



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências-Farmacêuticas



Potencial cicatrizante de micropartículas contendo fração acetato de etila das espécies *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron obovatum*

ELOISA LORENZI DA SILVA

Maringá

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Potencial cicatrizante de micropartículas contendo fração acetato de etila das espécies *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron obovatum*

ELOISA LORENZI DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Coorientadora: Profa. Dra. Raquel Isolani Luvizotto

Projeto de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá.

Maringá

2023



Este trabalho será realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica PALAFITO - Bloco K80, PALAFITO - Bloco T22 e Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) - Bloco B09, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR.

BIOGRAFIA



Eloisa Lorenzi da Silva nasceu em Maringá, PR, em 02 de outubro de 2000. Filha de Lenilson Lorenzi da Silva e Sandra Aparecida de Oliveira Lorenzi da Silva. Coursou o ensino fundamental na Escola Estadual Ipiranga e o ensino médio no Colégio SESI, onde concluiu em 2017. Por ser bolsista, nos últimos dois anos do ensino médio, fez o curso técnico em Biotecnologia, pelo SENAI. No ano de 2018 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá. Participou de congressos e simpósios nacionais e internacionais, apresentando trabalhos com publicação em anais de eventos. Iniciou suas atividades no Laboratório de Biologia Farmacêutica – PALAFITO em 2020, participando de dois projetos de iniciação científica: “Atividade anti-inflamatória e antioxidante de extratos hidroalcoólicos de rizomas de *Limonium brasiliense*” e “Atividade anti-*Helicobacter pylori ex vivo* de extrato hidroalcoólico de rizomas de *Limonium brasiliense*”, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Referente ao último trabalho, recebeu premiação pela apresentação oral dos resultados obtidos em um evento nacional. Concluiu a graduação em 2023 e, atualmente, é Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Família e subfamília.....	12
2.2 Gênero - <i>Stryphnodendron</i> Mart.	12
2.3 Taninos	13
2.4 Cicatrização.....	14
3 JUSTIFICATIVA.....	16
3.1 INOVAÇÃO E RELEVÂNCIA	16
3.2 SUSTENTABILIDADE.....	17
4. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVOS GERAIS.....	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5.1 MATERIAIS	19
5.1.1 Solventes, reagentes e soluções.....	19
5.1.2 Equipamentos.....	20
5.2 MÉTODOS.....	21
5.2.1 Droga vegetal	21
5.2.1.1 Coletas	21
5.2.1.2 Autorizações.....	22
5.2.1.3 Secagem e estabilização	22
5.2.1.4 Preparo dos materiais vegetais.....	22
5.2.2 Preparação dos extratos e frações	22
5.2.2.1 Preparação dos extratos brutos.....	22
5.2.2.2 Preparação das frações semipurificadas	23
5.2.3 Análise físico-química, qualitativa e quantitativa.....	23

5.2.3.1 Determinação da perda por dessecação	23
5.2.3.2 Reações qualitativas	23
5.2.3.2.1 Reação de polifenóis.....	24
5.2.3.2.2 Cloreto férrico (FeCl ₃)	24
5.2.3.2.3 Gelatina	24
5.2.3.3 Análises quantitativas	24
5.2.3.3.1 Teor de extrativos	24
5.2.3.3.2 Determinação do teor de ácido gálico e galocatequina	25
5.2.4 Preparação das micropartículas adesivas	27
5.2.4.1 Planejamento experimental	27
5.2.4.2 Método por <i>spray-drying</i>	28
5.2.5 Caracterização das micropartículas	28
5.2.5.1 Análise morfológica	28
5.2.5.2 Análise granulométrica.....	28
5.2.5.3 Análises térmicas	28
5.2.5.4 Difração de raios-X	29
5.2.5.5 Determinação do teor de galocatequina e ácido gálico e eficiência de aprisionamento	29
5.2.5.6 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> de galocatequina e ácido gálico.....	29
5.2.6 Potencial cicatrizante <i>in vitro</i>	30
5.2.6.1 Cultura de células	30
5.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular	30
5.2.6.3 Ensaio de cicatrização de feridas <i>in vitro</i>	31
5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
6. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	32
7 RESULTADOS ESPERADOS.....	34
8. EQUIPE EXECUTORA E LOCAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	34



8.1 EQUIPE EXECUTORA.....	34
8.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTO	35
9. REFERÊNCIAS	36

SILVA, E. L. 2023. Potencial cicatrizante de micropartículas contendo fração acetato de etila das espécies *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron obovatum*. Projeto de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 41p.

RESUMO

Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville e *Stryphnodendron obovatum* Benth., Leguminosae, são popularmente conhecidos como barbatimão. A confusão entre essas espécies é comum devido aos nomes e uso populares em comum. Suas cascas, que são utilizadas, não apresentam diferenças morfoanatômicas, também sendo mais um motivo de utilização errônea. Contudo, sua fitoquímica possui diferenças nos teores de ácido gálico e galocatequina. Além disso, a presença de epigalocatequina-3-*O*-(3,5-dimetil)-galato e epigalocatequina-3-*O*-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato, diferencia as espécies. Considerando o potencial cicatrizante dessas espécies, destaca-se a importância de desenvolver formulações tópicas que possam ser utilizadas com essa finalidade. Sistemas farmacêuticos microparticulados oferecem liberação controlada e propriedades adesivas, mantendo os ativos no local de aplicação. A variação do pH da pele quando inflamada sugere o uso de polímeros pH-responsivos na produção de micropartículas. Portanto, a capacidade cicatrizante das espécies, especialmente devido a presença de taninos, é aprimorada em sistemas microparticulados. Dessa forma, o objetivo deste projeto será desenvolver micropartículas contendo frações semipurificadas de *S. adstringens* e *S. obovatum* e avaliar o potencial cicatrizante das amostras em linhagem L-929 de fibroblastos, a fim de posteriormente melhorar o tratamento de feridas de difícil cicatrização, oferecendo resultados mais eficazes.

Palavras-chave: Cicatrização; Ferida; *Wound healing*; Barbatimão; Farmacognosia.

SILVA, E. L. 2023. Healing potential of microparticles containing ethyl-acetate fraction of the species *Stryphnodendron adstringens* and *Stryphnodendron obovatum*. Projeto de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 41p.

ABSTRACT

Stryphnodendron adstringens and *Stryphnodendron obovatum*, Leguminosae, are commonly known as barbatimão. Confusion between these species is common due to shared names and popular use. Their barks, which are utilized, do not exhibit morphoanatomical differences, contributing to potential confusion. However, their phytochemistry shows variations in levels of gallic acid and galocatechin. Additionally, the presence of epigallocatechin-3-*O*-(3,5-dimethyl)-gallate and epigallocatechin-3-*O*-(3-methoxy-4-hydroxy)-benzoate distinguishes the species. Considering the wound-healing potential of these species, there is an emphasis on developing topical formulations. Pharmaceutical microparticulate systems offer controlled release and mucoadhesive properties, ensuring the retention of active compounds at the application site. The pH variation in inflamed skin suggests the use of pH-responsive polymers in microparticle production. Therefore, the aim of this of this project will be to develop microparticles containing semi-purified fractions of *S. adstringens* and *S. obovatum* and evaluate the healing potential of the samples in the L-929 lineage of fibroblasts, in order to subsequently improve the treatment of difficult-to-heal wounds, offering more effective results.

Keywords: Cicatrization; Healing; Wound healing; Barbatimão; Pharmacognosy.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Stryphnodendron* Mart. pertence à família Leguminosae Juss. É nativo de parte da região da América Central e América do Sul, se estendendo por todo o território brasileiro. Atualmente, existem 35 espécies aceitas para esse gênero (Scalon et al., 2022), dentre elas *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e *Stryphnodendron obovatum* Benth. *S. adstringens* é uma espécie nativa do Brasil, enquanto *S. obovatum* é nativa do Brasil, Bolívia e Paraguai. Ambas as espécies são conhecidas popularmente como: “barba-de-timão”, “casca da virgindade”, “faveira” e “barbatimão” (Scalon et al., 2022; POWO, 2023b).

Devido ao seu nome popular, essas espécies podem ser confundidas, sendo utilizadas de forma equivocada. Para a diferenciação entre as espécies, por suas folhas, pode ser realizado a análise macroscópica dos foliólulos. Contudo, as cascas não apresentam diferenças morfológicas e anatômicas, sendo necessário a diferenciação fitoquímica das espécies (Sanchez et al., 2007).

Estudos fitoquímicos podem ser realizados para identificar os compostos presentes nessas espécies. Lopes et al. (2009b) realizaram a separação e quantificação de ácido gálico e galocatequina em três espécies, dentre elas *S. adstringens* e *S. obovatum*. Com isso, puderam observar que *S. adstringens* possui o teor de ácido gálico cerca de 3 vezes maior do que *S. obovatum*. Contudo, o teor de galocatequina não variou entre as espécies. Outra forma, seria pela identificação de epigalocatequina-3-*O*-(3,5-dimetil)-galato e epigalocatequina-3-*O*-(3-metoxi-4-hidroxi)-benzoato, os quais estão presentes em *S. adstringens* e ausentes em *S. obovatum* (Lopes et al., 2009a).

Para o tratamento de feridas, é interessante o desenvolvimento de formulações de uso tópico. Dessa forma, sistemas farmacêuticos microparticulados permitem que os ativos tenham



uma liberação controlada, além de possuírem propriedades adesivas, fazendo com que os ativos permaneçam no local de aplicação (Carvalho et al., 2010). Em casos de lesão na pele, quando inflamada, o pH desta sofre um aumento (Schneider et al., 2006; Draelos, 2022). Dessa forma, é interessante a utilização de polímeros pH-responsivos na produção das micropartículas (Van Gheluwe et al., 2021).

O potencial cicatrizante de *S. adstringens* e *S. obovatum* demonstra a capacidade das espécies em curar feridas. As espécies são ricas em taninos, que possuem potencial de promover a proliferação/migração celular, bem como atividade antimicrobiana e antifúngica, o que favorecem a recuperação tecidual, reduzindo ainda os riscos de infecções, por exemplo (Sanches et al., 2005, Ishida et al., 2006, Trevisan et al., 2020). Quando em sistema microparticulado, essa atividade é favorecida, devido as propriedades dessa tecnologia farmacêutica. Portanto, o uso de micropartículas contendo frações semipurificadas de *S. adstringens* e *S. obovatum* podem melhorar o resultado no tratamento de feridas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família e subfamília

Leguminosae Juss. é sinônimo de Fabaceae Lindl. Pertence a classe das angiospermas. Em geral, é composta por árvores, arbustos e subarbustos. Abrange 793 gêneros aceitos e quase 20.000 espécies, sendo uma das três maiores famílias de plantas (POWO, 2023a).

No Brasil, também está entre as três maiores famílias em questão de diversidade e número de espécies, estando distribuída em todo o país. Cinco subfamílias são pertencentes a essa família, sendo: Cercidoideae, Detarioideae Burmeist., Dialioideae, Papilionoideae e Caesalpinioideae. A subfamília Papilionoideae possui 152 gêneros aceitos no país, contudo, a subfamília Caesalpinioideae é a que possui maior taxa de gêneros no país, cerca de 50% quando em relação à quantidade total de gêneros no mundo (Flora e Funga do Brasil, 2023a; POWO, 2023a).

A subfamília Caesalpinioideae abrange 163 gêneros e aproximadamente 4680 espécies. Alguns gêneros dessa subfamília sofreram mudanças filogenéticas que devem ser estudadas para se estabelecer uma nova classificação (Ringelberg et al., 2022). No Brasil, existem 73 gêneros dessa subfamília e, dentre eles, o gênero *Stryphnodendron* Mart. (LPGW, 2023).

2.2 Gênero - *Stryphnodendron* Mart.

O gênero *Stryphnodendron* Mart. foi primeiramente descrito por Martius, em 1837. Esse nome deriva das palavras “*stryphnos*” e “*dendron*”, que significa “árvore adstringente” ou “árvore que aperta”, devido a propriedade adstringente dos taninos presentes nas cascas (Lima et al., 2022). Existem 28 espécies aceitas para esse gênero, nativas da Bolívia, Brasil, Colômbia,

Costa Rica, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela. No Brasil, 21 dessas espécies são nativas (Flora e Funga do Brasil, 2023b; POWO, 2023b), estando mais frequentes no Cerrado e na Floresta Amazônica (Scalon et al., 2022).

As espécies desse gênero podem ser subarbustos até árvores de grande porte, podendo ser caracterizadas e diferenciadas por algumas características, como as descritas por Scalon et al. (2022). Por possuírem interesse medicinal, é necessário realizar a diferenciação entre as espécies desse gênero, pois, por serem conhecidas popularmente como "barbatimão", pode haver a utilização equivocada da espécie desejada (Flora e Funga do Brasil, 2023b; Scalon et al., 2022).

Diversas atividades de espécies do gênero *Stryphnodendron* já foram relatadas. Algumas delas são: antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-*Leishmania amazonensis*, anti-*Trypanosoma cruzi*, antiviral, antifúngica, antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, hipotensiva, imunomoduladora e cicatrizante (Bersani-Amado et al., 1996; Jorge et al, 1996; Jorge-Neto et al, 1996; Lima, Martins, De Souza, 1998; Audi et al., 1999; Alves et al., 2000; Herzog-Soares et al., 2002; Palermo et al., 2002; Lopes et al., 2003; Lopes et. al., 2005; Sanches et al., 2005; Felipe et al., 2006; Ishida et al., 2006; Melo et al., 2007; Carvalho et al., 2020).

2.3 Taninos

Os taninos são moléculas presentes em cascas, caules, sementes, raízes, brotos e folhas de vegetais. Normalmente, as cascas possuem maior concentração de taninos quando comparada a outros órgãos. Os taninos atuam como moléculas “protetoras/defensoras” da planta contra infecções fúngicas, insetos e outros patógenos. Eles possuem diversas aplicações industriais, como na indústria mineral, vinícola, nutrição animal, além do uso para tratamento e coloração de couro, produção de adesivos, em estações de tratamento de água e como moléculas bioativas para o tratamento de doenças (Santos e Mello, 2006; Das et al., 2020).

Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis apresentam um poliol central com hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico que, dependendo da esterificação, pode ser transformado em galotaninos ou elagitaninos. Já os taninos condensados, ou não hidrolisáveis, são formados por meio da condensação de uma ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol, sendo a principal representante dessa classe a proantocianidina. Atualmente, 90% dos taninos existentes no mercado mundial são os classificados como condensados (Das et al., 2020; Maugeri et al., 2022).

As procianidinas possuem atividade antioxidante, eliminando espécies reativas de oxigênio, pode modular a resposta imune, ação antifúngica, antiviral, antimutagênica e demais propriedades que têm levado ao aumento nas pesquisas sobre essa classe (Santos e Mello, 2006; Das et al., 2020).

2.4 Cicatrização

A pele é o maior órgão do corpo humano e é a primeira barreira de defesa do corpo, fazendo parte da imunidade inata, prevenindo infecções causadas por microrganismos externos, evitando a desregulação térmica e impedindo lesões mecânicas. Quando lesionada, pode ocorrer a formação de feridas e, para cicatrizar essas feridas há a liberação de diversas citocinas e quimiocinas, atraindo células de várias linhagens (Zou et al., 2023). A cicatrização é dividida em 4 etapas: hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação.

A hemostasia ocorre logo após a lesão. Ocorre vasoconstrição e, junto a isso, agregação plaquetária e formação de fibrinogênio, para evitar o extravasamento de sangue e formar uma estrutura temporária que permite a infiltração celular, necessária para chegar ao local lesionado. Quando o organismo se encontra hemostático, inicia-se a fase de inflamação (Wilkinson et al., 2020; Li et al., 2022; Xu et al., 2023).

A fase de inflamação dura cerca de 2 dias. Nesta etapa, o agregado plaquetário secreta diversas citocinas e, junto com elas, os fatores de crescimento atraem monócitos e neutrófilos, os quais atuam como células de defesa e auxiliam no aumento da resposta inflamatória, liberando outras quimiocinas que atraem leucócitos para o local. Além disso, ocorre a diferenciação de macrófagos em: M1, pró-inflamatórios, e M2, anti-inflamatórios (Wilkinson et al., 2020; Li et al., 2022; Xu et al., 2023).

A proliferação se inicia no 3º dia da lesão e é caracterizada pela nova formação do epitélio, angiogênese e granulação do tecido. Baseia-se na diferenciação de células-tronco da epiderme e na desdiferenciação de células epiteliais, adesão intercelular e na membrana basal. A formação de um tecido granular reestabelece o suprimento sanguíneo, a integridade do tecido e favorece a remodelação (Wilkinson et al., 2020; Li et al., 2022; Xu et al., 2023).

Por fim, na etapa da remodelação ocorre a diminuição da presença de macrófagos, células do endotélio e fibroblastos. Os fibroblastos se diferenciam em miofibroblastos, os quais atuam na contração da ferida, levando ao seu “fechamento”. Além disso, há a substituição de colágeno tipo III por colágeno do tipo I, considerado mais maduro (Wilkinson et al., 2020; Li et al., 2022; Xu et al., 2023).

3 JUSTIFICATIVA

3.1 INOVAÇÃO E RELEVÂNCIA

Stryphnodendron adstringens e *Stryphnodendron obovatum* são conhecidos popularmente como “barbatimão”. Além disso, ambas as espécies possuem indicação popular para o tratamento de feridas. Devido a essas características em comum, pode existir confusão quando utilizado o nome popular das espécies ou pelas suas indicações. Dessa forma, se faz necessário a diferenciação das espécies em relação a alguns aspectos, dentre eles: a diferenciação no potencial biológico, como na capacidade de cicatrização. Além disso, como forma de inovação no tratamento, serão desenvolvidas micropartículas contendo a fração acetato de etila de cada espécie.

O interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação microestruturados tem aumentado devido às inúmeras vantagens que essa tecnologia farmacêutica oferece. Devido sua capacidade de estabilização, liberação modificada e adesão no local de aplicação, sem a necessidade no uso de altas concentrações. Portanto, os efeitos adversos e o risco de toxicidade são reduzidos, além de proporcionar uma maior adesão terapêutica do paciente.

A utilização de fitoterápicos como terapias complementares ou alternativas podem ser viáveis, de forma farmacológica e econômica. Além disso, quando associado à inovação tecnológica, como no desenvolvimento de micropartículas, diversas vantagens terapêuticas são agregadas. Desse modo, tendo em vista a utilização popular das espécies vegetais *S. adstringens* e *S. obovatum* para a cicatrização de feridas, o desenvolvimento de micropartículas contendo as frações acetato de etila de cada espécie permite a inovação nesse tratamento, além da diferenciação no potencial de cada espécie à essa finalidade.

3.2 SUSTENTABILIDADE

Mudanças na utilização de recursos naturais estão sendo estabelecidas, contribuindo para a preservação do meio ambiente. Atualmente, faz-se necessário a implementação de políticas públicas para o conhecimento da população sobre esse assunto, abordando sobre as condições sociais, econômicas e de sustentabilidade (Monteiro e Barbosa, 2021; Dos Santos et al., 2022).

O desenvolvimento sustentável é aquele que atende às necessidades da geração atual sem comprometer a capacidade das futuras, evitando o esgotamento de recursos no processo realizado (WWF, 2023). Dessa forma, a sustentabilidade uma maneira de utilizar os recursos naturais de forma adequada, exigindo planejamento abrangente e criterioso. Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da ONU buscam cessar a perda da biodiversidade mundial (ONU Brasil, 2023).

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta. Contudo, ainda enfrenta desafios com o alto número de espécies ameaçadas de extinção, como por exemplo para as espécies *S. adstringens* e *S. obovatum* (Scalon et al., 2022). Em 2022 foi divulgada a lista atualizada de plantas ameaçadas de extinção, com 3.209 espécies, subespécies/variedades. A falta de incentivo e manejo sustentável, associadas a redução de áreas de proteção, resulta no prejuízo de ecossistemas. Apesar disso, o país possui grande potencial nas plantas medicinais para impulsionar setores, como na agricultura familiar e geração de empregos (Ferreira et al., 2023).

Diante desse cenário, é crucial implementar projetos de desenvolvimento sustentável, respaldados cientificamente, para aproveitar a biodiversidade brasileira no tratamento de doenças e assegurar qualidade de vida e saúde para as gerações futuras (Alves et al., 2016).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade biológica das frações acetato de etila microencapsuladas de *Stryphnodendron adstringens* e *Stryphnodendron obovatum* em linhagem de fibroblastos L-929 para analisar e diferenciar a capacidade cicatrizante das espécies.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o controle de qualidade das espécies vegetais;
- Produzir os extratos brutos (EBs) e frações acetato de etila (FAEs) das cascas de *S. adstringens* e *S. obovatum*;
- Obtenção das micropartículas contendo as FAEs com diferentes polímeros;
- Caracterização das micropartículas;
- Determinação do teor de ácido gálico e galocatequina nas micropartículas e da eficiência de aprisionamento;
- Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de ácido gálico e galocatequina a partir das estruturas obtidas;
- Avaliar o efeito das FAEs microencapsuladas sobre a viabilidade de células L-929;
- Realizar o ensaio de cicatrização de ferida artificial *in vitro*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

5.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuirão grau de pureza pró-análise (PA), e de marca Merck[®], Sigma[®], Carlo Erba[®], Mallinckrodt[®] ou Synth[®]:

- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT);
- Acetato de Etila;
- Acetona;
- Acetona deuterada Isotec[®];
- Acetonitrila grau HPLC;
- Ácido fórmico;
- Ácido gálico SQR;
- Ácido trifluoroacético;
- Água destilada;
- Água ultra-pura;
- Álcool etílico;
- Álcool metílico;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM);
- Estreptomicina;
- Fibroblastos da linhagem celular clone L-929 (ATCC[®] CCL1[™]);
- Galocatequina SQR;
- Solução de cloreto férrico;
- Soro fetal bovino;

- Sulfato de sódio anidro.

5.1.2 Equipamentos

- Agitador magnético;
- Agitador mecânico;
- Autoclave;
- Balança analítica;
- Balança determinadora de umidade por infravermelho;
- Balança semi-analítica;
- Banho-maria;
- Capela de Biossegurança nível II;
- Cartucho de extração;
- Célula de difusão de Franz modificada;
- Centrífuga;
- Coluna de 250 mm x 4,5 mm empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 μ m);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-VIS-DAD;
- Dessecador;
- Destilador de água;
- Espectrofotômetro;
- Estufa de secagem;
- Estufa incubadora de CO₂;
- Evaporador rotatório;
- Freezer;
- Leitor de microplacas (ELISA);

- Liofilizador;
- Membrana filtrante;
- Microscópio eletrônico de varredura;
- Microscópio invertido;
- Microscópio óptico;
- Moinho de martelos;
- pHmetro;
- Pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano;
- Sistema de água ultrapura;
- *Spray dryer*;
- Sistema de análise térmica por calorimetria exploratória diferencial;
- Banho de ultra-som;
- Ultra-turrax;
- Vortex;
- *Zetasizer*.

5.2 MÉTODOS

5.2.1 Droga vegetal

5.2.1.1 Coletas

Serão coletados 1500 gramas de cascas de *S. adstringens* e de *S. obovatum*, Leguminosae. Suas respectivas exsicatas serão preparadas, identificadas e depositadas no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá.

5.2.1.2 Autorizações

A coleta do material vegetal está registrada no sistema SISBIO/IBAMA nº 11995-3, de 2 de novembro de 2010, com código de autenticação, 463676133, sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. Acesso ao material botânico de *S. adstringens* está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob número A06ADCB e de *S. obovatum* sob número ACD8D5E.

5.2.1.3 Secagem e estabilização

Os materiais vegetais serão secos em estufa de circulação forçada de ar à 37,0 °C até não haver variação de peso. O peso será monitorado com o auxílio de balança determinadora de umidade por infravermelho. Após a estabilização, as cascas serão armazenadas em barriletes de papelão.

5.2.1.4 Preparo dos materiais vegetais

As cascas secas serão moídas em um moinho de martelos de aço inox Tigre ASN-6 para serem empregadas na preparação dos extratos. Após a moagem, a droga vegetal será acondicionada ao abrigo da luz e umidade.

5.2.2 Preparação dos extratos e frações

5.2.2.1 Preparação dos extratos brutos

As cascas cominuídas serão submetidas à turbo-extração (Ultra-turrax®), com mistura de solventes acetona:água (7:3; v/v). O tempo de extração será de 20 min, processado por 4 vezes de 5 min, com intervalo de 5 min.

Ao final da extração, os extratos serão filtrados com sucessivas trocas do sistema de filtração com algodão (profundidade e superfície) e com auxílio do sistema sob pressão

reduzida. Os extratos filtrados serão concentrados em rotaevaporador sob pressão reduzida, à temperatura de 40,0 °C, até a eliminação do solvente orgânico. Por fim, serão congelados em nitrogênio líquido e liofilizados, obtendo os extratos brutos (EBs) de *S. adstringens* (EBSA) e de *S. obovatum* (EBSO), sendo armazenados em freezer a -20,0 °C.

5.2.2.2 Preparação das frações semipurificadas

Os EBs (50,0 g) serão solubilizados em 500 mL de água destilada e particionados com 500 mL de acetato de etila (10 vezes) em funil de separação. O procedimento será repetido por cinco vezes com 50,0 g dos EBs liofilizados, cada vez, totalizando 250 g para cada EB. As fases aquosas e orgânicas serão concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, à temperatura de 40,0 °C, até eliminação do solvente orgânico. As frações livres do solvente serão congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas, pesadas e armazenadas em freezer (-20,0 °C), obtendo a fração semipurificada de *S. adstringens* (FSA) e a fração semipurificada de *S. obovatum* (FSO) (Toledo, 2002).

5.2.3 Análise físico-química, qualitativa e quantitativa

5.2.3.1 Determinação da perda por dessecação

Com a finalidade de determinar a quantidade de água presente nas cascas, serão pesados 2,0 g de amostra do pó das cascas, os quais serão colocados em pesa-filtros previamente tarados, sendo dessecados em estufa a 105,0 °C, até peso constante. Os valores representarão a média de três determinações e serão expressos em porcentagem (%; p/p)(Brasil, 2019).

5.2.3.2 Reações qualitativas

Para as reações qualitativas, será preparada uma solução extrativa de 2,0 g das drogas vegetais em 20,0 mL de água destilada, sob refluxo durante 15 min. Esfriar e filtrar. Ajustar o volume em balão volumétrico de 20 mL.

5.2.3.2.1 Reação de polifenóis

Será produzido uma mistura de 1,0 mL de solução de cloreto férrico a 1% (p/v) e 1,0 mL de solução de ferrocianeto de potássio a 1% (p/v). Então, 5 gotas dessa mistura serão colocadas em 20 mL de extrato aquoso de *S. adstringens* e *S. obovatum* a 10%. Deverá ser observado a formação de uma coloração vermelha na camada aquosa.

5.2.3.2.2 Cloreto férrico (FeCl₃)

Adicionar 2,0 mL da solução extrativa em 10,0 mL de água destilada e adicionar 3 gotas da solução de FeCl₃ a 1,0%. Se azul: reação positiva para taninos hidrolisáveis ou ácido gálico; se verde: reação positiva para taninos condensados. Realizar a análise em triplicata.

5.2.3.2.3 Gelatina

Adicionar à 2,0 mL da solução extrativa, 2 gotas de ácido clorídrico (HCl) diluído e 3 gotas de solução de gelatina a 2,5%. Se ocorrer a formação de precipitado: reação positiva para taninos. Realizar a análise em triplicata.

5.2.3.3 Análises quantitativas

5.2.3.3.1 Teor de extrativos

Será empregado 1,0 g da amostra (m1) de cada espécie com 100 mL de água, sob refluxo por 10 min. Após o resfriamento, o conteúdo é vertido em um balão de 100 mL e completa-se o volume para posterior filtragem. Os primeiros 20 mL são desprezados. Será pesado em um

pesa-filtro previamente tarado exatamente 20 g do filtrado para ser evaporado em banho-maria. Após a evaporação da água, o pesa-filtro será colocado em estufa a 105,0 °C por 2 h, retirado e colocado em dessecador por 25 min para esfriar e em seguida pesado (m2). O ensaio será realizado em triplicata (Brasil, 2019).

Equação para cálculo do teor de extrativos:

$$TE = \frac{m2 \times 5 \times 100}{m1}$$

5.2.3.3.2 Determinação do teor de ácido gálico e galocatequina

Será realizada a metodologia disposta no volume II da 6ª edição da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019). A metodologia consiste em cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) utilizando ácido gálico e galocatequina como padrões. Será utilizada uma pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano e uma coluna de 250 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 µm). O fluxo da fase móvel será de 0,8 mL/min. Para a fase móvel serão utilizados os solventes acetonitrila (eluente A) e água (eluente B) acidificadas com ácido trifluoroacético a 0,05% (v/v). A eluição é majoritariamente por gradiente linear (Tabela 1).

Tabela 1. Eluição dos solventes.

Tempo (minutos)	Eluente (A) (%)	Eluente (B) (%)	Eluição
0 – 10	95 → 80,7	5 → 19,3	Gradiente linear
10 – 13,5	80,7 → 75	19,3 → 25	Gradiente linear
13,5 – 23	75 → 62	25 → 38	Gradiente linear
23 – 25	62 → 25	38 → 75	Gradiente linear
25 – 28	25 → 95	75 → 5	Gradiente linear
28 – 32	95	5	Isocrática

Solução amostra: extrair, por turbólise, 10 g da droga vegetal pulverizada (250 µm) em 90 mL da mistura acetona e água (7:3) durante 15 min, com intervalos de 5 min para que a temperatura não exceda a 40,0 °C. Filtrar em algodão e eliminar a acetona em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Extrair a fase aquosa resultante com três porções de 20 mL de acetato de etila em funil de separação (125 mL). Deixar em repouso em temperatura de -18,0 °C durante 15 min, para total separação das fases. Reunir as fases orgânicas e filtrar em papel de filtro com 5 g de sulfato de sódio anidro. Evaporar a fração orgânica obtida em evaporador rotatório sob pressão reduzida até resíduo.

Suspender o resíduo com 5 mL da mistura álcool metílico e água (2:8). Extrair em cartucho de extração em fase sólida, empacotado com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (55 mm, 70 Å), previamente acondicionado com 10 mL da mistura de álcool metílico e água (2:8), em balão volumétrico de 100 mL. Eluir, em seguida, 10 mL da mistura álcool metílico e água (2:8) para o mesmo balão e completar o volume (S1) com a mistura álcool metílico e água (2:8). Transferir volumetricamente 5 mL da S1 para balão volumétrico de 25 mL, completar o volume com a mistura álcool metílico e água (1:1) e homogeneizar (S2). Filtrar a solução S2 em unidade filtrante 0,45 µm.

Solução referência 1: dissolver quantidade exatamente pesada de galocatequina SQR em mistura de álcool metílico e água (1:1), para obter solução a 0,152 mg/mL. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

Solução referência 2: dissolver quantidade exatamente pesada de ácido gálico SQR em mistura de álcool metílico e água (1:1), para obter solução a 0,100 mg/mL. Filtrar em unidade filtrante de 0,45 µm.

Soluções para curva analítica 1: diluir uma alíquota de 600 µL da *Solução referência 1* em balão volumétrico de 5 mL, com a mistura álcool metílico e água (1:1). Proceder a diluições para obter concentrações de 1,14, 2,28, 4,56, 9,12 e 18,24 µg /mL.

Soluções para curva analítica 2: diluir uma alíquota de 800 µL da *Solução referência 2* em balão volumétrico de 5 mL, com a mistura álcool metílico e água (1:1). Proceder a diluições para obter concentrações de 2, 4, 8, 14 e 16 µg/mL.

Procedimento: injetar, separadamente, 20 µL das *Soluções para curva analítica 1*, 20 µL das *Soluções para curva analítica 2* e 20 µL da *Solução amostra*. Registrar os cromatogramas e medir as áreas sob os picos. O tempo de retenção relativo para ácido gálico e galocatequina é cerca de 8,4 e 10,8 min, respectivamente. Calcular os teores de ácido gálico e de galocatequina, em mg/g, segundo a expressão:

$$T = \frac{c \times 500}{ma \times 1000}$$

Em que,

T = teor de ácido gálico ou de galocatequina em mg/g;

C = concentração de ácido gálico ou de galocatequina em µg/mL em S2, determinada a partir das equações das retas obtidas, considerando a pureza da substância de referência;

500 = fator de diluição;

1000 = valor de conversão de µg para mg;

ma = massa em gramas da amostra utilizada, considerando o teor de água determinado.

5.2.4 Preparação das micropartículas adesivas

5.2.4.1 Planejamento experimental

Será desenvolvido um planejamento experimental 3², sequenciando experimentos com o objetivo de otimizar as condições de processamento, aprimorando determinada resposta (Zhang, Mou, Du, 2007). Os fatores selecionados são: X1, a proporção entre dois polímeros como material de encapsulação, e X2, o teor total de sólidos na dispersão completa antes do processo de secagem por pulverização. Será um planejamento de 3 níveis, com duplicatas no

ponto central. As respostas avaliadas serão: eficiência e produtividade de microencapsulação e produtividade (Y1 e Y2, respectivamente). A matriz do planejamento será montada.

5.2.4.2 Método por *spray-drying*

Serão preparadas suspensões aquosas com os polímeros contendo as frações dos extratos que serão aspergidas em *spray-dryer*. As condições de secagem para a formação das micropartículas serão determinadas por meio de testes preliminares no equipamento. Serão produzidas também micropartículas brancas para comparação.

5.2.5 Caracterização das micropartículas

5.2.5.1 Análise morfológica

A análise morfológica e das características de superfície das substâncias puras e das micropartículas poliméricas adesivas, será realizada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.2.5.2 Análise granulométrica

As determinações do tamanho médio, da distribuição granulométrica, do índice de polidispersão e do potencial zeta das partículas serão realizadas utilizando um equipamento de espalhamento de luz a laser (*Zetasizer*, Malvern, EUA).

5.2.5.3 Análises térmicas

Os ensaios de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG) do fármaco, polímeros, micropartículas e misturas físicas serão executados em um equipamento (DSC 1 Star System, Mettler®) acoplado a um módulo de resfriamento por fluxo de N₂,

atmosfera de N₂ de 50 mL/min, calibrado com padrões de zinco conforme recomendações do fabricante do equipamento.

5.2.5.4 Difração de raios-X

A análise de difração de raios-X das frações, polímeros, micropartículas e misturas físicas será realizada em temperatura ambiente (25,0 °C) em difratômetro de raios-X Siemens® D5000, sob radiação monocromática Cu-K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$), com uma voltagem de 40 kV e corrente elétrica de 30 mA. As amostras serão analisadas com varredura de raios-X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 60° e velocidade do goniômetro de 0,05/min.

5.2.5.5 Determinação do teor de galocatequina e ácido gálico e eficiência de aprisionamento

A determinação do teor de galocatequina e ácido gálico e da eficiência de aprisionamento será realizada após a extração dos ativos das micropartículas utilizando-se o método de quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência previamente validado (Isler et al., 2010).

5.2.5.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* de galocatequina e ácido gálico

O perfil de liberação de *in vitro* de galocatequina e ácido gálico será determinado em um aparelho de liberação composto por células de difusão de Franz modificadas. O aparelho consiste em uma célula de vidro, de formato circular, com capacidade para um volume total de 50,0 mL e com controle de temperatura, por meio de banho termostático.

Será utilizado um volume de 50,0 mL de água purificada como meio de dissolução para garantir uma condição *sink* (Bruschi et al., 2004; Bruschi, 2006), e temperatura de $37,0 \pm 0,5$ °C sob agitação constante com auxílio de barra magnética, utilizando-se membrana de acetato

de celulose como suporte. O volume coletado nos tempos 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h serão analisados em CLAE para quantificação do teor de galocatequina e ácido gálico.

5.2.6 Potencial cicatrizante *in vitro*

5.2.6.1 Cultura de células

Fibroblastos da linhagem celular clone L-929 (ATCC® CCLI™) serão mantidos e cultivados em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) com soro fetal bovino a 10% (SFB, v/v) e penicilina-estreptomicina a 1% a 37,0 °C em uma atmosfera de 5,0% de CO₂ (Chierrito et al., 2019). A suspensão de células cultivadas será dispensada em uma placa de 96 poços (2,5 × 10⁵ células/poço) e incubadas por 24 h a 37,0 °C em uma atmosfera de 5,0% de CO₂ antes do ensaio de viabilidade celular.

5.2.6.2 Ensaio de viabilidade celular

A avaliação de citotoxicidade será realizada em triplicata em três experimentos diferentes, pela metodologia do MTT-tetrazólio (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*), conforme Mosmann (1983), com modificações. Este ensaio será realizado utilizando linhagem celular de fibroblastos, L-929, sendo a linhagem de escolha para os ensaios de cicatrização *in vitro*.

As células L-929 serão tratadas com amostras em variadas concentrações durante 24 h a 37,0 °C em uma incubadora de CO₂ a 5,0% umidificada. Após o tratamento, as células serão lavadas com PBS e 50 µL de MTT (2 mg/mL) serão adicionados, seguido de incubação por 4 h, ao abrigo da luz. O meio será removido e as células serão lavadas seguido pela adição de dimetilsulfóxido (DMSO). A absorvância a 570 nm será determinada em um espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2) e a porcentagem de células viáveis será determinada em relação ao grupo de controle não tratado.

5.2.6.3 Ensaio de cicatrização de feridas *in vitro*

Será feita a análise da migração celular dos fibroblastos em placa de cultura de 6 poços. Pela técnica de *scratch*, uma ferida artificial será feita no centro de cada poço da placa com a ponta de ponteira de 200 μ L estéril. As células serão tratadas com concentrações das micropartículas que não apresentaram citotoxicidade. Serão feitas capturas em microscópio nos tempos 0, 24 e 48 h para a avaliação da cicatrização. Para isso, será feito o cálculo da área das cicatrizes com o *software* ZIESS ZEN 3.9. O ensaio será realizado em triplicata (Nizamutdinova et al., 2009).

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados serão expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças significativas entre os valores serão analisadas pela análise de variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p \leq 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas serão realizadas utilizando o *software* Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

6. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Descrição das atividades	1º Ano												2º Ano											
	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Integralização dos créditos	X	X	X	X	X	X																		
Elaboração do projeto	X	X	X	X	X	X																		
Desenvolvimento da matriz do planejamento experimental							X	X																
Coleta das espécies									X															
Controle de qualidade das espécies									X															
Produção dos EBs										X														
Produção das FAEs										X														
Produção de micropartículas										X	X	X												
Relatório parcial													X											
Caracterização das													X	X	X									

7 RESULTADOS ESPERADOS

Com a realização deste projeto de mestrado, espera-se comprovar a existência de uma possível atividade cicatrizante *in vitro* das micropartículas das frações das cascas de *S. adstringens* e *S. obovatum*. Também, espera-se que haja diferenças entre os resultados, pois, apesar de serem conhecidas pelo mesmo nome popular, possuem mesma indicação e serem do mesmo gênero, ainda assim são espécies diferentes. Além disso, devido a produção das micropartículas, deve existir uma melhora no aspecto de liberação e adesão e, portanto, uma melhora nos resultados. Tendo como base outros estudos de citotoxicidade e cicatrização disponíveis na literatura científica, esperam-se resultados satisfatórios e promissores.

Espera-se publicar os resultados obtidos pelos ensaios realizados nesse trabalho em revistas científicas, além de apresentar em congressos e simpósios. É importante a disseminação do conteúdo obtido visando a contribuição com futuras pesquisas sobre as espécies. Além disso, como impactos sociais, é possível a implementação dessas espécies como formas de tratamentos, como por exemplo na cicatrização.

8. EQUIPE EXECUTORA E LOCAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

8.1 EQUIPE EXECUTORA

- Eloisa Lorenzi da Silva (discente): Responsável por todas as atividades citadas nos cronogramas de execução;
- João Carlos Palazzo de Mello (orientador);
- Raquel Isolani Luvizotto (co-orientadora);
- Alunos de Iniciação Científica.

8.2 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DE EXPERIMENTO

- Laboratório de Biologia Farmacêutica - PALAFITO - Bloco K-80: Laboratório de análise, controle de qualidade, fitoquímica e desenvolvimento em fitoterápicos. Controle de qualidade da droga vegetal, obtenção do extrato e testes propostos na metodologia do estudo (UEM);
- Laboratório de Biologia Farmacêutica - PALAFITO - Bloco T22: Laboratório de analítica e cultura de células (UEM);
- Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa – COMCAP - Bloco B08: Laboratório de Análise e Desenvolvimento de Produtos Naturais e Sintéticos.

9. REFERÊNCIAS

- ALVES, Carlos Antonio Belarmino; SILVA, Simone da; BELARMINO, Nathalia Anastácia Louize da Alustau; SOUZA, Ramon Santos; SILVA, Danielli Rodrigues da; ALVES, Paulo Roberto Rodrigues; NUNES, Guilherme Muniz. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico na feira livre do município de guarabira, paraíba, nordeste do brasil. **Gaia Scientia**, v. 10, n. 4, p. 390-507, 2016.
- ALVES, Tânia Maria de Almeida; SILVA, Andréia Fonseca; BRANDÃO, Mitzi; GRANDI, Telma Sueli Mesquita; A SMÂNIA, Elza de Fátima; SMÂNIA JÚNIOR, Artur; ZANI, Carlos Leomar. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, jun. 2000.
- AUDI, E. A.; TOLEDO, D. P.; PERES, P. G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W. K. V.; MELLO, J. C. P. de; NAKAMURA, C.; ALVES-DO-PRADO, W.; CUMAN, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 3, p. 264-266, maio 1999.
- BERSANI-AMADO, C. A.; NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; MARTINEZ, M.; MELLO, J. C. P. Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL**, 14, F006, 1996, Florianópolis. Resumos. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**: Volume 2 – Monografias, Plantas Medicinais. 6. ed. Brasília: Anvisa, 2019. 745 p.
- BRUSCHI, M.L. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. 2006. 318f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- BRUSCHI, M.L.; FREITAS, O. Oral Bioadhesive Drug Delivery Systems. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v. 31, p. 293–310, 2005.
- CARVALHO, Flávia Chiva; BRUSCHI, Marcos Luciano; EVANGELISTA, Raul Cesar; GREMIÃO, Maria Palmira Daflon. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.** v. 46, n.1, p.1-18, 2010.
- CARVALHO, José Tarcísio Giffoni de; AGUDELO, Juan Sebastian Henao; BALDIVIA, Débora da Silva; CAROLLO, Carlos Alexandre; SILVA, Denise Brentan; SOUZA, Kely de Picoli; CÂMARA, Niels Olsen Saraiva; SANTOS, Edson Lucas dos. Hydroethanolic stem bark extracts of *Stryphnodendron adstringens* impair M1 macrophages and promote M2 polarization. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 254, maio 2020.
- CHIERRITO, Danielly; VILLAS-BOAS, Camila B.; TONIN, Fernanda S.; FERNANDEZ-LLIMOS, Fernando; SANCHES, Andréia C.C.; MELLO, João C.P. de. Using Cell Cultures for the Investigation of Treatments for Attention Deficit Hyperactivity Disorder: a systematic review. **Current Neuropharmacology**, v. 17, n.

10, p. 916-925, 13 set. 2019.

DAS, Atanu Kumar; ISLAM, Md. Nazrul; FARUK, Md. Omar; ASHADUZZAMAN, Md.; DUNGANI, Rudi. Review on tannins: extraction processes, applications and possibilities. **South African Journal of Botany**, v. 135, p. 58-70, dez. 2020.

DOS SANTOS, J. C. D. P.; DE ALMEIDA, S. L.; NOGUEIRA, A. F. A.; MBATNA, A. J.; FERNANDES, M. R. N.; SILVA, C. M. L.; DA SILVA, F. D. F. C.; DO AMARAL, J. F. Plantas medicinais e fitoterapia: saúde, sustentabilidade e biodiversidade. In: Amaral, J. F. **Abordagens Interdisciplinares sobre Plantas Mediciniais e Fitoterapia**. Guarujá-SP. Científica Digital, 2022.

DRAELOS, Zoe Diana (Ed.). **Cosmetic dermatology: products and procedures**. John Wiley & Sons, 2022.

FELIPE, Adriana Meri Mestrim; RINCÃO, Vinicius Pires; BENATI, Fabrício José; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho; GALINA, Karen Janaina; TOLEDO, Cleyton Eduardo Mendes de; LOPES, Gisely Cristiny; MELLO, João Carlos Palazzo de; NOZAWA, Carlos. Antiviral Effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.

FERREIRA, P. M. P.; ARCANJO, D. D. R.; PERON, A. P. Drug development, Brazilian biodiversity and political choices: Where are we heading? **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 26, n. 5, p. 257-274, 2023.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Fabaceae Lindl** in: Flora e Funga do Brasil. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB115>. Acesso em: 25 nov. 2023a.

FLORA E FUNGA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Stryphnodendron** in: Flora e Funga do Brasil. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB23174>. Acesso em: 25 nov. 2023b.

HERZOG-SOARES, Joanna D'Arc; ALVES, Rosangela K.; ISAC, Eliana; BEZERRA, José Clecildo B.; GOMES, Maria H.; SANTOS, Suzana C.; FERRI, Pedro H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 1-2, 2002.

ISHIDA, Kelly; MELLO, João Carlos Pallazo de Mello; CORTEZ, Diógenes Aparício Garcia; DIAS FILHO, Benedito Prado; UEDA-NAKAMURA, Tânia; NAKAMURA, Celso Vataru. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942-949, 6 set. 2006.

ISLER, Ana Cristina; LOPES, Gisely Cristiny; CARDOSO, Mara Lane Carvalho; MELLO, João Carlos Palazzo de; MARQUES, Luís Carlos. Development and validation of a LC-method for the determination of phenols in a pharmaceutical formulation containing extracts from *Stryphnodendron adstringens*. **Química Nova**, v.

33, n. 5, p. 1126-1129, maio 2010.

JORGE, A. S.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; MELLO, J. C. P.; BERTOLINI, D.A. Anti-leishmanial “barbatimão” (*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville, Mimosaceae) extract against promastigotes forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, nov. 1996.

JORGE NETO, José; FRACASSO, José Francisco; CAMARGO NEVES, Maria do Carmo Longo; SANTOS, Luís Eduardo dos; BANUTH, Vera Lucia. Tratamento de úlcera varicosa e lesões de pele com *Calendula officinalis* L. e/ou com *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius. **Revista de Ciências Farmarmacêuticas**, Araraquara, v.17, p.181-186, 1996.

LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP – LPWG. **Caesalpinioideae**. Disponível em: <https://www.legumedata.org/taxonomy/caesalpinioideae/>. Acesso em: 25 nov. 2023.

LI, Ruotao; LIU, Kai; HUANG, Xu; LI, Di; DING, Jianxun; LIU, Bin; CHEN, Xuesi. Bioactive Materials Promote Wound Healing through Modulation of Cell Behaviors. **Advanced Science**, v. 9, n. 10, p. 1-22, 9 fev. 2022.

LIMA, Alexandre G. de; PAULA-SOUZA, Juliana de; RINGELBERG, Jens J.; SIMON, Marcelo F.; QUEIROZ, Luciano P. de; BORGES, Leonardo M.; MANSANO, Vidal de F.; SOUZA, Vinicius C.; SCALON, Viviane R. New segregates from the Neotropical genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). **Phytokeys**, v. 205, p. 203-237, 22 ago. 2022.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SOUZA-JÚNIOR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytother Res**, v. 12, p. 218–220, 1998.

LOPES, Gisely Cristiny; MACHADO, Fátima Aparecida Vieira; TOLEDO, Cleyton Eduardo Mendes de; SAKURAGUI, Cássia Mônica; MELLO, João Carlos Palazzo de. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 12, p. 925-931, dez. 2009a.

LOPES, Gisely Cristiny; NAKAMURA, Celso Vataru; DIAS FILHO, Benedito Prado; MELLO, João Carlos Palazzo de. Estudo físico-químico, químico e biológico de extrato das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 24-27, 2003.

LOPES, Gisely Cristiny; SANCHES, Andréia Cristina Conegero; TOLEDO, Cleyton Eduardo Mendes de; ISLER, Ana Cristina; MELLO, João Carlos Palazzo de. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de *Stryphnodendron* por cromatografia líquida de alta eficiência. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 135-143, mar. 2009b.

LOPES, Gisely Cristiny; SANCHES, Andréia Cristina Conegero; NAKAMURA,

Celso Vataru; DIAS FILHO, Benedito Prado; HERNANDES, Luzmarina; MELLO, João Carlos Pallazo de. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 265-272, jun. 2005.

MARTIUS, Carl Friedrich Philipp von. Herbarium florae Brasiliensis. Munich [publisher not identified], 128 p. 1837.

MAUGERI, Alessandro; LOMBARDO, Giovanni Enrico; CIRMI, Santa; SÜNTAR, Ipek; BARRECA, Davide; LAGANÀ, Giuseppina; NAVARRA, Michele. Pharmacology and toxicology of tannins. **Archives of Toxicology**, v. 96, n. 5, p. 1257-1277, 23 fev. 2022.

MELO, Juliana Oliveira de; ENDO, Tânia Hiromi; BERSANI-AMADO, Luiz Eduardo; SVIDZINSKI, Arthur Estivalet; BARONI, Silmara; MELLO, João Carlos Palazzo de; BERSANI-AMADO, Ciomar Aparecida. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, set. 2007.

MONTEIRO, Márcia Joana Souza; BARBOSA, Wagner Luiz Ramos. Plantas medicinais e sustentabilidade: (re)conhecimento da sociobiodiversidade em comunidades da amazônia, na gestão da APA Algodoal-maiandeuá. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 12, p. 119619-119625, 29 dez. 2021.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983.

NIZAMUTDINOVA, Irina Tsoy; KIM, Young Min; CHUNG, Jong Il; SHIN, Sung Chul; JEONG, Yong-Kee; SEO, Han Geuk; LEE, Jae Heun; CHANG, Ki Churl; KIM, Hye Jung. Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 11, p. 2806-2812, nov. 2009.

ONU BRASIL. **Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODSs)**. 2023. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/sdgs>.

PALERMO, D.; PEREIRA, L. C. M. S.; MELLO, J. C. P.; HERNANDES, L. Atividade cicatrizante do barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville] em feridas cutâneas. **Arq. Apadec.**, Maringá, v. 6, p. 2, 2002.

POWO - PLANTS OF THE WORLD ONLINE. **Fabaceae Lindl.** Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000147-2>. Acesso em: 25 de novembro de 2023a.

POWO - PLANTS OF THE WORLD ONLINE. ***Stryphnodendron Mart.*** Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:23633-1>. Acesso em: 25 de novembro de 2023b.

RINGELBERG, Jens J.; KOENEN, Erik J. M.; IGANCI, João R.; QUEIROZ, Luciano

- P. de; MURPHY, Daniel J.; GAUDEUL, Myriam; BRUNEAU, Anne; LUCKOW, Melissa; LEWIS, Gwilym P.; HUGHES, Colin E. Phylogenomic analysis of 997 nuclear genes reveals the need for extensive generic re-delimitation in Caesalpinioideae (Leguminosae). **Phytokeys**, v. 205, p. 3-58, 22 ago. 2022.
- SANCHES, Andréia Cristina Conegero; LOPES, Gisely Cristiny; NAKAMURA, Celso Vataru; DIAS FILHO, Benedito Prado; MELLO, João Carlos Palazzo de. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 101-107, mar. 2005.
- SANCHES, Andréia C.C.; LOPES, Gisely C.; TOLEDO, Cleyton E.M. de; SACRAMENTO, Luis V.s. do; SAKURAGUI, Cássia M.; MELLO, João C.P. de. Estudo Morfológico Comparativo das Cascas e Folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* - Leguminosae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 362-368, fev. 2007.
- SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; MELLO, J. C. P. DE; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC, cap. 24, p. 615-656, 2006.
- SCALON, Viviane Renata; PAULA-SOUZA, Juliana de; LIMA, Alexandre Gibau de; SOUZA, Vinicius Castro. A synopsis of the genus *Stryphnodendron* (Fabaceae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). **Phytotaxa**, v. 544, n. 3, p. 227-279, 3 maio 2022.
- SCHNEIDER, Lars Alexander; KORBER, Andreas; GRABBE, Stephan; DISSEMOND, Joachim. Influence of pH on wound-healing: a new perspective for wound-therapy? **Archives of Dermatological Research**, v. 298, n. 9, p. 413-420, 8 nov. 2006.
- TOLEDO, Cleyton Eduardo Mendes de. **Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae]**. 2002. 134f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2002.
- TREVISAN, D.A.C.; SILVA, P.V.; FARIAS, A.B.P.; CAMPANERUT-SÁ, P.A.Z.; RIBEIRO, T.D.V.R.; FARIA, D.R.; MENDONÇA, P.S.B.; MELLO, J.C.P.; SEIXAS, F.A.V.; MIKCHA, J.M.G. Antibacterial activity of Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) against *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in silico* studies. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 259-271, 4 jun. 2020.
- VAN GHELUWE, Louise; CHOURPA, Igor; GAGNE, Coline; MUNNIER, Emilie. Polymer-Based Smart Drug Delivery Systems for Skin Application and Demonstration of Stimuli-Responsiveness. **Polymers**, v. 13, n. 8, p. 1-31, 15 abr. 2021.
- WILKINSON, Holly N.; HARDMAN, Matthew J. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. **Open Biology**, v. 10, n. 9, p. 1-14, set. 2020.
- WORLD WIDE FUND FOR NATURE. **Sustentabilidade**: da teoria à prática. da teoria à



pratica. Disponível em: https://www.wwf.org.br/participe/porque_participar/sustentabilidade/. Acesso em: 25 nov. 2023.

XU, Zeyu; DONG, Mei; YIN, Shaoping; DONG, Jie; ZHANG, Ming; TIAN, Rong; MIN, Wen; ZENG, Li; QIAO, Hongzhi; CHEN, Jun. Why traditional herbal medicine promotes wound healing: research from immune response, wound microbiome to controlled delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 195, p. 1-21, abr. 2023.

ZHANG, Lianfu; MOU, Dehua; DU, Yanshan. Procyanidins: extraction and microencapsulation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 12, p. 2192-2197, 24 jul. 2007.

ZHOU, Shengxi; XIE, Mengbo; SU, Jingjing; CAI, Bingjie; LI, Jingan; ZHANG, Kun. New insights into balancing wound healing and scarless skin repair. **Journal of Tissue Engineering**, v. 14, n. 1, jan. 2023.