que é um valor matemático e que foi utilizado até a quarta casa depois da vírgula, ou seja, 3,1415; R o raio maior da ferida e r o raio menor da ferida. Neste experimento R e r corresponderam aos raios das feridas no sentido crânio-caudal e látero-lateral, respectivamente.

Em tempos pré-determinados os animais foram sacrificados por eutanásia com overdose de anestésico (urethane 1,25 g/kg), em seguida as áreas das lesões foram removidas e conservadas em solução de formaldeído tamponada a 10% e posteriormente submetidas à desidratação e diafanização. Os espécimes foram inclusos em blocos de parafina e submetidos à micrótomia e em seguida coradas com Hematoxilina – Eosina (HE) para avaliação histológica do processo de cicatrização dos cortes de tecido e com Picrosírius - Hematoxilina (PSH) para avaliar a presença de fibras colágenas existentes nos locais de fibrose do interstício.

Foi realizada análise morfométrica do tecido, onde foram anotados os eventos de reação inflamatória, colagenização e repitelização, contabilizando a presença de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão e testes com análise de variância (ANOVA). O teste T Student foi empregado para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais. $P > 0.05$.

3. Resultados e Discussão

Cromatografia em camada delgada (CCD):

Os extratos orgânicos etéreo, clorofórmio e acetona obtidos de *Cladonia salzmännii* Nyl e os padrões ácido barbático e atranorina, foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD) (Figura 1A).

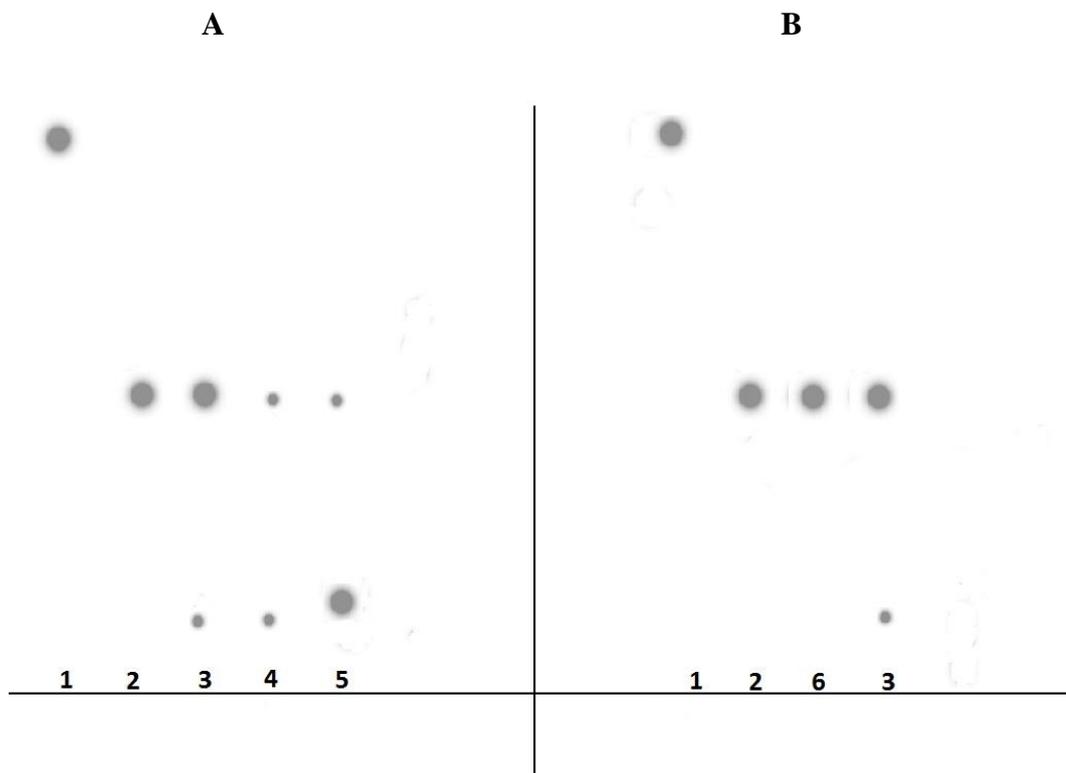


Figura 1A. Cromatograma (CCD) das amostras orgânicas eluídas em seus respectivos solventes, e aplicadas em placas de sílica Gel 60 F₂₅₄₊₃₆₆ Merck de 20 x 20 cm, e desenvolvida de forma ascendente no sistema de solvente A (n-hexano/éter dietílico/ácido fórmico, 5:4:1 v/v/v). Legenda: 1- Padrão de atranorina; 2- Padrão de ácido barbático; 3- Extrato etéreo; 4- Extrato clorofórmio; 5- Extrato acetônico; 6- Ácido barbático purificado.

Na análise em (CCD) dos extratos orgânicos observam-se a presença do ácido barbático em todos os extratos, porém não foi detectada a presença de atranorina nos mesmos (Figura 1A). O ácido barbático purificado a partir do extrato etéreo contém o mesmo valor de R_f do ácido barbático padrão quando comparado cromatograficamente em (CCD) (Culberson 1972). (Figura 1B).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O ácido barbático purificado foi identificado quantitativamente através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 2), cuja banda e tempo de retenção são compatíveis com o ácido barbático padrão (Legaz e Vicente, 1983).

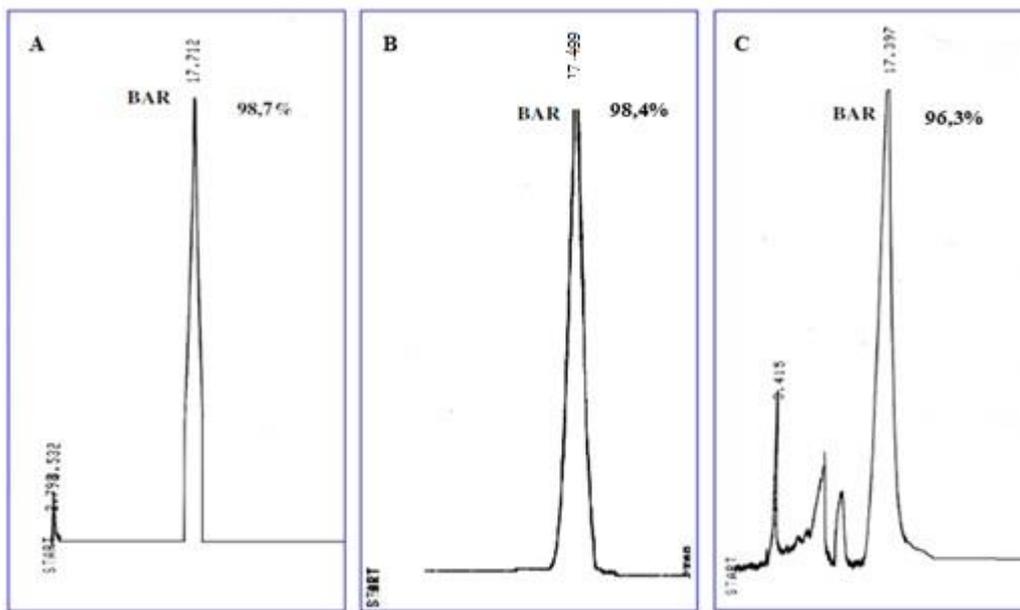


Figura 2. Cromatograma (CLAE), demonstrando a presença do ácido barbático purificado (BAR) no extrato orgânico e seu percentual de pureza em relação ao padrão. A - Padrão, B – Ácido barbático purificado, C - Extrato etéreo a frio.

Diagrama de solubilidade de fases da 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina

A constante de associação obtida do complexo de inclusão BAR: HP- γ -CD foi de 419 M^{-1} , confirmando a interação entre o fármaco e a ciclodextrina, sugerindo um coeficiente de encapsulação de 0,002 e uma razão molar de 1:453. Estes resultados indicam que o ácido barbático em presença de 100 mM de HP- γ -CD aumenta aproximadamente 45 vezes sua solubilidade em água (Figura 3). Este aumento de solubilidade também foi comprovado pela literatura em estudos realizados com ciclodextrinas como agente solubilizante para metabólitos secundários liquênicos tais como: ácido difractáico, atranorina, ácido fumarprotocetrárico utilizando a HP- β -CD e o ácido úsnico utilizando a β -ciclodextrina (KRISTMUNDSDÓTTIR *et al.*, 2005; LIRA *et al.*, 2009).

De acordo com a literatura a análise do diagrama de solubilidade de fases tem sido o requisito preliminar para o desenvolvimento de complexos de inclusão com ciclodextrinas porque ele permite avaliar a afinidade entre o fármaco e as ciclodextrinas. Através do diagrama é possível determinar a razão molar que o fármaco pode se associar com as ciclodextrinas (PATEL & PATEL, 2008). O diagrama de solubilidade de fases resultou em uma curva do tipo A demonstrando uma relação linear entre a concentração do ácido barbático e a concentração de HP- γ -CD em solução aquosa a 25°C, apresentando a seguinte equação: $[BAR]_{\text{água}} = 0,0022[BAR] + 0,0055$, $r = 0,9993$.

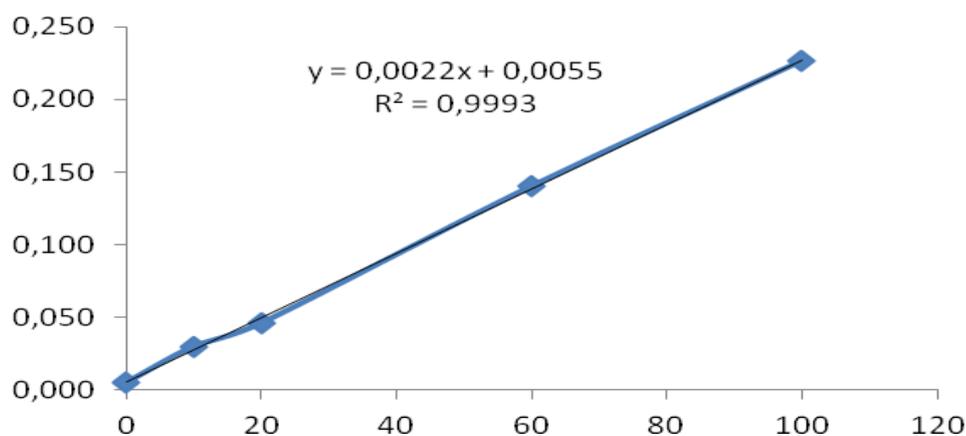


Figura 3. Diagrama de solubilidade de fases do ácido barbático em função da concentração de HP- γ -CD em água a 25°C.

Os complexos de inclusão BAR: HP- γ -CD (figura 4) obtidos pelo método de liofilização demonstraram um rendimento aproximado de $98,03 \pm 0,08\%$. O teor do ácido barbático nos complexos de inclusão (BAR: HP- γ -CD) por espectrofotometria UV ($\lambda=275$ nm), utilizando a curva padrão nas concentrações ($0,5$ a $8 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$), absorvância = $0,0599$. $[BAR] + 0,0008$, $r=0,9999$, foi de $95,04 \pm 0,21 \%$.



Figura 4. Complexo de inclusão BAR: HP- γ -CD liofilizado.

As formulações semi-sólidas géis de natrosol apresentaram pH de $7,4 \pm 0,2$, enquanto as formulações tipo gel contendo ácido barbático e complexos de inclusão apresentaram um pH de $7,0 \pm 0,5$ e $7,2 \pm 0,8$, respectivamente (Figura 5). Observou-se que o rendimento das formulações tipo gel natrosol contendo o ácido barbático e complexo de inclusão BAR: HP- γ -CD foi 95% e 98,87% respectivamente. Sendo assim observa-se que na preparação das formulações semi-sólidas tipo gel natrosol a utilização complexo de inclusão permite melhor hidrosolubilidade do ácido barbático, demonstrando assim, um apreciável rendimento do fármaco na preparação de formulações tópicas. Portanto, o controle de pH também é essencial, pelo fato de evitar reações indesejáveis da pele ao produto, como irritação, vermelhidão, prurido (LEONARDI; GASPAR; CAMPOS 2002).

As formulações semi-sólidas de natrosol contendo ácido barbático mantiveram aparente espalhabilidade durante as análises, quesito que corresponde a uma das características essenciais das formas farmacêuticas destinadas à aplicação tópica (MARTINS; CORTEZ; FELIPE 2008). Estudos de desenvolvimento de formulações de uso tópico com óleo essencial de cravo-da-índia, não apresentaram boa compatibilidade, não sendo recomendado, portanto, como base para a incorporação (MARTINS; CORTEZ; FELIPE 2008).

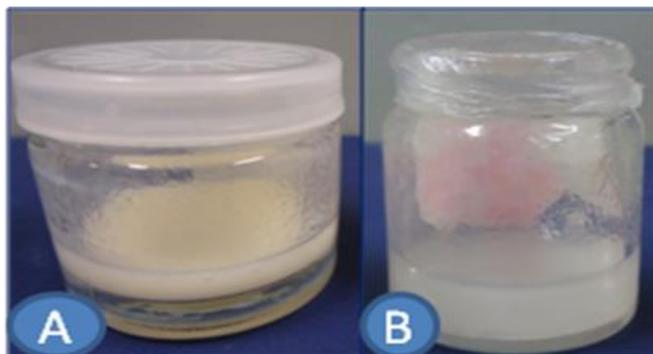


Figura 5. Formulações semi-sólidas tipo géis de natrosol contendo complexos de inclusão BAR: HP- γ -CD (A) e ácido barbático (B).

As avaliações clínicas diárias demonstraram adequada recuperação, presença de atividade física e disposição para alimentar-se no grupo controle e grupos tratados. Durante todo o experimento não houve formação de exsudato e também não foram visualizadas presença de infecção em todos os grupos de animais analisados.

Avaliando a evolução da área da ferida entre os grupos experimentais, observou-se que a área da ferida diminuiu gradativamente com o decorrer do tempo. A média e o desvio padrão para cada grupo estão representados na figura 6. De acordo com figura 6 as áreas das feridas diminuíram progressivamente de maneira significativa nos grupos estudados. Entretanto quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que as médias das áreas do grupo C (formulação gel contendo BAR:HP- γ -CD), apresentaram-se reduzidas quando comparadas as obtidas no grupo A (gel base). Também não foram visualizadas diferenças entre as áreas do grupo A (gel base) e o grupo B (formulação tipo gel contendo BAR em suspensão). Estes dados indicam que a formulação gel contendo BAR: HP- γ -CD apresentou uma relevante ação sobre o reparo tecidual dos animais tratados acelerando, portanto o processo de reparo tecidual nos animais tratados, com relevante redução no 11º dia PO.

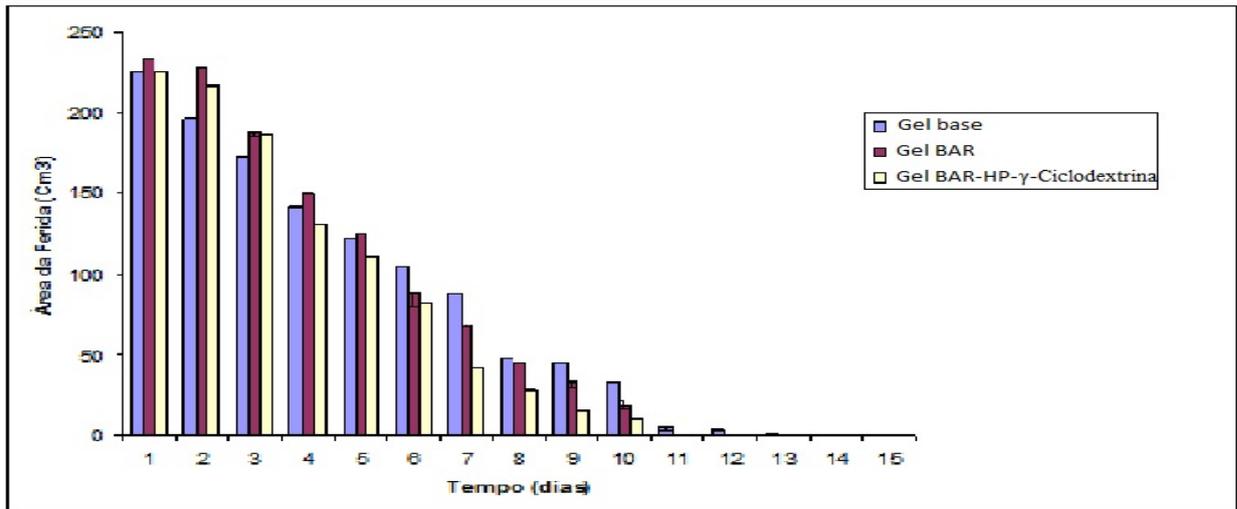


Figura 6. Áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais tratados: (Gel base) = gel natrosol base; (Gel: BAR) = gel natrosol contendo ácido barbático e (Gel: BAR: HP- γ -CD) = gel natrosol contendo complexos de inclusão (n=27).

Analisando macroscopicamente a evolução das feridas cutâneas produzidas nos animais experimentais, não foi visualizada a presença de exsudação até o 14º dia (A₃, B₃, C₃) de pós-operatório em todos os grupos experimentais (Figura 7A, 7B e 7C). Nos grupos experimentais A (controle – animais tratados com gel base) e B (animais tratados com gel: BAR) foram observados a formação de crosta fibrino-leucocitária até o 14º dia (A_{1,2,3}, B_{1,2,3}, C_{1,2,3}) de pós-operatório (Figura 7A e 7B). Todavia, o grupo C (animais tratados com Gel: BAR: HP- γ -CD) desenvolveram crostas fibrino-leucocitárias em maior proporção a partir do 3º dia (C₁, C₂) PO, quando comparada aos demais grupos, evoluindo a partir do 14º dia PO para uma rápida reepitelização do local da lesão. Todavia aos 21º dia (C₄) PO, não foi visualizado sinais de cicatrização, pois o tecido demonstrou completo reparo e intenso crescimento de pelos no local da lesão (figura 7C).

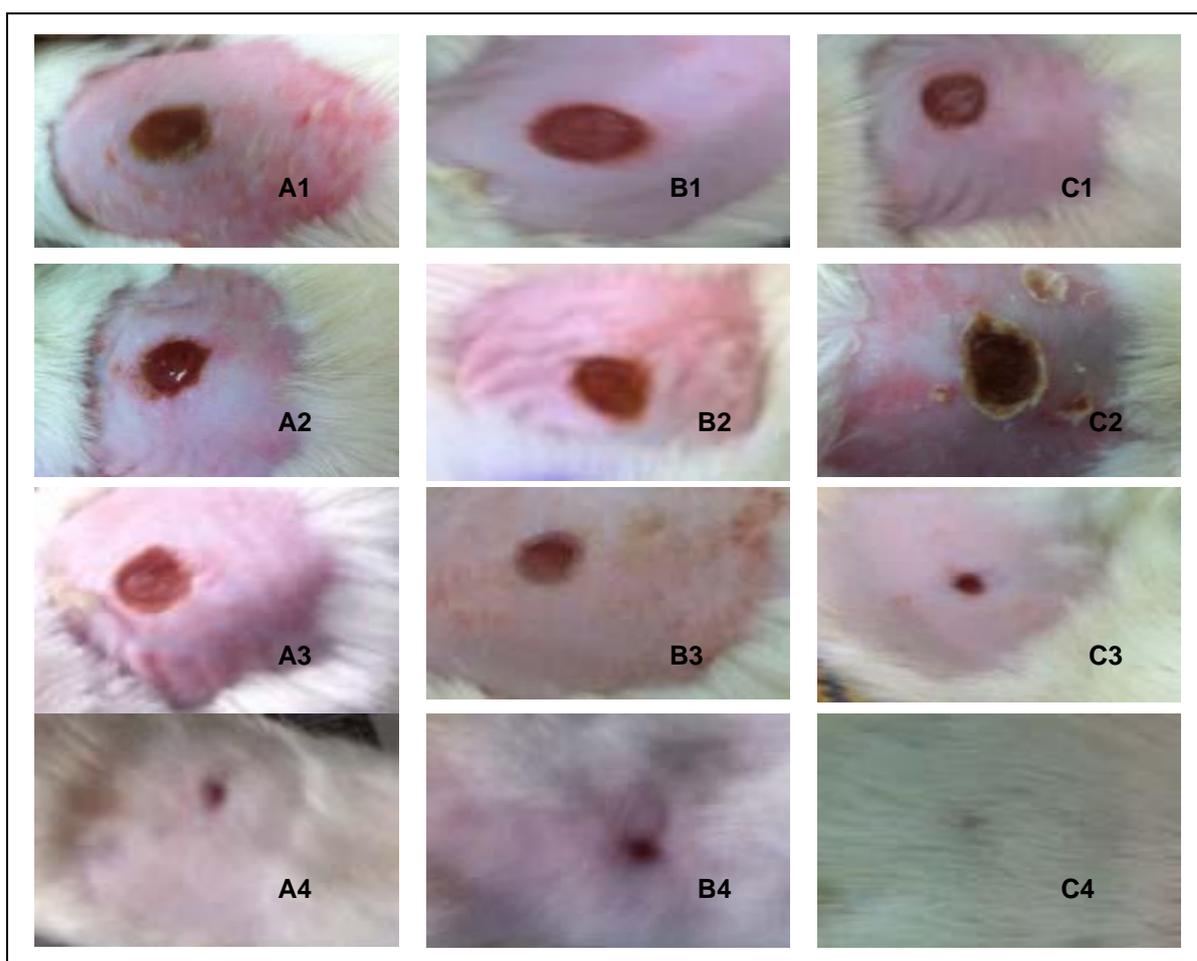


Figura 7. Ferida cirúrgica após o período operatório (PO) em intervalos de tempos pré-determinados: (1) = 3dias PO; (2) = 7dias PO; (3) = 14 dias PO e (4) = 21dias PO. Grupos experimentais: A= Gel base; B= Gel: BAR e C= Gel: BAR: HP- γ -CD.

As avaliações microscópicas dos fragmentos de pele retiradas dos três grupos experimentais demonstraram diferenças qualitativas detectáveis entre as variáveis analisadas. Para a análise histológica foram utilizados dois tipos de coloração: Hematoxilina-Eosina (H.E) e Picosírius (PS). A primeira para observação dos elementos celulares e esta última, para o estudo do colágeno.

As análises microscópicas demonstraram a presença de crosta, tecido de granulação e reduzida proliferação fibroblástica, poucos vasos esparsamente situados no campo óptico, infiltrado inflamatório e conseqüente reepitelização, em todos os grupos experimentais.

Estudos microscópicos de todos os animais dos grupos experimentais estão demonstrados nas figuras 8 e 9 respectivamente. Como se pode perceber a presença de uma

crosta fibrino-leucocitária sobre a superfície da ferida até o 14º dia PO em todos os animais experimentais.

A partir do 7º ao 14º dia PO, o grupo controle (Gel base), demonstrou a presença de crosta, tecido de granulação e reduzida proliferação fibroblástica, poucos vasos esparsamente situados no campo óptico, infiltrado inflamatório e conseqüente reepitelização (Figuras 8A e 9A).

No grupo de animais tratados com Gel: BAR observa-se uma moderada crosta fibrino-leucocitária, tecido de granulação, intensa proliferação vascular e relevante presença de células inflamatórias e fibroblastos a partir do 7º dia PO (Figura 8B), e uma evidente colagenização e repitelização a partir do 14º dia PO (figuras 9C).

Por outro lado o grupo de animais tratados com Gel: BAR: HP- γ -CD, onde foi evidenciada macroscopicamente uma acentuada crosta fibrino-leucocitária a partir do 7º dia PO, observou-se uma marcante presença de tecido de granulação e discreta proliferação vascular, intensa presença de células inflamatórias (figura 8C), e uma acentuada proliferação de fibroblastos, colagenização culminando com uma rápida repitelização ao 14º dia PO (figura 9A). Segundo a literatura, uma ferida não exudativa acompanhada com formação de crosta favorece o processo de cicatrização (OLIVEIRA, 1992). Sabe-se, portanto que o fibroblasto, célula fundamental no processo de reparação do conjuntivo, é responsável pela síntese do material intercelular do tecido de granulação (CONTRAN; KUMAR; COLLINS 2001). Somente na presença dos fibroblastos é que ocorre a diferenciação epidermal e a deposição de proteína laminina, colágeno tipo IV e VII, elementos essenciais no processo cicatricial (COUTINHO *et al.*, 2004). Segundo Ribeiro; Leite e Dantas-Barros (2005), a formação de uma crosta é considerada um maior sinal positivo no reparo sendo comprovado histologicamente com maior formação de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibras colágenas.

Dados da literatura também comprovam que a vascularização também pode contribuir com a recuperação funcional do órgão, tornando-se na recuperação do “espaço morto” localizado entre as duas bordas da ferida (EL-GHALBZOURI, 2002; LAZAROV, L; STRATIEV, 1993). Este fato foi evidenciado nos grupos tratados com Gel: BAR e Gel: BAR: HP- γ -CD. Relatos da literatura afirmam que a reepitelização é favorecida quando o ambiente torna-se úmido, onde o movimento dos queratinócitos migrantes é determinado pelo conteúdo de água no leito da ferida. Feridas abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente

do que as ocluídas. A crosta, portanto, favorece o meio ocluído e úmido contribuindo assim uma acentuada reepitelização (WINTER, 1962).

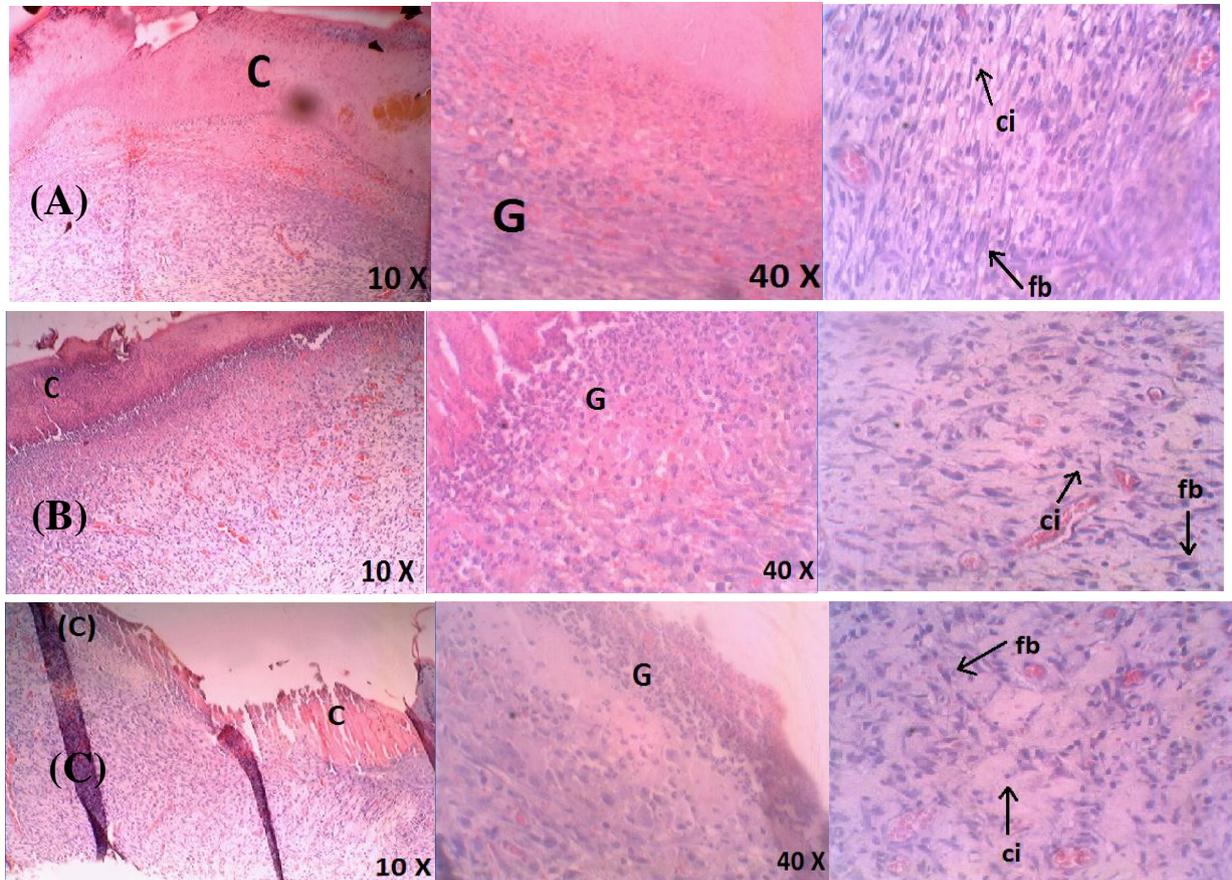


Figura 8. Análises histopatológicas dos cortes transversais obtidos a partir da ferida cirúrgica no 7º dia PO. Grupos experimentais: (A) = Controle (Gel base); (B) = Gel: BAR e (C) = Gel: BAR: HP- γ -CD. Legenda: Crosta fibrino-leucocitária = C, Tecido de granulação = G, Fibroblasto =fb e célula inflamatória = ci, corados com Hematoxilina-Eosina (H.E.).

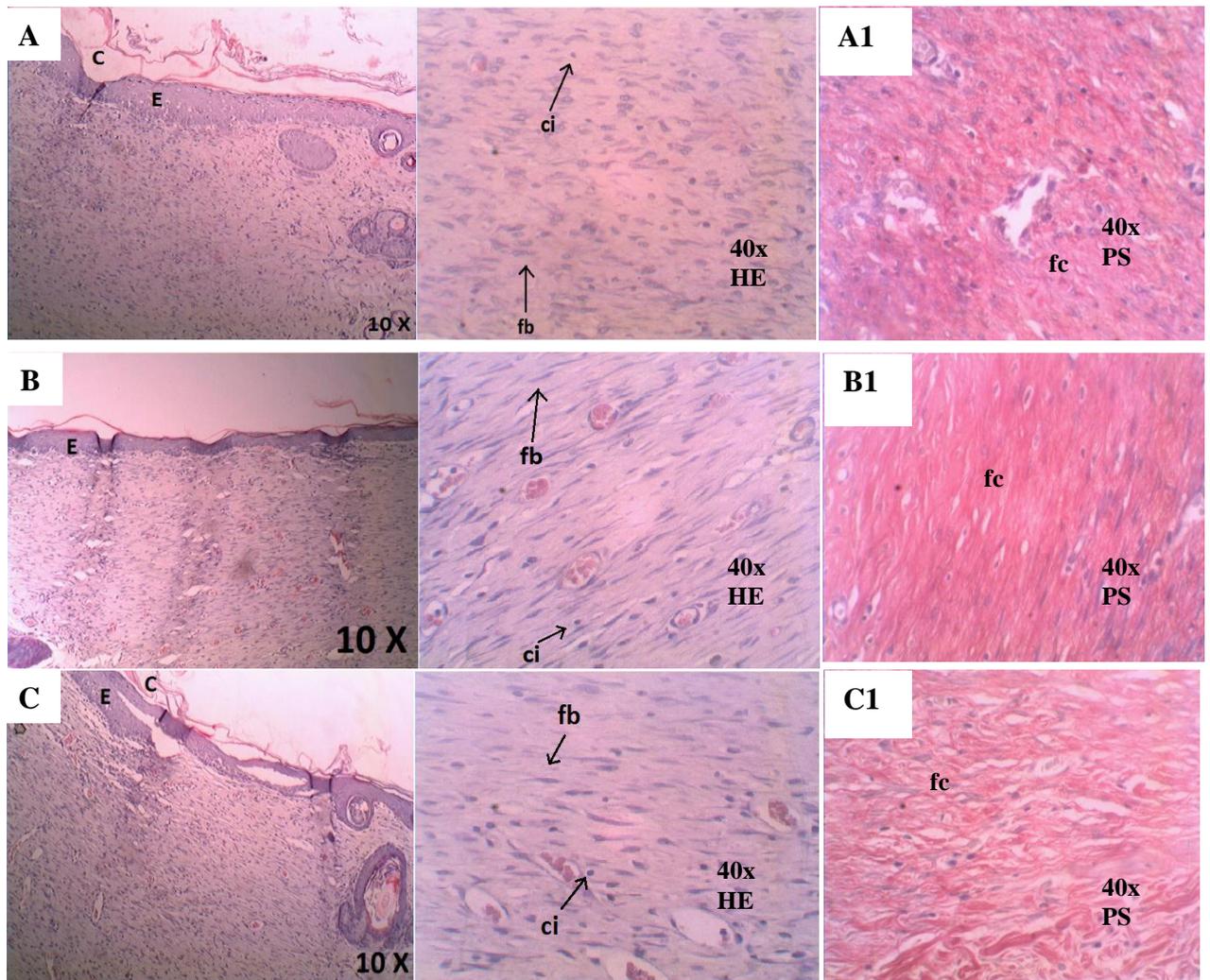


Figura 9. Análises histopatológicas dos cortes transversais obtidos a partir da ferida cirúrgica no 14º dia PO. Grupos experimentais: A = Controle (Gel base); B = Gel: BAR e C = Gel: BAR: HP- γ -CD. Legenda: Crosta fibrino-leucocitária (C), Reepitelização (E), Fibroblasto (fb), célula inflamatória (ci) e fibras colágenas (fc). Corados com H.E.(Hematoxilina e Eosina) e PS (Picrosírius).

Análises morfométricas de espécimes obtidas a partir da ferida cirúrgica dos animais experimentais foram realizadas no intuito de se obter subsídios que realmente comprovem estes achados, como também estes dados possam confirmar, portanto a aparente aceleração no reparo tecidual visualizada nos animais tratados com gel: BAR: HP- γ -CD.

O processo de reparação tecidual apresenta várias fases com características próprias, que se desenvolvem concomitantemente. No início da fase inflamatória do processo de

cicatrização há aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de plasma, hemácias, plaquetas e leucócitos, destacando-se os neutrófilos, monócitos e macrófagos (MARTINS *et al.*, 2006).

As diferenças entre grupos tratados com Gel base e Gel: BAR foi visível, principalmente, em relação à quantidade de células inflamatórias e fibroblastos. A partir do 3º dia PO foram visualizados perceptível diferença significativa nos animais tratados com Gel: BAR, quando comparado ao grupo controle, quanto à presença de células inflamatórias e fibroblastos. Todavia, não foram evidenciadas diferenças significativas, quando foi analisado o desenvolvimento da vascularização do grupo tratado com Gel: BAR em relação ao grupo controle.

Sabe-se, que na fase da fibroplasia que ocorre após 48 horas da lesão, os fibroblastos se multiplicam e produzem o colágeno. Há também nesta fase, intensa proliferação endotelial, tendo como consequência a formação de tecido de granulação (GARROS *et al.*, 2006).

No 14º dia PO as células polimorfonucleares e fibroblastos apresentaram resultados significativos favorecendo a cicatrização no grupo tratado com Gel: BAR, havendo aumento considerável do primeiro e do segundo respectivamente culminando no reparo tecidual ao 21º dia PO.

Analisando os animais tratados com a formulação gel: BAR: HP- γ -CD observou-se uma redução significativa na inflamação aguda, avaliada pela baixa presença de células polimorfonucleares (figura 9A). Também, observou-se uma reduzida vascularização durante todo período PO analisado quando comparado ao grupo controle (figura 9B). Por outro lado, foi visualizada uma intensa proliferação de fibroblastos (figura 9C). Estas análises demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,01$), tratado com gel: BAR: HP- γ -CD quando comparado aos grupos tratados com Gel base e Gel: BAR ($p>0,05$). Sabe-se que os fibroblastos depositam-se e passam a multiplicar-se e a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial. Estes são células do tecido conectivo que sintetizam e secretam colágenos e produzem fatores de crescimento especializados (EL-GHALBZOURI, 2002).

O uso tópico do ácido barbático incorporado em gel associa-se a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e proliferação vascular e evidente reepitelização e colagenização sugerindo efeito benéfico no processo de cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos (Figura 10). É importante salientar que o ácido barbático complexado a 2-

hidroxipropil- γ -ciclodextrina aumentou sua hidrosolubilidade e viabilizou sua eficácia terapêutica quando incorporado em formulação semi-sólida tipo gel, favorecendo, portanto o processo cicatrização de feridas cutâneas experimentais.

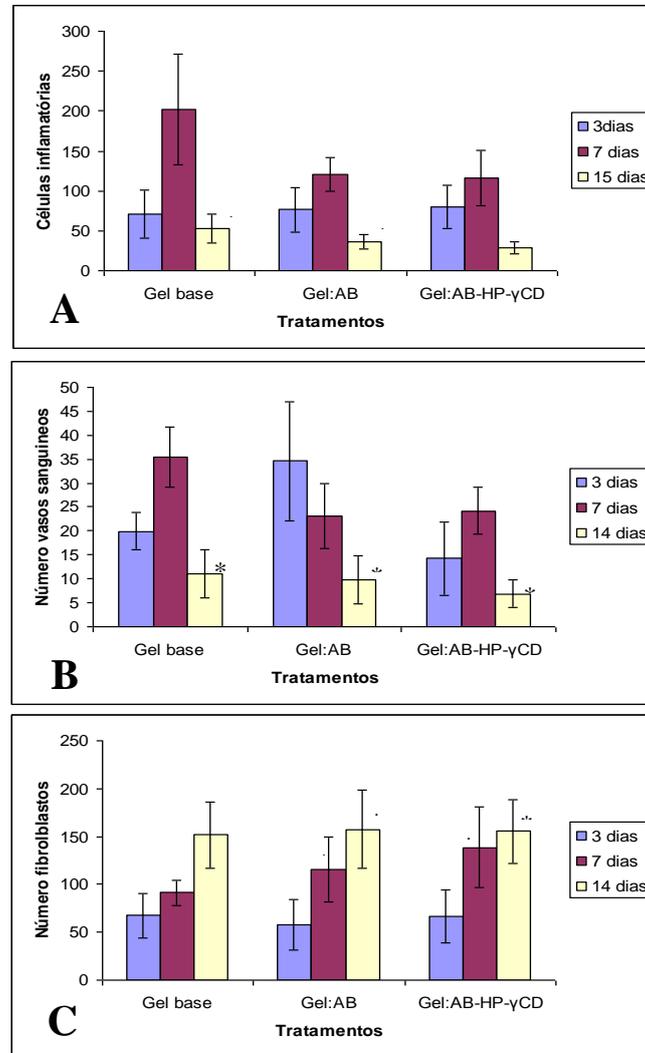


Figura 10. Análise histomorfométrica dos grupos de animais controle e tratados com as formulações tipo gel de natrosol contendo ácido barbático. Legenda: A= Contagem de células inflamatórias; B= contagem de vasos sanguíneos; C= Contagem de fibroblastos. * ($p < 0,05\%$ ou 5%) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle (tratado com gel base). Coradas com Hematoxilina e Eocina (HE).

4. Conclusões

A inclusão do ácido barbático no complexo com 2-hidroxiopropil- γ -ciclodextrina aumentou a solubilidade do fármaco.

Os complexos de inclusão modificaram significativamente a eficiência da cicatrização como verificado macroscopicamente.

Os ensaios evidenciaram que o complexo contendo o BAR foi capaz de reduzir a área lesionada produzindo enxugamento do ferimento, granulações, remodelação e efeito anti-inflamatório; produzindo assim a cicatrização esperada.

REFERÊNCIAS

- ASAHIANA, Y; SHIBATA, S. *Chemistry of lichen substances*. Tokio, Japanese Society for the Promotion of Science, 1954.
- CONTRAN, RS; KUMAR, V; COLLINS, T. *Robbins: Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- CULBERSON, CH. Processes affecting the oceanic distribution of carbon dioxide. Tese de doutorado. Oregon State University, Corvallis. 178, 1972.
- COUTINHO, HDM; BEZERRA, DAC; LÔBO, K; BARBOSA, IJF. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. *Conceitos*. v.5, p. 77-85. 2004.
- DEL-VALLE, EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, p. 1033-1046. 2004.
- DEVARAKONDA, B; HILL, AR; LIEBENBERG, W; BRITS, M; VILLIERS, MM. Comparasion of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine dendrimers and cyclodextrins. *Intern J Pharm*, v. 304, p. 193–209. 2005.
- EDWARDS, HGM; NEWTON, EM; WYNN-WILLIAMS, DD. Molecular structural studies of lichen substances II: atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rhizocarpic acid, calycin, pulvinic dilactone and usnic acid. *Journal of Molecular Structure*. v. 651-653, p.27-37. 2003.
- EL-GHALBZOURI, A. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res*. v. 31, n. 2, p. 189-199. 2002.
- GARROS,IC.; CAMPOS,A.C.L.; TÂMBARA,E.M.; TENÓRIO,S.B.;TORRE,O.J.M.; AGU-LHAM,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, p.55. 2006.
- HELMKE, CD. Wound Healing – part 1. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. v.8, n.4, p. 269-274. 2004.
- HIGUCHI, T; CONNORS, KA. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical chemistry and instrumentation*, v.4, p. 117-212. 1965.

- HONDA, NK; VILEGAS, W. Química dos líquens-Divulgação. *Química Nova*. v. 21, p110-125. 1998.
- HUNECK,S;YOSHIMURA, I. *Identification of Lichen Substances*. Springer, Berlin,Heidelberg, New York. p. 25.1996.
- KINCAID, MR. Options in wound care. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*. v. 6, n. 2, p.92 – 95, 2002.
- KRISTMUNDSDÓTTIR, T; JÓNSDÓTTIR, E; ÖGMUNDSDÓTTIR, HM; INGÓLFSDÓTTIR, K. Solubilization of poorly soluble lichen metabolites for biological testing on cell lines. *Europ J Pharm Sci*. v.24, p.539-543. 2005.
- LAZAROV, L; STRATIEV, S. The morphological characteristics of the cicatriz in repeat cesarean section. *Akush. Ginekol., Moscou*. v. 32, n. 2, p.12-14. 1993.
- LIRA, MCB; SANTOS-MAGALHÃES, SS; FERRAZ, MS; SILVA, DGVC; CORTES, ME; TEIXEIRA, KI; CAETANO, NP; SINISTERRA, RD; PONCHEL, G. Inclusion complex of usnic with β -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. *J Inc Phenom Macrocycl Chem*. v.64, p.215. 2009.
- LEGAZ, ME; VICENTE, C. Endogenous inactivators of arginine decarboxylase and agmatine amidinohydrolase en Evernia prusnastri thallus. *Journal of Plant Physiology*. v.71, p. 300-302,1983.
- LEONARDI, GR; GASPAR, LR; CAMPOS, PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Rev. Investigação clínica, epidemiológica, laboratorial e terapêutica*, v. 77, n. 5, p. 563-569, set./out.2002.
- LOFTSSON, T; BREWSTER, M. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci*. v. 85, n.10, p. 1017-1025. 2005.
- MARTINS,NLP.; MALAFAIA,O.; RIBAS-FILHO.JM.; HEIBEL.M.; BALDEZ.RN.; VAS-CONCELOS.PRL.;et al.Análise comparativa da cicatrização da pele com o uso intraperitoneal de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). *Acta Cirúrgica Brasileira*. v. 21 (Suplemento 3). 2006.
- MARTINS, MR; CORTEZ, LER; FELIPE, DF. Desenvolvimento de Formulações de uso tópico empregado o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. *Revista Saúde e Pesquisa*. v. 1, n. 3, p. 259-263, set./dez. 2008
- OLIVEIRA, HP. Traumatismos nos animais domésticos. *Caderno Técnico da Escola de Veterinária*. v.1, n.7, p.1-57, 1992.

- PATEL, R; PATEL, M. Preparation, characterization, and dissolution behavior of a solid dispersion of simvastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. *Journal of Dispersion Science and Technology*. v. 29, p.193-204. 2008.
- PEREIRA, EC; SILVA, NH; BRITO, ES; CRUZ, J; SILVA, MI. Atividade antimicrobiana de líquens amazônicos I: Cladonia corallifera e Cladonia substellata. *Revista da Universidade do Amazonas, Série: Ciências Biológicas* v.1 p. 65-77. 1996.
- PEREIRA, ECG. Produção de metabólitos por espécies de Cladoniaceae (Líquén), a partir de imobilização celular. Tese de doutorado em Botânica. UFRPE, 1998.
- PERRY, EK; PICKERING, AT; WANG, WW; HOUGHTON, PJ; PERRY, NS. Medical Research Council, Newcastle General Hospital, Newcastle upon Tyne. *J Pharm Pharmacol*. v.51, n. 5, p. 527-534. 1999.
- PIOVANO, M; GARBARINO, JA; GIANNINI, FA; CORRECHE, ER; FERESIN, G; TAPIA, A; ZACCHINO, S; ENRIZ, R. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. v. 47. p. 235-240. 2002.
- PRATA, MB; HADDAD, CM; GOLDENBERG, S; SIMÕES, MJ; MOURA, LAR; TRABULSI, LR. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*. v.3, n.2, p.43-48. 1988.
- SEGUNDO,AS.;BOSCO,A.F.;MAIA,D.;RIBEIRO,R.V.;AGUIAR,E.B.H.;DIAS ROCATTO,G.; CIRILO,D.M.;BUZELLE,S.L.;VEDOVE,T.A. Influência do Aloe vera e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia*. v.17, n.1, p.5-10, 2007.
- RIBEIRO, AQ; LEITE, JPV; DANTAS-BARROS. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev Bras Farmacogn*. v.15, n. 65-70. 2005.
- TEICHMANN, A; HEUSCHKEL, S; JACOBI, U; PRESSE, G. NEUBERT, RHH; STERRY, W; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. *Eur J Pharm Biopharm*. v. 67, n. 3, p. 699-706. 2007.
- WINTER, GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature*, v.193, p.293. 1962.