



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Avaliação das atividades antioxidante e inibitória sobre as
enzimas elastase e colagenase e hialuronidase da *Libidibia*
ferrea MART**

ALINE OLIVEIRA BARROS

MANAUS, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALINE OLIVEIRA BARROS

Avaliação das atividades antioxidante e inibitória sobre as enzimas elastase e colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART

Dissertação apresentada para o Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Biodiversidade Amazônica Aplicada às Doenças Regionais” como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a. Dr. Emerson Silva Lima

Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

MANAUS, 2012

ALINE OLIVEIRA BARROS

Avaliação das atividades antioxidante e inibitória sobre as enzimas elastase e colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART

Plano de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de concentração “BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA APLICADA ÀS DOENÇAS REGIONAIS”.

Aprovada em 24/02/2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. Emerson Silva Lima, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Tatiane Pereira de Souza, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Cecilia Veronica Nunez, Membro Externo
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Aos meus pais, Sandra e Domingos, por me ensinarem a importância do conhecimento desde muito cedo e pelo amor e dedicação.

Aos meus irmãos Daniele e Gustavo, por serem meus grandes amigos e incentivadores.

Ao meu marido Dante, pelo apoio incondicional, amor e compreensão.

Agradecimentos

A Deus, por guiar meus passos e me dar saúde, força e coragem para resistir às dificuldades encontradas ao longo do caminho.

À minha família, pelo apoio, incentivo e amor dispensado a mim em todos os momentos.

Ao meu orientador, grande mestre Prof. Dr. Emerson Silva Lima, por toda sua paciência e por acreditar em mim. Sua orientação foi preciosa e seus ensinamentos serão levados comigo por toda vida.

À minha Co-Orientadora, Prof^a. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos, pela ajuda e orientação.

Aos amigos e companheiros de trabalho, pelo apoio e auxílio durante os experimentos de laboratório: Nívea, Vitor, Tatiana, Jéssica, Gleyce e Rose.

Às minhas amigas maravilhosas, Nadja e Gisah, pelo apoio diário e amizade valiosa.

A todos os colegas do laboratório de Atividade Biológica, pela ajuda e apoio.

À CAPES e à FAPPEAM pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Ciências da Saúde e seu corpo docente, pela oportunidade de ser Mestre.

RESUMO

A pele é o maior órgão do organismo humano e tem finalidade de servir como barreira contra agentes externos. A perda da integridade deste tecido pode causar lesões ou doenças que podem levar a morte. O envelhecimento da pele, que também é um processo natural do organismo, tem suas causas intrínsecas e pode ser acelerado devido a causas extrínsecas, como a exposição à radiação solar, que provoca mudanças físicas para a pele, devido a alterações que ocorrem no tecido conjuntivo através da formação de peróxidos lipídicos, conteúdo das células e enzimas e espécies reativas de oxigênio. Devido ao papel importante na remodelação tecidual nos processos que envolvem saúde e doença da pele, alguns estudos tem mostrado investigações com extratos de plantas como inibidores de enzimas e antioxidantes. A *Libidibia ferrea* Mart. é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpininoideae e que cresce em todo o Brasil largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará. A espécie é conhecida popularmente como jucá, pau-ferro, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi, muiré-itáe. A investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico das cascas e folhas de *L. ferrea* revelou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, curmarinas, esteróides e outros compostos fenólicos, classes de substâncias já citadas na literatura como potenciais antioxidantes e inibidores de enzimas. Foram utilizados extratos da casca e vagem de *L. ferrea* em diferentes concentrações para realizar os testes anti-elastase, anti-colagenase, anti-hialuronidase e teste antioxidante *in vitro* e em células de fibroblastos murinos NIH3T3. O teste anti-elastase, a casca mostrou inibição média constante de 42% nas concentrações de 63 µg/mL até 1000 µg/mL. Na avaliação da atividade inibitória da colagenase, verificou-se que o extrato da casca de *L. ferrea* não apresentou atividade importante nas concentrações testadas (25, 50 e 100 µg/mL), sendo a inibição de 15,2%. Na maior concentração testada (100 µg/mL). o extrato produzido a partir da vagem de *L. ferrea* apresentou maior inibição da atividade enzimática quando comparado com o extrato feito a partir da casca. Apesar dos extratos da casca e vagem de *L. ferrea* terem se mostrado bons varredores de radicais de DPPH no teste *in vitro*, no teste celular com fibroblastos NIT3T3, os extratos, em concentrações não tóxicas, não foram capazes de captar radicais de maneira significativa. Estes resultados demonstram que os extratos de *L. ferrea* podem ser considerados promissores nos estudos referentes a antienvhecimento e doenças da pele.

Palavras-chave: *Libidibia ferrea*, pele, antioxidante, enzimas

ABSTRACT

The skin is the largest organ in the human body and is intended to serve as a barrier against external agents. The loss of integrity of this tissue can cause injury or illness that can lead to death. The aging of the skin, which is also a natural process of the body, has its root causes and can be accelerated due to extrinsic causes, such as exposure to solar radiation, which causes physical changes to the skin, due to changes that occur in the connective tissue through the formation of lipid peroxides, contents of cells and enzymes and reactive oxygen species. Due to the important role in tissue remodeling processes in health and disease involving the skin, some studies have shown investigations with plant extracts as inhibitors of enzymes and antioxidants. The *Libidibia ferrea* Mart. is a tree that belongs to the family Leguminosae-Caesalpininoideae which grows in Brazil widely distributed in North and Northeast, especially in Pernambuco and Ceará. The species is popularly known as “jucá”, “pau-ferro”, “ibirá-obi”, “imirá-itá”, “muirá-obi”, “muiré-itá”. The phytochemical investigation of the hydroalcoholic extract of *L. ferrea* revealed the presence of flavonoids, saponins, tannins, curmarinas, steroids and other phenolic compounds, classes of substances already mentioned in the literature as potential antioxidants and enzyme inhibitors. We used extracts from the bark and pods of *L. ferrea* in different concentrations to perform the tests anti-elastase, anti-collagenase, anti-hyaluronidase test and in vitro antioxidant and in NIH3T3 murine fibroblast cells. The anti-elastase test, the skin showed inhibition constant average of 42% at concentrations of 63 µg / mL to 1000 µg / mL. In assessing the inhibitory activity of collagenase, it was found that the bark extract of *L. ferrea* showed no significant activity at the concentrations tested (25, 50 and 100 µg / mL), and inhibition of 15.2%. At the highest concentration tested (100 µg / mL) extract produced from the pod *L. ferrea* showed greater inhibition of enzyme activity compared with the extract made from the bark. Although the extracts of bark and pods of *L. ferrea* have been shown to be good scavengers of DPPH radicals in vitro test, the test cell with fibroblasts NIT3T3, extracts, in concentrations non-toxic, have not been able to capture radicals significantly. These results demonstrate that extracts of *L. ferrea* can be considered promising in studies on aging and skin diseases.

Key-Words: *Libidibia ferrea*, antioxidant activity and enzymes

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas.....	14
Figura 2 Árvore, Flor e fruto de <i>Libidibia ferrea</i> Mart.....	31
Figura 3 Estrutura dos componentes ativos da <i>Libidibia ferrea</i> Mart.....	32
Figura 4 Curva de atividade antioxidante expressa pela porcentagem de seqüestro de radicais DPPH.....	46
Figura 5 Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoresceína em fibroblastos murinos tratados com a) <i>Libidibia ferrea</i> casca; b) <i>Libidibia ferrea</i> (vagem); e c) quercetina.....	47
Figura 6 Inibição da atividade da colagenase pelo extrato obtido a partir da casca de <i>Libidibia ferrea</i>	49
Figura 7 Inibição da atividade da colagenase por zimografia reversa obtida a partir da casca e vagem de <i>Libidibia ferrea</i>	50
Figura 8 Gráfico área versus concentração obtidos por zimografia reversa para análise da inibição da atividade da colagenase a partir de extrato da casca e vagem de <i>Libidibia ferrea</i>	50
Figura 9 Atividade inibitória da hialuronidase a) <i>Libidibia ferrea</i> (casca); b) <i>Libidibia ferrea</i> (vagem).....	51
Figura 10 Inibição da atividade da hialuronidase pelos extratos obtidos a partir da casca e vagem de <i>Libidibia ferrea</i>	52
Figura 11 Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 24 horas de exposição aos extratos de a) <i>Libidibia ferrea</i> casca; <i>Libidibia ferrea</i> vagem.....	52
Figura 12 Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 48 horas de exposição aos extratos de a) <i>Libidibia ferrea</i> casca; <i>Libidibia ferrea</i> vagem.....	53
Figura 13 Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após	53

72 horas de exposição aos extratos de a) *Libidibia ferrea* casca; *Libidibia ferrea* vagem.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais agentes de defesa antioxidante.....	27
Tabela 2 Atividade inibitória dos extratos de <i>L. ferrea</i> (casca); <i>L. ferrea</i> (vagem) e dos padrões ácido gálico e ácido elágico sobre a elastase in vitro.....	48
Tabela 3 Comparação entre as concentrações inibitórias 50% obtidas pelo ensaio de Alamar Blue para os extratos de <i>L. ferrea</i> casca, <i>L. ferrea</i> vagem e o controle positivo de morte celular doxorrubicina.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitro
μ	micro
PMN	Polimorfonucleares
PDGF	Polimorfonucleares
PDGF	Fator derivado de plaquetas
β (TGF)	Fator de crescimento transformante
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
GAG	Glicosaminoglicano
AH	Ácido hialurônico
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EO	Estresse oxidativo
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
DPPH	Diphenil-picryl-hidrazina
AAPH	2,2-azobis-2-metil-propanimidamida hidroclicóric
EGCG	Galato de epigalocatequina
AAAPVN	N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitrolida
FALGPA	N-[3-(2-furil)acrilóil]-Leu-Gli-Pro-Ala
MMP	Metaloproteinase
DMEM	Meio Dulbecco Modificado

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Cicatrização.....	14
2.2 Enzimas e substrates.....	22
2.3 Estresse oxidativo e os antioxidantes.....	25
2.4 <i>Libidibia ferrea</i>.....	31
3. OBJETIVOS.....	35
3.1 Geral.....	35
3.2 Específicos.....	35
4. METODOLOGIA.....	36
4.1 Extrato de <i>Libidibia ferrea</i> MART.....	36
4.2 Avaliação da atividade antioxidante.....	36
4.2.1 Teste do Diphenylpicrylhidrozy (DPPH).....	36
4.2.2 Determinação da atividade antioxidante em células.....	37
4.3 Ensaio de inibição de elastase.....	38
4.4 Ensaio de inibição de colagenase.....	39
4.5 Ensaio da inibição da hialuronidase.....	41
4.6 Ensaio em células.....	42
4.6.1 Células.....	42
4.6.2 Meios de cultivo.....	42
4.6.3 Procedimentos em cultura de células.....	42
4.6.4 Citotoxicidade por azul de Tripan.....	43
4.6.5 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue.....	44

5. RESULTADOS.....	46
5.1 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>.....	46
5.2 Atividade antioxidante celular.....	48
5.3 Ensaio de inibição da elastase.....	49
5.4 Ensaio de inibição da colagenase.....	50
5.5 Ensaio da inibição da hialuronidase.....	51
5.6 Citotoxicidade pelo ensaio azul de tripan.....	53
5.7 Citotoxicidade pelo ensaio Alamar Blue.....	54
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICES.....	69

1. INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do organismo humano e tem finalidade de servir como barreira contra agentes externos. A perda da integridade deste tecido pode causar lesões ou doenças que podem levar a morte (BALBINO et al., 2005). 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 comportam de forma harmoniosa a fim de garantir a restauração tissular (MANDELBAUM et al., 2003). A classificação considerada mais completa para o processo ordenado e progressivo de cicatrização divide-se em cinco fases principais: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação (FAZIO, ZITELLI e GOLSEN, 2000). A fase de coagulação ocorre imediatamente após o surgimento da ferida, primeiramente com complexa liberação de produtos, favorecendo a hemostasia e a entrada dos fatores inflamatórios (MANDELBAUM et al., 2003). A inflamação está intimamente ligada a fase anterior e além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, esta fase conta com o importante papel da fibronectina, que é sintetizada por vários tipos de células, como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais e que adere à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células e atua facilitando a consolidação do coágulo de fibrina, as células e os componentes da matriz (CLARK, 1998). A proliferação é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita e consiste em três subfases: reepitelização, fibroplastia e angiogênese. A contração da ferida é o movimento centrípeto das bordas da ferida. A remodelação, que é a última fase 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 (MALDENBAUM et al., 2003). A avaliação da lesão é essencial para estabelecer o tratamento apropriado e várias variáveis influenciam esse longo e complexo processo: localização do ferimento, tamanho da lesão, tecidos adjacentes, idade do paciente, estado nutricional e doenças de base (BAJAY et al., 1999). A síntese de colágeno é essencial para a cicatrização de um ferimento e este processo pode ser afetado pela diminuição de ferro, oxigênio, vitamina C e alfa cetogluturato. Estas anomalias enfraquecem a hidroxilação de prolina e lisina que resultam em síntese de colágeno de baixa resistência e conseqüentemente em cicatrização anormal (MAHEATA et al., 2007). Apesar da predominância, no arsenal terapêutico, de substâncias sintéticas, inclusive as antiinflamatórias, nos últimos anos têm-se verificado retomada à valorização de práticas terapêuticas consideradas por muitos profissionais de saúde como populares ou não científicas, inclusive a lenta reincorporação das plantas medicinais como alternativa ou complemento terapêutico (GARROS et al., 2006).

Desse modo, o conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos. Os usuários de plantas

medicinais se utilizam de produtos naturais em virtude do conhecimento de informações terapêuticas populares que vem sendo difundidas ao longo dos séculos (MACIEL et al.,2002).. Este tipo de prática popular desperta o interesse de pesquisadores em estudos que envolvem as mais diferentes áreas do conhecimento, e que tem por objetivo ampliar os conhecimentos científicos a cerca dos conhecimentos populares sobre plantas medicinais.

Plantas medicinais e outros produtos naturais são recursos terapêuticos amplamente utilizados no auxílio da cicatrização de feridas cutâneas (EURIDES *et al.*,1998). Cita-se o uso de tintura de confrei (*Symphytum officinale* L.) (CARVALHO et al.,1991), a papaína (SANCHEZ NETO,1993; NOGUEIRA et al., 2005), a babosa (*Aloe vera*) associada ao própolis (DORNELLES et al., 2002), o açúcar adicionado ao mel (PRATA et al.,1998) a calêndula (*Calendula officinallis*) (FERNANDES, 2003; NETO et al., 1996), extrato aquoso do trigo (*Triticum vulgare*) (MATERA et al., 2002), óleo de girassol (*Helianthus annuus*) (MARQUES et al., 2004), a arnica (*Solidago microglossa* DC) (NETO, 2001) e a rosa mosqueta (*Rosa aff. rubiginosa*) (MARCHINI et al., 1988).

O jucá (*Libidibia ferrea*) é outro exemplar bastante utilizado na medicina popular para tratamento de distúrbios da cicatrização, porém são poucos os trabalhos científicos existentes na literatura respaldando essa terapêutica.

Libidibia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpininoideae e que cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984), sendo conhecida como pau-ferro, jucá, ibirá-obi, imirá-itá, muirá-obi, muiré-itá (PIO CÔRREA,1984). Assim, este trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antioxidante e inibitória

sobre as enzimas elastase, collagenase e hialuronidase do extrato padronizado de *Libidibia ferrea*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cicatrização

A pele é o maior órgão do organismo humano e tem finalidade de servir como barreira contra agentes externos. A perda da integridade deste tecido pode causar lesões ou doenças que podem levar a morte (BALBINO et al., 2005).

A cicatrização consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido (MALDENBAUM et al., 2003).

A perda tecidual pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão, chegando ao tecido celular subcutâneo. A definição de ferida depende do tipo de perda tecidual. As feridas de espessura parcial (derme incompleta) têm reparação pela reepitalização dos anexos epiteliais ou epitélio derivado da pele adjacente não acometida. Como resultado tem-se uma cicatriz praticamente imperceptível. Já as feridas de espessura total necessitam de formação de um novo tecido, o tecido de granulação. Nesse caso, a cicatriz é totalmente perceptível e, muitas vezes, pronunciada (FAZIO et al.; 2000).

O reparo das feridas é um bem orquestrado e altamente coordenado processo que inclui uma série de sobreposição de fases: inflamação, proliferativa ou de granulação, e remodelação da matriz extracelular, como ilustrado na figura 1 (LUO; CHEN, 2005).

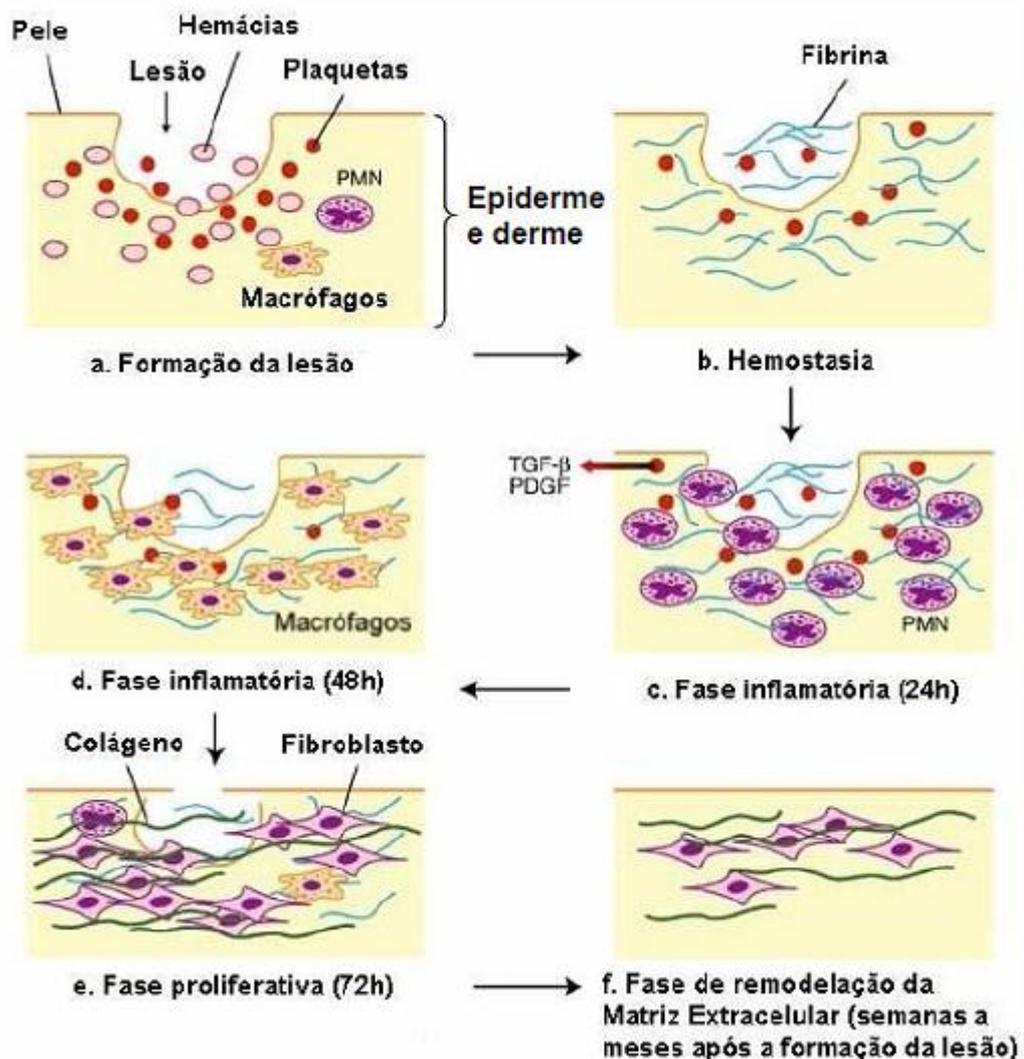


Figura1: Etapas do processo cicatricial de lesões cutâneas
 Fonte: Experts Reviews in Molecular Medicine (2003)

Após a ocorrência do ferimento, inicia-se o extravasamento sanguíneo que preenche a área lesada com plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas. A agregação plaquetária e a coagulação sanguínea geram um tampão, rico em fibrina, que além de restabelecer a hemostasia e formar uma barreira contra invasão de microrganismos (WERNER; GROSE, 2003). A formação do coágulo serve não apenas para coaptar as bordas da ferida, mas também para cruzar a fibronectina, que ajuda a oferecer uma matriz provisória, em que fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (GRINNEL et al., 1981).

As plaquetas, além de essenciais para formação do tampão hemostático, também secretam múltiplos mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas e elementos da matriz extracelular (ARNOLD; WEST, 1991).

A inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria tissular e ficam por período que varia de três a cinco dias, e são eles os responsáveis pela fagocitose das bactérias (MALDENBAUM et al., 2003).

Os monócitos teciduais se infiltram no local da lesão e se diferenciam em macrófagos que participam e concluem o processo inflamatório, realizando um debridamento no local da lesão. O debridamento é facilitado pela fagocitose e pela produção de enzimas como a colagenase e elastase (CLARK, 1998).

Colagenases são metaloproteinases capazes de clivar outras moléculas encontradas dentro da célula, por exemplo, colagenase-2 que pode decompor agelastina, fibronectina, bem como o colágeno (RAFFETO; KHALIL, 2008).

Outro sistema proteolítico envolvido na degradação da matriz extracelular é o das serino proteases, uma delas é a elastase. A elastase faz parte da família das proteases de quimiotripsinas, e é responsável primariamente pela quebra da elastina, que é uma das proteínas mais importantes da matriz extracelular. A elastina tem uma propriedade única de recolhimento elástico, e é fundamental para dar elasticidade a artérias, pulmões, pele e ligamentos (BAYLAC; RACINE, 2004).

As elastases podem decompor elastina, e tem também a capacidade de decompor o colágeno, fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular. Tal como acontece com as metaloproteinases, sob condições normais de atividade, a elastase é necessária após o ferimento, para degradar as proteínas estranhas no

interior da matriz extracelular durante a fagocitose por neutrófilos para permitir o reparo do tecido (RAFFETO; KHALIL, 2008).

O macrófago é a célula mais importante da fase inflamatória (DIEGELMANN et al., 1981) e atua no processo de reparação tecidual, degradando e removendo os componentes do tecido conjuntivo danificado, como colágeno, elastina e proteoglicanas (ARNOLD; WEST, 1991). Os macrófagos permanecem do terceiro ao décimo dia e fagocita bactérias e debrida corpos estranhos. Além desse papel na fagocitose de fragmentos celulares, os macrófagos também secretam fatores quimiotáticos que atraem outras células inflamatórias ao local da ferida e produzem prostaglandinas, que funcionam como potentes vasodilatadores, afetando a permeabilidade dos vasos (SINGER; CLARK, 1999; ARNOLD; WEST, 1991). Os macrófagos produzem vários fatores de crescimento, tais como o derivado de plaquetas (PDGF), o de crescimento transformante- β (TGF- β), o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e o fator de crescimento de células endoteliais (VEGF) que se destacam como as principais citocinas necessárias para estimular a formação do tecido de granulação (SINGER; CLARK, 1999). A interleucina-4 (IL-4) é também secretada por macrófagos e é uma das responsáveis pela formação do tecido conjuntivo (por exemplo, produção de colágeno por fibroblastos) fazendo com que fibroblastos e outras células presentes migrem através das trabéculas de fibrina presentes na lesão (CLARK, 1998).

Os linfócitos aparecem na ferida em aproximadamente uma semana. Seu papel não é bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos (MALDENBAUM et al., 2003).

Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, esta fase inflamatória conta com o importante papel da fibronectina (CLARK, 1998).

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 da matriz (MOSHER; FURCHT, 1981).

A fase proliferativa pode ser dividida em três subfases e é responsável pelo “fechamento” da lesão propriamente dita (MALDENBAUM et al., 2003).

A primeira subfase é a reepitelização e se inicia horas após a lesão, com a movimentação das células epiteliais oriundas tanto da margem como de apêndices epidérmicos localizados no centro da lesão; fibroplastia e angiogênese, que compõem o chamado tecido de granulação responsável pela ocupação do tecido lesionado cerca de quatro dias após a lesão. Os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular necessária ao crescimento celular enquanto os novos vasos sanguíneos carregam oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular local (SINGER; CLARK, 1999).

Na fase de reepitalização ocorre 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 de mitose e hiperplasia do epitélio (BALBIBO; PEREIRA, 2005). Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida (MALDENBAUM et al., 2003).

A segunda fase da proliferação inclui a fibroplasia e 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) (SINGER; CLARK, 1999).

Os fibroblastos infiltrados na área da lesão desempenham, nesse momento, dois papéis significativos: produzir e depositar grande quantidade de elementos da matriz extracelular, principalmente fibras colágenas do tipo I e III, que aumentam a força de tensão da lesão, contribuindo para o fechamento da lesão (CLARK, 1998); diferenciar-se em miofibroblastos, cuja função primordial é neoformação dermal e contração das margens da ferida, alinhando-se a elas e unindo-as. A conversão de fibroblastos em miofibroblastos é realizada por fatores de crescimento como o (TGF- β), expressando a α -actina do músculo liso e tornando-se células musculares lisas capazes de realizar grandes forças contráteis (GOMATHI et al., 2003).

A última etapa da fase proliferativa é a angiogênese. É nesta etapa que são formados novos vasos sanguíneos a partir dos vasos preexistentes. Os novos vasos participam da formação do tecido de granulação provisório e suprem de nutrientes e de oxigênio o tecido em crescimento (ARNOLD; WEST, 1991).

Em resposta a lesão tecidual, a angiogênese é processo dinâmico, finamente regulado por sinais presentes tanto no soro quando na matriz extracelular local. Durante o processo cicatricial, a formação de novos vasos sanguíneos torna-se necessária para a formação do novo tecido de granulação, correspondendo as células dos vasos sanguíneos a cerca de 60% do tecido de reparo. A angiogênese ocorre na matriz extracelular do leito da ferida com a migração e estimulação mitogênica (SINGER; CLARK, 1999).

A última fase do processo de cicatrização é a remodelação da matriz extracelular, que 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

(MALDENBAUM et al., 2003). Nessa fase ocorre uma tentativa da recuperação da estrutura tecidual normal (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

Reformulações dos colágenos, melhoria nos componentes das fibras colágenas, reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura (DOILLON et al., 1985).

A reepitelização, que é o recobrimento da ferida por novo epitélio e consiste tanto na migração quanto na proliferação dos queratinócitos a partir da periferia da lesão, também ocorre durante a fase proliferativa. Esses eventos são regulados por três principais agentes: fatores de crescimento, integrinas e metaloprotases (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009).

A princípio, o colágeno é depositado sobre a fibronectina de maneira aleatória, dependendo da natureza e direção das tensões aplicadas ao tecido. Essas fibras de colágeno são subsequentemente digeridas pela enzima colagenase e formadas novamente, em arranjos similares aos observados no tecido não afetado adjacente. A colagenase é produzida por vários tipos celulares na ferida: leucócitos, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, degradando, especificamente, colágenos tipos I, II e III presentes no tecido conjuntivo. Estas enzimas desfazem a estrutura helicoidal das fibras de colágeno, deixando-as susceptíveis à clivagem enzimática por outras metaloproteases de matriz e proteases (GRINNEL et al., 1981).

Os fibroblastos continuam a ser as células-chave neste processo, pois estes migram até o local da lesão de forma dependente da ativação por enzimas proteolíticas e de componentes das enzimas ativadoras de plasminogênio: sistema plasmina e metaloproteases da matriz. As metaloproteases facilitam a migração dos fibroblastos através da matriz extracelular e leito da lesão (GRINNEL et al., 1981).

Gradativamente, os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Em resultado ao processo de remodelação, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação. O tipo de colágeno secretado inicialmente, na fase proliferativa, era do tipo III que posteriormente, por degradação, é substituído por colágeno tipo I (DOILLON et al., 1985).

A cicatriz passa a apresentar a forma de uma massa fibrótica acrescida de fibras colágenas. Observa-se a apoptose dos fibroblastos e das células endoteliais, e os eosinófilos aparecem nas últimas fases de reparação, possivelmente devido a fatores de crescimento. Os anexos da pele, como folículos pilosos e glândulas sudoríparas sofrem regeneração limitada; a coloração da matriz é pálida, pois a regeneração dos melanócitos é deficitária (MALDENBAUM et al., 2003).

Existem muitos fatores que podem interferir no processo de cicatrização, dentre eles podem ser citados a idade, o estado nutricional do paciente e a existência de doença de base (MALDENBAUM et al., 2003). Várias são as doenças que interferem negativamente no processo de reparo tecidual, como diabetes, esclerose sistêmica, anemia, desnutrição, entre outras. Muitas também são as condições que tornam esse processo de difícil resolução, impedindo ou retardando a completa restauração dos tecidos (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Dentre essas condições podem ser ressaltadas as ressecções extensas da parede abdominal, como aquelas em que a peritonostomia se faz necessária. Por dificultarem, de alguma maneira, o reparo tecidual, essas doenças contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade.(MRUÉ et al., 2004).

2.2 Enzimas e Substratos

O espaço extracelular dos tecidos de animais multicelulares é preenchido com um material geleificado, chamado de matriz extracelular ou, ainda, conhecido como substância fundamental, que mantém unidas as células de um tecido e fornecem uma via porosa para difusão dos nutrientes e do oxigênio para as células individuais, além de migração celular e interação celular ela serve de suporte a pressões. É composta por uma rede de heteropolissacarídeos e por proteínas fibrosas interconectadas, tais como colágeno, elastina, fibronectina e laminina. Os heteropolisacardideos, chamados glicosaminoglicanos (GAG's), são uma família de polímeros lineares compostos por unidades repetitivas de dissacarídeos. Os glicosaminoglicanos estão ligados a proteínas extracelulares para formar os proteoglicanos (LEHNINGER, 2002)

Fibras de colágeno, elastina e GAG`s são produzidas por fibroblastos que são afetados primariamente por fotoagentes resultando em mudanças visíveis como rugas, pigmentação e mudanças na espessura (TAMSYN, 2009).

O colágeno evoluiu no sentido de fornecer a resistência mecânica. É encontrado em tecidos conjuntivos como tendões, cartilagens, na matriz orgânica dos ossos e na córnea dos olhos. A hélice do colágeno é uma estrutura secundária singular, bem distinta de uma alfa hélice. O colágeno apresenta 35% de glicina, 11% de alanina e 21% de prolina de hidroxiprolina (LEHNINGER, 2002).

Existem cerca 15 tipos de colágeno conhecidos. O colágeno do tipo I é o mais abundante e formador de fibrilas (este se associa com o colágeno do tipo V para formar a pele, ossos, ligamentos, tendões, tecido conjuntivo frouxo, etc.). Os colágenos associados a fibrilas são os do tipo IX e XII, que fazem a ligação entre as fibrilas e outros componentes da matriz. O colágeno tipo IV é considerado formador

de rede e forma a lâmina basal juntamente com o colágeno do tipo VII (LEHNINGER, 2002).

As fibrilas do colágeno são estruturas supramoleculares que consistem de moléculas de tripla hélice de colágeno, associadas de diversas maneiras a fim de fornecer diferentes graus de força tensional. O aumento na rigidez e a inelasticidade do tecido conjuntivo à medida que as pessoas envelhecem, resultam de uma acumulação de ligações covalentes nas fibrilas de colágeno (LEHNINGER, 2002).

A elastina, que está presente na matriz extracelular é única proteína com propriedade de recuamento elástico, por isso é vital para dar elasticidade a artérias, pulmões, ligamentos e a pele. A elastase, membro da família da quimiotripsina, é responsável por clivar a elastina que é encontrada na matriz extracelular. Além disso, tem a habilidade de clivar colágeno, fibronectina e outras proteínas da matriz. A colagenase é uma metaloproteinase capaz de clivar moléculas como elastina, fibronectina, gelatina, laminina e colágeno (TAMSYN, 2009)

O Acido Hialurônico (AH) é um glicosaminoglicano (GAG) não sulfatado de alto peso molecular encontrado em altas concentrações nos tecidos sempre que ocorre intensiva proliferação e movimentação de células. É sintetizado na membrana plasmática por um complexo enzimático de vários tipos celulares, representando o principal GAG dos tecidos conjuntivos e é liberado para fora da célula, à medida que é produzido. O Acido Hialurônico também é o principal componente responsável pelas características peculiares da cicatrização fetal (BARBOSA et al., 2008).

O ácido hialurônico auxilia na resistência do tecido à compressão, promove a proliferação e migração dos corneócitos bem como a resposta angiogênica no leito da lesão promovendo a sua reparação (BALBINO et al., 2005)

O mecanismo de degradação enzimática do ácido hialurônico foi descrito por Karl Meyer em 1950. O pesquisador denominou a enzima responsável por esta degradação como hialuronidase, descrevendo também três tipos da enzima, classificadas de acordo com análises bioquímicas e de seus produtos de reação, são elas: 1) Hialuronidases encontradas em mamíferos ou endo- β -N-acetilhexosaminidases; 2) Hialuronidases bacterianas que também são endo- β -N-acetilhexosaminidases mas que diferem no mecanismo de ação; 3) Hialuronidases encontradas em sangue-sugas, parasitas e crustáceos endo- β -glicuronidases.

As hialuronidases são encontradas em vários tecidos e organismos, possuindo grande especificidade pelo tecido e uma ampla variação de pH ótimo. Nos vertebrados, as hialuronidases podem ser divididas em dois grupos: as de atividade neutra, como o pH-20 e aquelas com pH ótimo ácido, como as encontradas no fígado (BALBINO et al, 2005)

Os preenchedores dérmicos compostos por ácido hialurônico são os preferidos para a correção de rugas, sulcos, depressões, melhora do contorno e volume dos lábios, cicatrizes de acne e reposição do volume facial. Múltiplos produtos estão disponíveis variando em relação às características físicas e químicas, o que influi em seus efeitos. Vários deles são registrados e aprovados para uso no Brasil, o que torna importante verificar a existência de estudos clínicos e acompanhar as informações da farmacovigilância para assegurar-se sobre eficácia e, principalmente, segurança. A eficácia do ácido hialurônico já foi demonstrada em diversos estudos. Os efeitos adversos são divididos em imediatos e tardios e podem variar desde equimose, edema e eritemas leves até necrose. A reação imediata à aplicação do ácido hialurônico geralmente consiste na presença de inflamação leve, previsível e que pode variar em intensidade e duração dependendo do produto

utilizado, técnica de aplicação, cuidados de assepsia e resposta imunológica individual (TALARICO et al, 2010).

Estudos recentes dos pesquisadores LENNON e SINGLETON (2011) mostraram que a hialuronidase pode ter papel importante na integridade vascular. Isto ocorre porque a integridade vascular ou integridade da continuidade dos vasos sanguíneos é um processo fundamental regulado, em parte, pelo glicocálix endotelial e pelas junções célula-célula. Defeitos em função da barreira endotelial são um fator inicial no desenvolvimento de várias doenças, incluindo aterosclerose, isquemia/reperfusão, a angiogênese do tumor, metástase de câncer, sepsis, diabetes e lesão pulmonar aguda. O ácido hialurônico, que é um glicosaminoglicano, mantém a integridade vascular através da modulação do glicocálix endotelial, com regulação caveolina enriquecida e interação com ácido hialurônico endotelial das proteínas de ligação. Alguns estados de doença aumentam a atividade de hialuronidase e a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que quebram o ácido hialurônico de alto peso molecular em fragmentos de baixo peso molecular, que causam danos ao endotélio glicocálix. Além disso, esses fragmentos de ácido hialurônico podem ativar proteínas específicas de ligação na doença vascular e promover a reorganização do citoesqueleto de actina e inibir o contato célula-célula endotelial.

2.3 Estresse oxidativo e os antioxidantes

O estresse oxidativo (EO) foi definido há vários anos atrás, como um desequilíbrio entre as moléculas pró-oxidantes e as moléculas antioxidantes em um complexo sistema biológico, onde os oxidantes se sobressaem em relação aos sistemas de defesa (BENZIE, 1996).

As moléculas oxidantes, especialmente as espécies reativas do oxigênio (ERO), são produzidas primariamente pelo metabolismo fisiológico do oxigênio (O_2) de células em condições aeróbias. Estas moléculas são altamente reativas para algumas estruturas celulares, minando ou eliminando suas funções e propriedades biológicas (BENZIE, 1996).

O processo de oxidação tem papel fundamental na produção de energia para atividades biológicas. Entretanto, como resultado desse processo, os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas *in vivo*. Essas moléculas, quando em excesso, podem produzir danos ao DNA, proteínas, lipídios e outras moléculas celulares, causadas pelo estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem sido associado a várias doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, diabetes, úlceras gástricas, doenças cardiovasculares, entre outras condições (VALKO et al., 2007; MURPHY, 2009).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbia, inflamações, peroxissomos, enzimas do citocromo (P-450) e pela exposição à fatores exógenos (ozônio, radiação gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, cigarro). Contudo, na condição de pró-oxidante a condição desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos oxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e

antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES; STAHL, 1993).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Algumas espécies de radicais livres: O_2 (oxigênio singlete), O_2^- (radical superóxido), OH^- (radical hidroxila), NO^- (óxido nítrico), $ONOO^-$ (peroxinitrito), Q^- (radical semiquinona) (BARREIROS; DAVID, 2006).

Entre as principais formas reativas de oxigênio o O_2^- apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o OH^- mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (SIES, 1993). Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e pela redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz”. Estes agentes que protegem as células contra os efeitos dos

radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (Tabela 1) (BIACHI e ANTUNES, 1999).

Não-Enzimático	Enzimático
<p>α-tocoferol (vitamina E)</p> <p>β-caroteno</p> <p>Ácido ascórbico (vitamina C)</p> <p>Flavonóides</p> <p>Proteínas do plasma</p> <p>Selênio</p> <p>Glutaciona</p> <p>Clorofilina</p> <p>L-cisteína</p> <p>Curcumina</p>	<p>Superóxido desmutase</p> <p>Catalase</p> <p>NADPH-quinona oxidoreductase</p> <p>Glutaciona peroxidase</p> <p>Enzimas de reparo</p>

Tabela 1 - Principais agentes de defesa antioxidante.
Fonte: BIANCHI e ANTUNES, 1999.

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção dos organismos. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. Outro mecanismo de proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais. Esse processo está relacionado com a remoção de danos da molécula de DNA e a reconstituição das membranas celulares danificadas. Em algumas situações pode

ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração desses radicais com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes (BARREIROS; DAVID, 2006).

O envelhecimento da pele é um processo complexo que envolve vários fatores genéticos, ambientais e mecanismos hormonais. Pode-se diferenciar entre o envelhecimento cronológico intrínseco e extrínseco; e o envelhecimento "ambiental"; os dois processos ocorram em conjugação com os outros e são sobrepostas umas sobre as outras (BOGDAN ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Com o avanço da idade do indivíduo a estrutura, as propriedades e a composição da pele variam consideravelmente. No envelhecimento cronológico cutâneo, ocorre a modificação do material genético por meio de enzimas, alterações proteicas e a proliferação celular decresce. O tecido aos poucos perde a elasticidade, a capacidade de regular as trocas aquosas e a replicação do tecido se torna menos eficiente. Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de espécies reativas de oxigênio aceleram esse fenômeno de envelhecimento (HIRATA, 2004).

Muitos antioxidantes têm sido utilizados há muitos séculos nas culturas antigas e modernas em todo o mundo pra várias doenças. Além de sua atividade antioxidante propriamente dita, a maioria deles possui inúmeras atividades biológicas, como por exemplo, anti-inflamatória, cicatrizante e anticarcinogênico (BOGDAN ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

O licopeno, um poderoso antioxidante, é um carotenóide encontrado em frutas vermelhas e vegetais. Seus efeitos quimiopreventivos em tumores tem sido comprovados em modelos animais (LIN et al., 2003).

Já a vitamina C, outro potente antioxidante, pode ser obtido nos humanos exclusivamente a partir de alimentos, como frutas cítricas. A vitamina C existe predominantemente na sua forma reduzida, o ácido ascórbico. O uso tópico de vitamina C tem sido estudado como fotoprotetor *in vitro* e *in vivo*, demonstrando

seus efeitos na prevenção dos danos causados pelo sol, reduzindo queimaduras solares e diminuindo eritemas quando expostos a raios solares UVA e UVB. A vitamina C também tem papel importante no processo de cicatrização, pois é importante fator no processo de síntese de colágeno e sua adição em fibroblastos humanos tem demonstrado aumento na produção de colágeno. Ao mesmo tempo, pode diminuir a produção de elastina por um mecanismo ainda desconhecido (BOGDAN ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Os radicais livres desempenham um papel central no âmbito dos fatores intrínsecos e extrínsecos de envelhecimento. Durante o processo de envelhecimento cronológico, os radicais livres são formados naturalmente através do metabolismo humano normal, que, no processo de envelhecimento extrínseco, que são produzidos por fatores exógenos, como a exposição à radiação UV, tabagismo e consumo de álcool. Pelo menos 50% de UV induzida por danos à pele é estimado para ser atribuível à formação do UV-induzida de radicais livres (LIN et al., 2003)

Além disso, como parte do processo natural de envelhecimento, diminuem os mecanismos de defesa endógenos, enquanto aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, resultando em envelhecimento acelerado da pele (BOGDAN ALLEMANN; BAUMANN, 2008).

Entre as substâncias naturais, os compostos fenólicos tem mostrado grande importância por causa da sua formação estrutural química ideal para remoção dos radicais livres, através da doação de um átomo de hidrogênio ou de um elétron. Os compostos fenólicos tem propriedades antioxidantes principalmente devido às suas propriedades redox, que permitem que eles ajam como agentes redutores, doando hidrogênios e pelo potencial de quelação de metais (KHOKHAR e APENTEN, 2003).

Os efeitos das plantas medicinais tem sido atribuídos, em parte, à presença de compostos fenólicos, que podem exercer seus efeitos como resultado de suas propriedades antioxidantes (KAUR et al., 2008).

2.4 *Libidibia ferrea*

Libidibia ferrea é a nova nomenclatura para a *Caesalpinia ferrea*, devido a isso, todo o referencial bibliográfico é baseado na pesquisa de *Caesalpinia ferrea*. A *Libidibia ferrea* espécie é conhecida popularmente como Jucá, Pau-ferro, Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi, Muiré-itáe pertencente à família Leguminosae-Caesalpininoideae. É uma árvore de grande porte e caule rijo encontrado principalmente no norte e nordeste do Brasil. A planta possui folíolos pequenos, flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, do tipo legume ou vagem lisa, dura e aromática com sementes escuras, com 10-15 metros de altura, com diâmetro de tronco entre 40-60 cm e é de fácil reconhecimento devido à presença de manchas claras no tronco (BORRÁS, 2003; MATTA, 2003; RIZZINI, 1995).

Sua floração ocorre na estação seca até início da estação chuvosa e a frutificação ocorre no final da estação seca e se prolonga pela estação chuvosa. Tem anualmente uma alta produção de frutos. As sementes apresentam germinação numa amplitude térmica de 15 a 40°C e podem ser armazenadas por pelo menos oito meses (GALDINO et al., 2007).



Figura 2: I – Árvore, II – Flor, III- Fruto de *Libidibia ferrea*

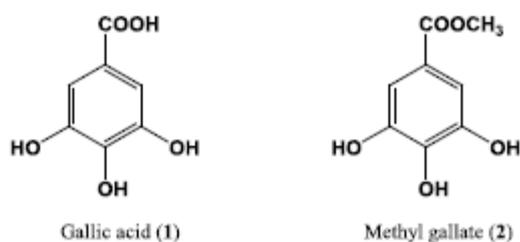
Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/pferro>. Acesso em 22/04/2010.

A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitadas para plantios em áreas degradadas, além de fornecer lenha e madeira para construção civil (LORENZI, 2002).

Algumas propriedades terapêuticas tem sido descritas, e incluem, ação antiulcerogênica (BACCHI et al., 1995), anti-inflamatória e também atividade de analgesia (CARVALHO et al., 1996). O tratamento de feridas e contusões; e o alívio da tosse crônica e asma também são importantes propriedades da *Libidibia ferrea* (CARVALHO et al., 1996).

O chá da casca de *Libidibia ferrea* tem sido usado para o tratamento de diabetes (ARAÚJO et al., 2008). Outras propriedades terapêuticas dessa planta incluem ação anti-câncer (NOZAKI et al., 2007), antibacteriana (SAMPAIO et al., 2009) e anti-hipertensiva (MENEZES et al., 2007).

O ácido elágico e o metil galato são dois componentes ativos extraídos dos frutos de *Libidibia ferrea* e são apontados como responsáveis pelas atividades farmacológicas atribuídas a essa parte da planta (Figura 3) (NAKAMURA et al., 2002).



Ácido elágico

Metil galato

Figura 3: Estrutura dos componentes ativos da *Libidibia ferrea*
 Fonte: Nakamura et al., 2002.

Compostos isolados de *L. ferrea* inibem a aldose redutase cuja função é de converter glicose em sorbitol. O acúmulo de níveis elevados de sorbitol nas células, como ocorre nos casos de diabetes, diminui a integridade osmótica e causa dano celular (UEDA, et al., 2001).

A análise de dois compostos isolados dos frutos de *L. ferrea*, o ácido gálico e o metil galato, mostraram efeitos significativos no decréscimo do número de papilomas em ratos em dois estágios da carcinogênese. Os constituintes ativos responsáveis por essa ação são o ácido gálico e o metil galato (NAKAMURA, et al., 2002).

A infusão da casca do caule é utilizada para tratar diarreia e enterocolite (CARVALHO et al., 1996).

O extrato aquoso mostrou-se eficaz no estímulo a mielopoiese frente à listeriose e tumor ascítico de Ehrlich em ratos, promovendo certa proteção contra a dose letal de *Listeria monocytogenes* e aumentando a sobrevivência dos animais em estudo (QUEIROZ et al., 2001).

Plantas do mesmo gênero (*Libidibia* L.), que é utilizada para tratamento de infecções na garganta e outras infecções orais, tem propriedade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SAMPAIO et al., 2009).

Estudos recentes observaram que uma variedade de agentes químicos e físicos, incluindo as substâncias naturalmente encontradas nas plantas, foram associadas com toxicidade reprodutora masculina (WANG, 2010). Outro trabalho sugere que a utilização crônica de *L. ferrea* não interfere com o funcionamento normal do sistema reprodutor do rato Wistar (LEDA, 2010). A *L. ferrea* também mostrou um potencial para o ramo da cosmetologia com a atividade inibidora da tirosinase, reduzindo a melanogênese (LIZARDO, et al. 2011).

A investigação fitoquímica do extrato hidroalcoólico das cascas e folhas de *Libidibia ferrea* revelou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, curmarina, esteróides e outros compostos fenólicos (GONZALEZ et al., 2004), classes de substâncias já citadas na literatura como potenciais antioxidantes e inibidores de enzimas . Os taninos são os componentes principais (SOUZA et al., 2006).

A quantidade de polifenóis no extrato hidrometanólico bruto de *L. ferrea* é estimado em 7,3 %. Os polifenóis são sugeridos como responsáveis pela atividade antibacteriana na inibição da formação do biofilme dental (SAMPAIO et al., 2009).

A análise do extrato aquoso de *L. ferrea* sobre os efeitos cardiovasculares, demonstrou que essa espécie age como indutor da hipotensão associada a taquicardia, aparentemente por abertura dos canais ATP-sensíveis de K⁺, demonstrando um potencial uso clínico para doenças cardiovasculares (MENEZES, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as atividades antioxidante e inibitória sobre as enzimas elastase, colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART.

3.2 Específicos

Avaliar a citotoxicidade do extrato padronizado de *Libidia ferrea*.

Conhecer o potencial antioxidante do extrato padronizado de *Libidibia ferrea* *in vitro* e em cultura de células.

Investigar a atividade inibitória do extrato padronizado de *Libidibia ferrea* sobre as enzimas elastase, colagenase e hialuronidase *in vitro*.

Avaliar e comparar a atividade inibitória do extrato padronizado de *Libidibia ferrea* sobre a enzima colagenase *in vitro* através da zimografia.

4. METODOLOGIA

4.1 Extrato de *Libidibia ferrea* Mart.

Foram coletadas cascas e vagens, sem as sementes, de *Libidibia ferrea* obtidas de cultivo experimental do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA). Após secagem e trituração da matéria prima vegetal em moinhos de facas foram preparados extratos aquosos, hidroetanólicos e etanólicos das vagens ou das cascas por maceração estática (48 h) com uma relação droga solvente de 7,5%. Em seguida o solvente foi evaporado por secagem por aspersão (spray drier) e o material seco (extrato) foi armazenado a -20° C até a realização dos experimentos.

O extrato utilizado para os testes que seguem abaixo foi o extrato aquoso 7,5% tanto da vagem quanto da casca de *Libidibia ferrea*, pois foi o que apresentou melhores resultados nos testes preliminares a este trabalho.

4.2 Avaliação da atividade antioxidante

4.2.1 Teste do Diphenylpicrylhidrazyl (DPPH)

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos da casca e vagem de *Libidia ferrea*, foi avaliada a reação entre diferentes concentrações do extrato (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78 µg/mL) e a solução alcoólica de DPPH (MOLYNEUX, 2004). Foram pesados 2 mg de DPPH (Diphenil-picryl-hidrazina) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto. Para conhecer a absorbância dos brancos específicos (A1), em uma placa de 96 poços foram adicionados 0,250 mL das diluições dos extratos em triplicata e as absorbâncias foram mensuradas a 492 nm no leitor de Elisa DTX Beckman Coulter. Após a primeira leitura, adicionou-se 0,100 mL da solução de

DPPH e a placa permaneceu incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, decorridos os quais, realizou-se a segunda leitura (A2) e foi mensurada a redução do radical livre DPPH a 492 nm.

Como controle negativo utilizou-se 0,250 mL de etanol mais 0,100 mL de solução de DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do DPPH, calculado segundo a equação abaixo (onde A1= absorbância 1 e A2 = absorbância 2). (Kim et al., 2002).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra}) \times 100 / (A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle})$$

A determinação da concentração de eficiência mediana do DPPH (CE₅₀) ou seja, a concentração do extrato que causa 50% da cor do DPPH, foi obtida por regressão linear simples dos pontos plotados graficamente no programa Origin 6.0. Os resultados obtidos dos extratos foram comparados com uma curva de atividade de diferentes concentrações de Trolox, um controle positivo de atividade antioxidante.

4.2.2 Determinação da atividade antioxidante em células

A atividade antioxidante em células foi avaliada no fibroblasto NIH 3T3 segundo o método descrito por WOLFE e LIU (2007). Foram semeadas 6×10^4 células por poço em placa de 96 poços. As cavidades externas da placa não foram utilizadas por aumentarem a variação dos resultados. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂ a 37 °C, o meio foi removido, os poços foram lavados com tampão fosfato e as células foram tratadas em triplicata com 100µL de uma solução de meio contendo 10% de SFB, 25µmol de diclorofluoresceína e diferentes concentrações dos extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea* (0; 3,125; 6,25;

12,5; 25 e 50 µg/mL) ou da quercetina (0; 2,5; 5 e 10µg/mL). Após uma hora de tratamento o meio foi removido e as células foram novamente lavadas com tampão fosfato, o tampão foi removido e foram adicionados 100µL de 2,2-azobis-2-metilpropanimidamida, dihidroclorico (AAPH) e iniciaram-se imediatamente leituras no leitor de microplacas com excitação 485nm e emissão 535nm a cada 10 minutos até 60 minutos. A quercetina foi utilizada como padrão positivo de atividade antioxidante. Os poços controle contiveram células tratadas com diclorofluoresceína e o AAPH e os poços branco contiveram células tratadas com diclorofluoresceína sem o AAPH. De todas as concentrações de amostras foi subtraído o valor de fluorescência do branco no respectivo tempo. O potencial antioxidante foi expresso em unidades de fluorescência. A concentração inibitória mediana (CI₅₀) foi calculada para o tempo de 60 minutos conforme a formula abaixo, onde:

$\Delta F = \text{fluorescência aos 60 minutos} - \Delta \text{fluorescência aos 0 minutos}$ e

$\% \text{ inibição} = 100 - (\Delta F \text{ Amostra} / \Delta F \text{ Controle}) \times 100$

4.3 Ensaio de inibição de elastase

O ensaio foi baseado no método de Kim et al. (2004) . Este ensaio foi realizado em tampão Tris-HCL 60 mM (pH 7,5) e 5% DMSO. A elastase pancreática suína (PE – E.C.3.4.21.36) foi dissolvida para fazer uma solução estoque 1:10 em água estéril. O substrato N-Succinil-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilida (AAPVN) foi dissolvido em tampão a 10 mM. Os extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea*, o padrão e o branco foram incubados com a enzima e o tampão por 5 minutos em estufa 37 °C utilizando-se pacas de 96 poços. Como controle positivo foram utilizados ácido gálico e ácido elágico. A água serviu como controle negativo. Após este período, 25 µL do substrato AAPVN foram adicionados e só assim a primeira

leitura foi realizada em absorvância 405 nm. Após esta primeira leitura a placa foi novamente incubada por 1 hora em estufa 37 °C. A segunda leitura foi realizada logo após o encerramento do período de incubação na mesma absorvância da primeira leitura. O cálculo foi feito segundo a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra}) \times 100 / A2 - A1 \text{ controle}$$

4.4 Ensaio de inibição da colagenase

O ensaio foi baseado no método espectrofotométrico descrito por Van Wart; Steinbrink (1981) com pequenas modificações, pois o teste foi adaptado para realização em microplaca de 96 poços. O ensaio foi realizado em tampão Tricine (pH 7.5 com 400 mM NaCl e 10 mM CaCl₂). A colagenase de *Clostridium histolyticum* (ChC-EC.3.4.23.3) foi dissolvida em tampão para uso em uma concentração inicial de 0,8 unidades/mL de acordo com os dados do fornecedor. O substrato sintético N-[3-(2-furil) acrilóil]-Leu-Gli-Pro-Ala (FALGPA) foi dissolvido em tampão Tricine para 2 mM. Os extratos padronizado de *Libidibia ferrea* foram incubados com a enzima em tampão por 15 minutos antes de adicionar o substrato para o início da reação. A mistura final da reação (volume total 160µL) continha tampão Tricine (80 µL), 0,8 mM FALGPA (40 µL), 0,1 unidades ChC (20 µL) e 20 µL do tampão, controle ou inibidor em estudo. A absorvância foi medida em 335 nm imediatamente após a adição do substrato e continuamente a cada 5 minutos utilizando leitor de microplaca 96 poços (TP-Reader, Thermoplate, Itália). Como controle positivo foi usado galato de epigalocatequina (EGCG) 250 µM (0,114 mg/mL). O controle negativo foi feito com água. A porcentagem de inibição da colagenase pelo extrato foi calculada conforme a fórmula abaixo.

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{(A2_{teste} - A1_{teste})}{(A2_{controle} - A1_{controle})} \times 100$$

A zimografia é uma técnica que permite avaliar a atividade e identificar as metaloproteinases (MMP's) pela degradação do seu substrato e peso molecular. Nesta técnica, as proteínas são separadas por eletroforese (diferença de carga) em gel e em condições necessárias para a ativação das enzimas há degradação do substrato.

A técnica foi realizada de acordo com SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF (2005) com algumas adaptações feitas no laboratório.

Após a preparação de todas as soluções que seriam utilizadas nesta técnica, partiu-se para a montagem da corrida eletroforética. Primeiramente, as placas de vidro foram limpas com etanol 70° GL e posicionadas no módulo central de corrida. A solução de resolução (gel 10%) foi preparada sem que fosse adicionado o agente polimerizante TEMED, pois este foi adicionado apenas no momento da montagem do gel no módulo central da eletroforese. Após a adição do TEMED ao gel, essa mistura foi imediatamente colocada com ajuda de micropipetas entre as placas de vidro, evitando a formação de bolhas. O pente que serviria como molde para os poços das amostras foi imediatamente colocado. O módulo central foi encaixado no tanque de eletroforese e a cuba foi preenchida com tampão de corrida (1:10) até a marca correspondente, deixando o gel em contato com o tampão. Após 20 minutos (tempo necessário para polimerização do gel), o pente foi retirado e 2 µL das amostras foram colocadas no poço do gel. As amostras testadas nesta análise foram a enzima colagenase 1mg/mL e os extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea* nas concentrações 200, 100 e 50 µg/mL que tiveram contato prévio com a enzima colagenase 1mg/mL de no mínimo 15 minutos antes da corrida. Após a preparação das amostras, iniciou-se a corrida da eletroforese com voltagem 110V por 120

minutos. Após este tempo de corrida, o gel foi retirado das placas de vidro e foi transferido para a solução de lavagem Triton 2,5% por 60 minutos em temperatura ambiente e sob agitação constante de 30rpm. Após este passo, o gel foi lavado por 3 vezes em água mili-Q. e então transferido para a solução de incubação e ficou *overnight* (18h) em estufa 37°C sob agitação de 30 rpm. Depois deste processo, o gel precisava ser revelado na solução corante de Coomassie Blue ® por 30 minutos. Então o gel foi descorado com a solução descorante (mistura de ácido acético, metenol e água) até que fossem observadas as bandas correspondentes às várias proteínas. Após a descoloração, o gel foi transferido para um recipiente com água Mili-Q e depois foi colocado em duas folhas de transparência e então scaneado para o programa do computador.

4.5 Ensaio da inibição da hialuronidase

O ensaio foi realizado segundo REISSIG et al (2011) com algumas adaptações. O teste foi feito, inicialmente, em tubos de hemólise nos quais foram colocados 30 µL de o padrão/ inibidor (extrato)/ controle negativo. Após este passo, foram colocados 125 µL de ácido hialurônico e 15 µL da enzima hialuronidase e incubou-se por 40 minutos a 37 °C. Após a incubação, foram adicionados 40 µL de tetraborato de potássio e os tubos foram colocados em banho de ebulição por 3 minutos. Os tubos foram esfriados em torneira e só então foram adicionados 90 µL de DMAB (Dimetilaminobenzaldeído). Os tubos passaram por nova incubação a 37 °C por 20 minutos. Após esta fase, o volume contido no tubo foi transferido para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em aparelho leitor de ELISA a 560nm. A rotina foi utilizada como controle positivo.

4.6 Ensaios em células

4.6.1 Células

Foram utilizadas culturas de fibroblastos primárias e estabelecidas para que se possa analisar qual tivesse melhor desempenho no estudo. As células de fibroblastos que foram utilizadas eram NIH 3T3. As células foram doadas gentilmente pela professora Silvy Stuch Maria-Engler do laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP).

4.6.2 Meios de cultivo

Os fibroblastos foram cultivados DMEM (Meio Dulbecco Modificado ou Dulbecco's Modified Eagles Medium) com 10% de soro fetal bovino. Todas as células foram incubadas a 37° C e atmosfera úmida com 5% CO₂.

4.6.3 Procedimentos em cultura de células

As células foram cultivadas em garrafas e mantidas em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂ e manipuladas em fluxo laminar conforme procedimentos estéreis. Antes da manipulação foi feita antiseptia com álcool 70GL do fluxo e de todos os materiais nele inseridos.

Quando necessário, as células foram congeladas. O meio de congelamento das células foram preparados com 10% de DMSO, 20% de soro e os demais componentes anteriormente citados.

Para o congelamento, as células foram descoladas com tripsina e ressuspensas nos meios de cultura respectivos, centrifugadas por 5 minutos a 1000 RPM, após isso, o sobrenadante será desprezado e o precipitado foi ressuspensado em meio de congelamento e distribuído em tubos criogênicos. As

células foram congeladas por 1 hora a -200°C , 24h a -70°C e definitivamente no nitrogênio líquido. Para o descongelamento, os tubos criogênicos foram aquecidos na mão. Tão logo tenham descongelado, foram ressuspensos em meio de cultivo sem DMSO em tubo falcon, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante com o crioconservante foi desprezado e o precipitado ressuspensado em meio de cultivo.

4.6.4 Citotoxicidade por Azul de Tripán

Antes de realizar os ensaios de avaliação da atividade antioxidante em fibroblastos, foi avaliada a citotoxicidade do extrato padronizado de *Libidibia ferrea* nos fibroblastos para determinar a toxicidade do extrato para essas células e para que os ensaios de avaliação da atividade antioxidante fosse realizado apenas nas concentrações não tóxicas do extrato para os fibroblastos.

O corante Azul de Tripán ou Azul Niágara é uma substância macromolecular impermeável em membrana de células viáveis, somente membranas alteradas são permeáveis ao corante, podendo, portanto, ser coradas por ele. (FRESHNEY, 2005).

Para avaliar a citotoxicidade do extrato padronizado de *Libidibia ferrea* as células de fibroblastos foram plaqueadas na quantidade de 30.000 células por poço em três placas de 24 poços para avaliação da citotoxicidade após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato da planta (60, 55, 50, 45, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorubicina (5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,05 e 0 μM).

Passado o tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) as células foram tratadas com tripsina, transferidas para microtubos e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em 30 μ L de DMEM e 30 μ L de Azul de Trypan. As células mortas (Azuis) e viáveis (não coradas) foram contadas em câmara de Neubauer usando microscópio óptico (ALBUQUERQUE, 2008).

4.6.5 Citotoxicidade pelo ensaio do alamar Blue

A citotoxicidade do extrato em NIH3T3 foi verificada pelo método de alamar blue segundo Nakayama et al. (1997). Para avaliar a citotoxicidade do extrato de *Libidibia ferrea* por este método as células foram semeadas na concentração de 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações do extrato da casca e vagem de *Libidibia ferrea*. As concentrações testadas em NIH3T3 em 24, 48 e 72 horas foram 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 μ g/mL. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorubicina (0 a 25 μ g/mL).

O alamar blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o Alamar Blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/ célula viável).

Uma vez tratadas as culturas celulares descritas anteriormente com diferentes concentrações do extrato aquoso durante tempos variados foi feita a contagem das

células viáveis pós exposição, para então determinarmos o potencial citotóxico do extrato de jucá em estudo.

Passado o tempo de tratamento pretendido (24, 48 e 72 horas) foram adicionados 10 μ L de resazurina na respectiva triplicata de tratamento (0,2%). Como branco da reação foram lidos os poços com célula e extrato sem resazurina. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado para cada tipo celular (3 h para NIH) foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde:

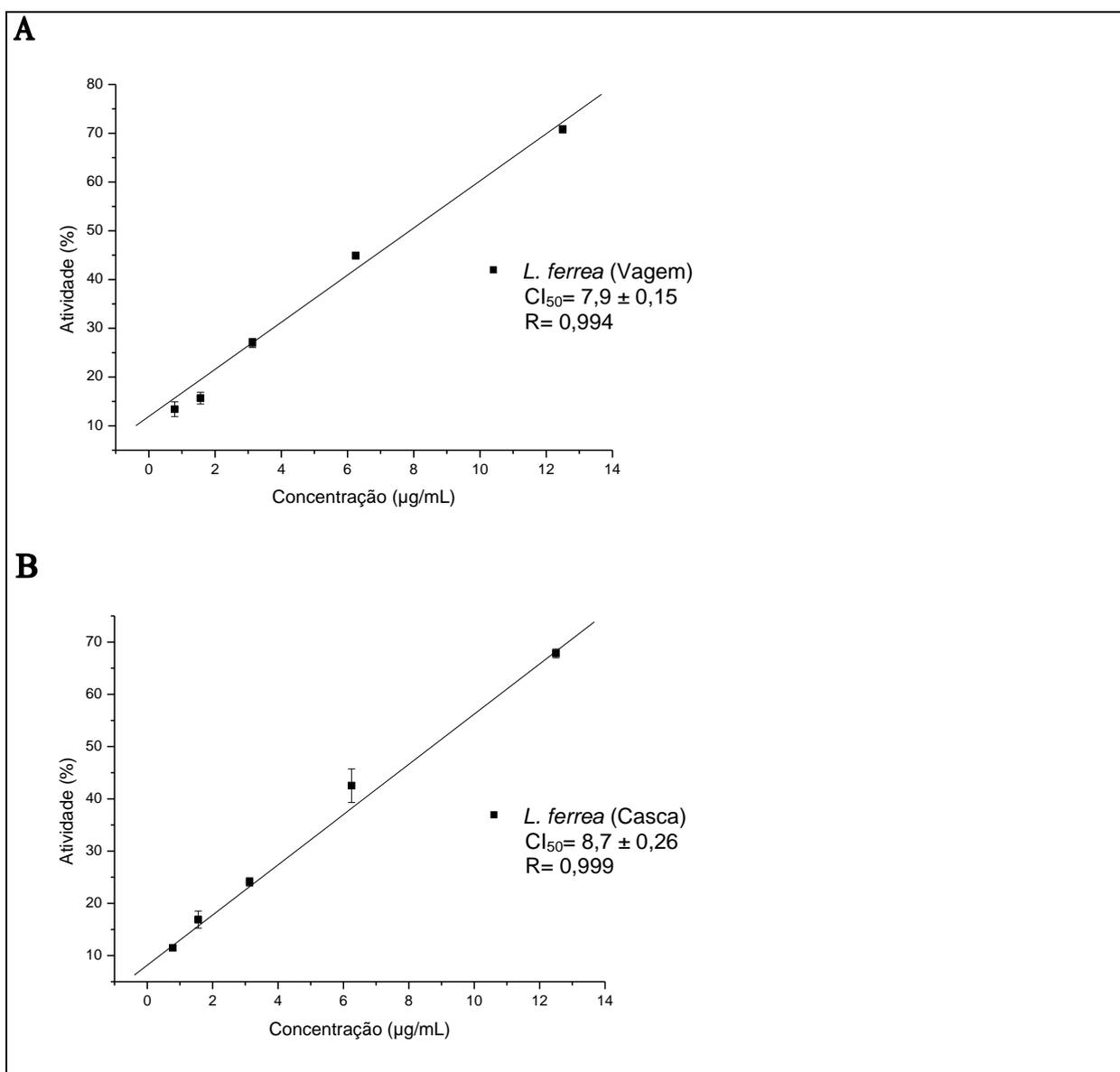
ΔF_t = (fluorescência da célula + meio + extrato + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + extrato) e ΔF_c = (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO)

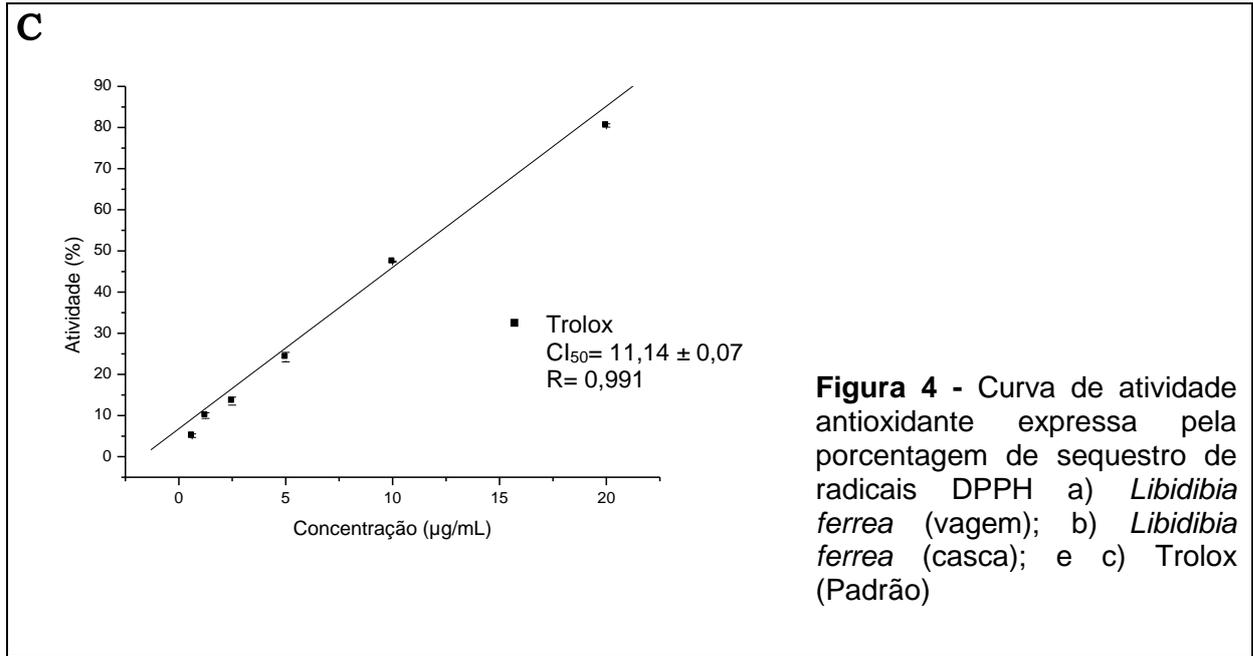
$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\Delta F_t \times 100}{\Delta F_c}$$

5. RESULTADOS

5.1 Atividade Antioxidante *in vitro*

A figura ilustra as curvas de inibição de radicais DPPH pelo Trolox e pelos extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea*. A figura mostra as respectivas porcentagens das concentrações inibitórias medianas médias (CI_{50}).





5.2 Atividade antioxidante celular

A figura mostra o crescimento da fluorescência que indica a oxidação das células NIH3T3 tratadas com diclorofluoresceína na presença de quercetina e de diferentes concentrações dos extratos de *Libidibia ferrea*.

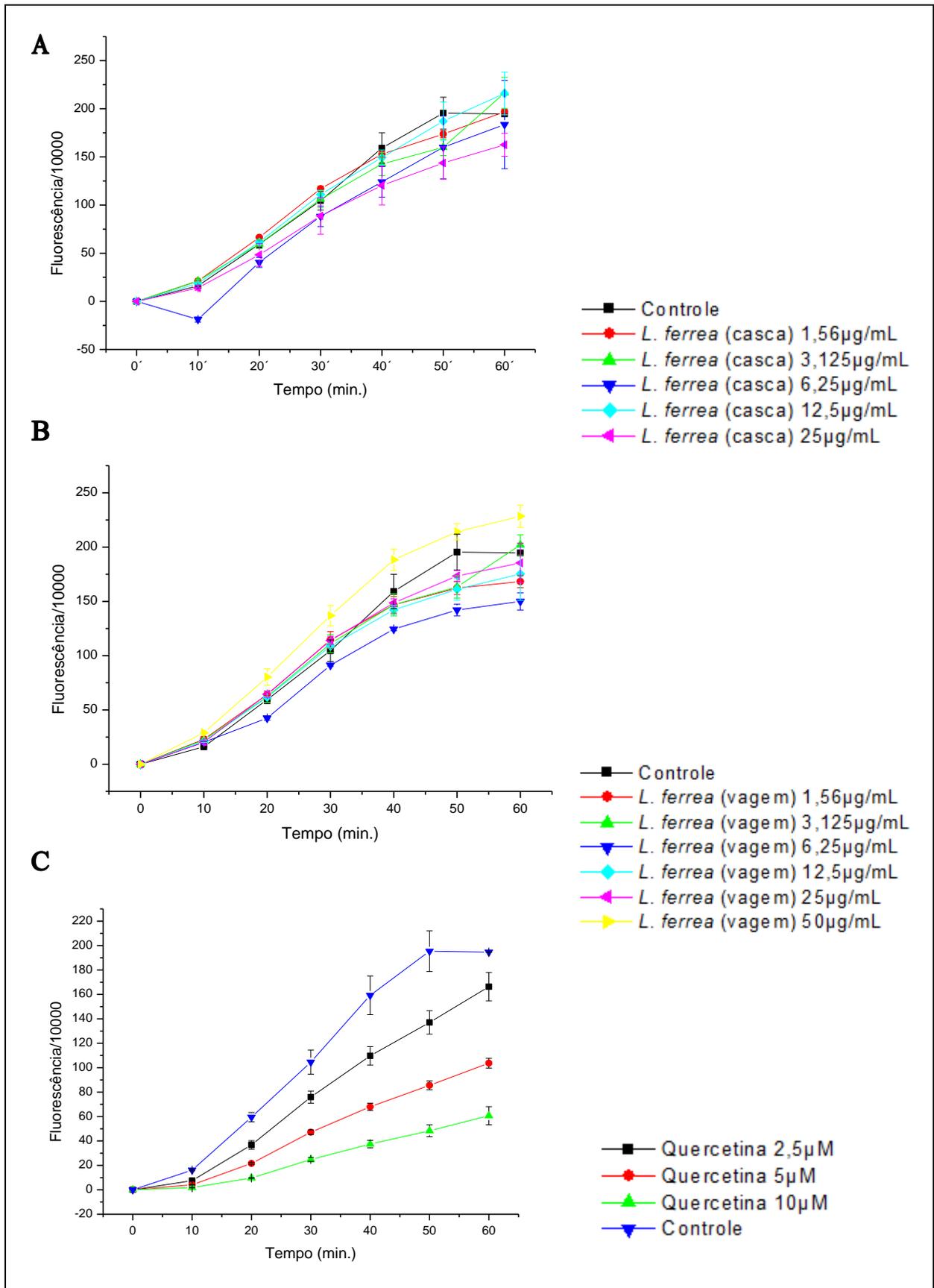


Figura 5 Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoresceína no fibroblasto murino tratado com a) *Libidibia ferrea* (casca); b) *Libidibia ferrea* (vagem); e c) Quercetina (Padrão). As fluorescências representam média \pm dp.

Na figura estão representadas as curvas dose-resposta do teste de atividade antioxidante da quercetina e dos extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea* em fibroblastos murino NIH 3T3 em período de 1 hora de tratamento.

5.3 Inibição da elastase

Os extratos foram testados para a avaliação da inibição da elastase, sendo 0,5 mg/mL a menor concentração testada.

A espécie não possui potencial inibitório para a enzima elastase haja vista que a pouca atividade apresentada foi obtida em uma concentração de extrato bastante elevada.

Tabela 2 - Atividade inibitória de extratos de *L. ferrea* (casca), *L. ferrea* (vagem) e dos padrões ácido gálico e ácido elágico sobre a elastase *in vitro*.

Amostra	Concentração (mg/mL)	Inibição (%) Média \pm S.D
<i>L. ferrea</i> (Casca)	10	31,52 \pm 17,4
	5	20,15 \pm 11,6
	0,5	2,86 \pm 9,7
<i>L. ferrea</i> (Vagem)	10	35,03 \pm 15,4
	5	21,90 \pm 1,1
	0,5	8,37 \pm 25,6
Ácido gálico	10	98,92 \pm 1,2
	5	52,85 \pm 11,6
	0,5	23,36 \pm 18,1
Ácido elágico	0,5	37,05 \pm 17,0
	0,25	28,35 \pm 18,6
	0,05	13,58 \pm 13,9

5.4 Ensaio da inibição da colagenase

Na avaliação da atividade inibitória da colagenase, verificou-se que o extrato da casca de *L. ferrea* não apresentou atividade importante nas concentrações testadas (25, 50 e 100µg/mL), sendo a inibição de 15,2% na maior concentração testada.

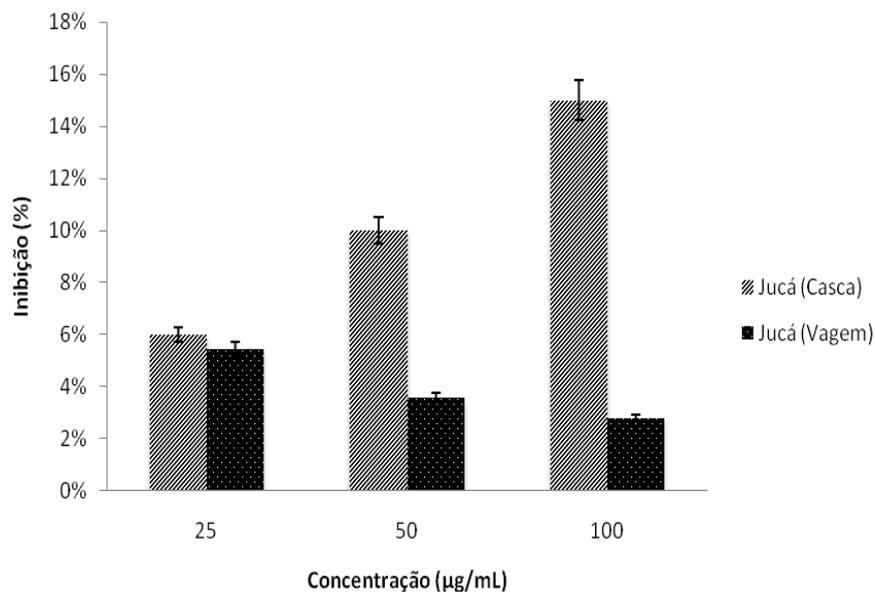


Figura 6 – Inibição da atividade da Colagenase pelo extrato obtido a partir da casca de *Libidibia ferrea*.

O extrato da vagem de *L. ferrea* também não apresentou atividade satisfatória apresentando uma inibição de 2,8% na concentração de 100µg/mL. Portanto, os ensaios demonstraram que são necessários novos estudos em concentrações maiores a fim de se estabelecer com segurança se há ou não inibição significativa da atividade da colagenase por esses extratos.

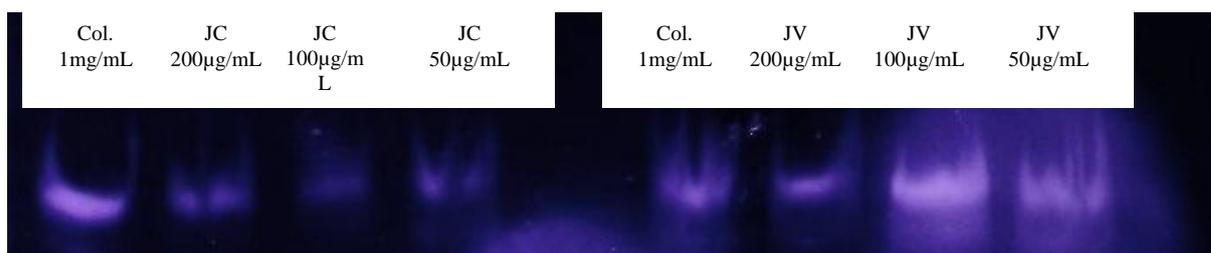


Figura 7: Inibição da atividade da colagenase por zimografia obtida a partir de extrato da casa e vagem de *Caesalpinia ferrea*.

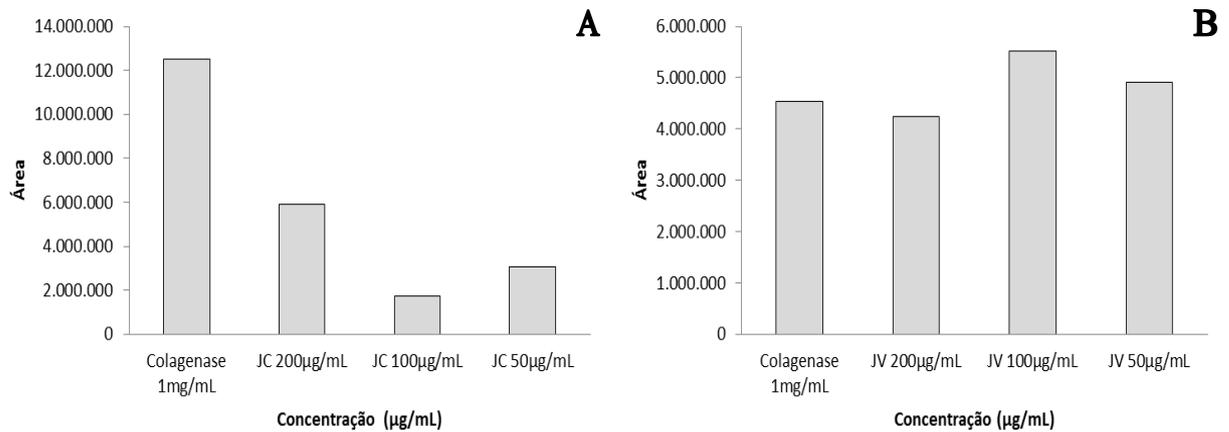


Figura 8: Gráficos área versus concentração obtido por zimografia para análise da inibição da atividade da colagenase a partir de extrato da casa e vagem de *Libidibia ferrea*.

5.5 Ensaio da inibição da hialuronidase

O efeito dos extratos da casca e da vagem de *L. ferrea* sobre a atividade da hialuronidase foi verificado e os resultados estão apresentados no Gráfico 9. Foi constatado que o extrato produzido a partir da casca de *L. ferrea* apresentou maior inibição da atividade enzimática quando comparado com o extrato produzido a partir da vagem de *L. ferrea*. A atividade inibitória apresentada foi dose dependente.

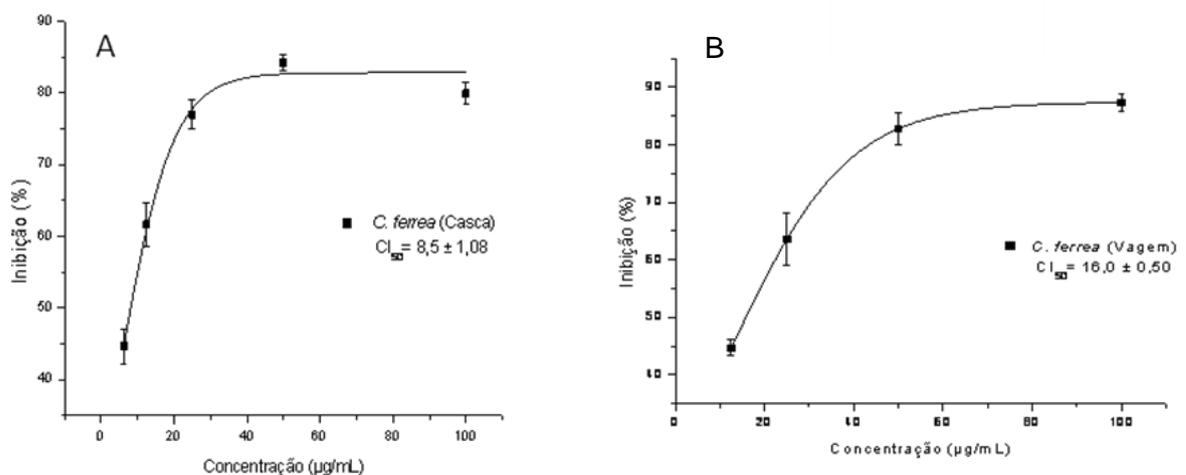


Figura 9 - Atividade inibitória da hialuronidase a) *Libidibia ferrea* (casca); b) *Libidibia ferrea* (vagem)

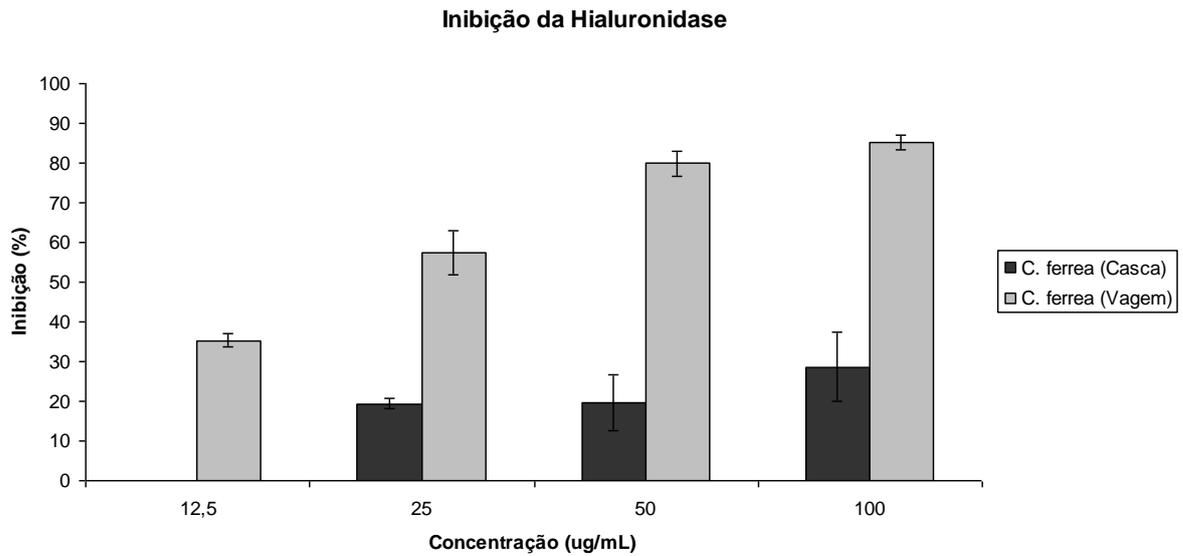


Figura 10: – Inibição da atividade da hialuronidase pelos extratos obtidos a partir da casca e da vagem de *Libidibia ferrea*.

5.6 Citotoxicidade pelo ensaio Azul de Tripán

As figuras 11, 12 e 13 mostram a viabilidade celular em fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 24, 48 e 72 horas, respectivamente, de exposição das células aos extratos da casca e vagem de *L. ferrea*.

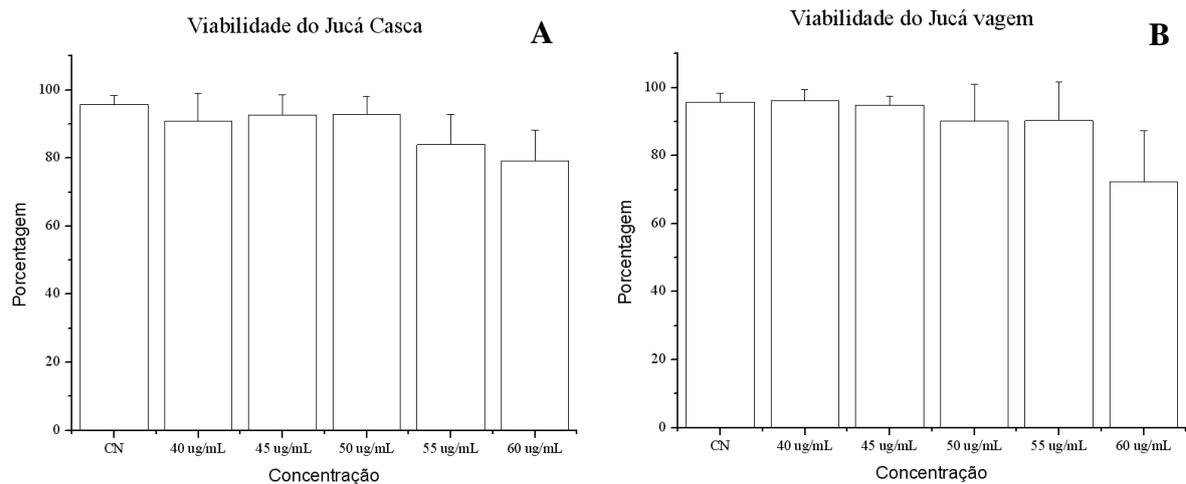


Figura 11 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 24 horas de exposição aos extratos de A) *L. ferrea* (casca) e B) *L. ferrea* (vagem).

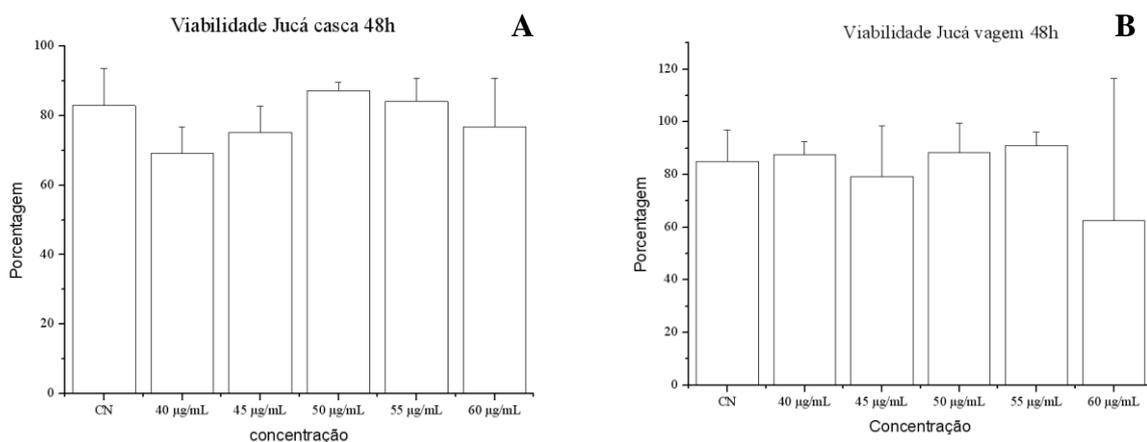


Figura 12– Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 48 horas de exposição aos extratos de A) *L. ferrea* (casca) e B) *L. ferrea* (vagem).

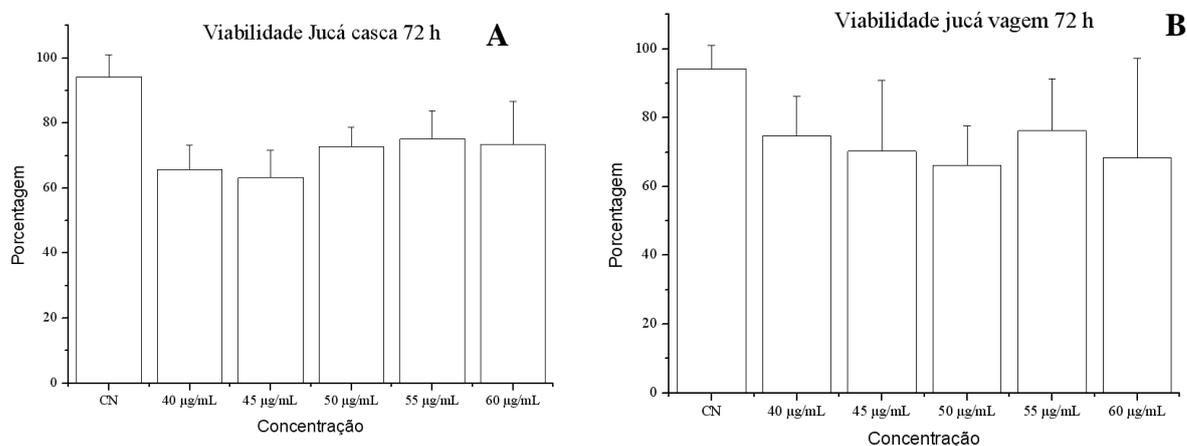


Figura 13 – Viabilidade celular de fibroblastos murinos da linhagem NIH 3T3 após 72 horas de exposição aos extratos de A) *L. ferrea* (casca) e B) *L. ferrea* (vagem).

5.7 Citotoxicidade pelo Ensaio de Alamar Blue

A tabela 3 mostra a comparação entre as concentrações inibitórias IC₅₀ da *L. ferrea* casca e vagem e o padrão de morte celular, doxorrubicina nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Tabela 3: Comparação entre as concentrações inibitórias 50% obtidas pelo ensaio de Alamar Blue para os extratos de *L. ferrea* casca, *L. ferrea* vagem e o padrão de morte celular, Doxorubicina.

Substância	24 horas µg/mL (IC₅₀)	48 horas µg/mL (IC₅₀)	72 horas µg/mL (IC₅₀)
<i>L. ferrea</i> Casca	> 250	208,1 (108,5- 399,3)	111,4 (95,08- 130,5)
<i>L. ferrea</i> Vagem	> 250	> 250	173,4 (148,9- 201,9)
Doxorrubicina	0,90 (0,54-1,48)	0,30 (0,23 – 0,37)	0,24 (0,19-0,28)

6. DISCUSSÃO

Este trabalho realizou o estudo da atividade antioxidante *in vitro* e em células de fibroblastos NIH3T3. No que tange à atividade antioxidante, há diversas metodologias *in vitro* disponíveis para avaliar esse efeito. Neste estudo essa atividade foi avaliada pelo método de varredura de radicais de DPPH.

No ensaio do DPPH a atividade observada se refere ao efeito varredor do radical por substâncias redutoras presentes no extrato (MOLYNEUX, 2004).

O resultado pode ser expresso em porcentagem e em cinética de reação, esta pode ser vista em duas etapas, a primeira etapa compreende o período de 15 a 45 minutos e reflete a eficiência do ativo em bloquear reação em cadeia através da interação com os radicais peróxidos. A possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo é conhecida na segunda parte da curva, entre 70 e 90 minutos (ALMEIDA et al., 2006).

O método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH• de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (ALMEIDA et al., 2006).

As curvas para a atividade varredora de radicais DPPH (figura 4) demonstram que o Trolox e os extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea* estudados apresentam efeitos concentração-dependente. Nas concentrações estudadas os

extratos mostraram ser bons varredores de radicais DPPH se comparados com o Trolox que é considerado varredor padrão. A CI_{50} do extrato de *L. ferrea* casca foi 7,9 $\mu\text{g/mL}$ e a CI_{50} de *L. ferrea* vagem foi 8,7 $\mu\text{g/mL}$, o que mostra que mesmo em baixas concentrações os extratos têm boa capacidade de varrer radicais DPPH e podem ser considerados antioxidantes em potencial. A pesquisa de DA SILVA et al. (2011), que também utilizou o ácido gálico como referência, mostrou que os frutos de *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* e *Pityrocarpa moniliformis* tem atividade significativa para atividade total antioxidante, com o fruto de *L. ferrea* apresentando 38,06% (± 2.04) em comparação com o ácido ascórbico.

O ensaio de atividade antioxidante celular (AAC) foi realizado com diclorofluoresceína e AAPH. Ao entrar na célula, o AAPH libera radicais peroxil que ao serem incorporados pela diclorofluoresceína, aumentam sua fluorescência. Extratos antioxidantes são capazes de captar o radical, impedindo o aumento da fluorescência (WOLF e LIU, 2007).

Apesar dos extratos da casca e vagem de *L. ferrea* terem se mostrado bons varredores de radicais de DPPH no teste *in vitro*, no teste celular com fibroblastos NIT3T3, os extratos, em concentrações não tóxicas, não foram capazes de captar radicais de maneira significativa (figura 5). O estudo antioxidante em células realizado por Thring et al. (2011) com as espécies *Camellia sinensis* Kuntze, *Rosa alternifolia* L. e *Hamamelis virginiana* L., que são espécies descritas na literatura como plantas de alto teor de compostos fenólicos assim como a *Libidibia ferrea*, verificou que estas espécies tem capacidade antioxidante. O estudo de Kumar et al. (2010) mostrou bons resultados de atividade antioxidante *in vitro* para os extratos de frutos de *Momordica charantia* L., porém nos estudos em células, os extratos

induziram danos aos fibroblastos e queratinócitos e por isso não foram considerados bons antioxidantes nos testes celulares.

A discrepância entre esses resultados pode ser explicada quando se considera que ensaio com o DPPH não reflete o meio biológico onde estão envolvidos outros fatores como o pH intracelular, a temperatura, enzimas envolvidas e seus 67 produtos. Por isso, testar a atividade antioxidante celular é tão importante pra expressar sua atividade de maneira mais próxima do efeito *in vivo*.

O estudo da inibição da enzima elastase foi realizado utilizando-se como padrões o ácido gálico e o ácido elágico e foram testadas concentrações dos extratos da casca e vagem de *L. ferrea*. As inibições que o ensaio mostrou (Tabela 2) não foram relevantes se comparadas às inibições dos padrões e às concentrações estudadas. Com a mesma metodologia utilizada neste trabalho, THRING et al. (2009) mostrou atividade inibitória da elastase com altas porcentagens para extratos de plantas, como *Camellia sinensis* Kuntze (89%), *Galium aparine* L. (58%) e *Arctium lappa* L. (51%).

A espécie não possui potencial inibitório para a enzima elastase haja vista que a pouca atividade inibitória apresentada foi obtida em uma concentração de extrato bastante elevada (10mg/mL). Os padrões ácido gálico e ácido elágico em concentrações menores apresentam maior atividade inibitória.

Na avaliação da atividade inibitória da enzima collagenase (figura 6), verificou-se que o extrato da casca de *L. ferrea* não apresentou atividade importante nas concentrações testadas (25, 50 e 100µg/mL), sendo a inibição de 15,2% na maior concentração testada.

O extrato da vagem de *L. ferrea* também não apresentou atividade satisfatória apresentando uma inibição de 2,8% na concentração de 100µg/mL. Portanto, os

ensaios demonstraram que são necessários novos estudos em concentrações maiores a fim de se estabelecer com segurança se há ou não inibição significativa da atividade da colagenase por esses extratos. Com a mesma metodologia, THRING et al. (2009) realizou estudo que mostrou que o chá verde (*Camellia sinensis* Kuntze) possui atividade inibitória para colagenase acima de 85%.

O estudo da inibição da colagenase pela metodologia da zimografia (figura 7) obteve resultado semelhante ao encontrado na metodologia de Van Wart; Steinbrink (1981), ou seja, a revelação das bandas eletroforéticas também não mostrou inibição da enzima quando a mesma foi colocada em contato com os extratos da casca e vagem de *Libidibia ferrea*. A zimografia é uma técnica semi-quantitativa, que pode portanto, ser utilizada para determinar os níveis de MMP (metaloproteínas) em amostras quando concentrações conhecidas de MMP recombinante são carregados no mesmo gel (HU & BEETON, 2010).

Pode-se verificar que a atividade inibitória sobre a hialuronidase dos extratos diminuiu de acordo com a diminuição da dose. Já para o extrato da casca de *L. ferrea* foi observado uma inibição enzimática menor, pois com a mesma concentração o extrato produzido a partir da vagem de *Libidibia ferrea* inibiu a atividade enzimática em $28,7 \pm 8,80\%$ não possibilitando o cálculo da CI_{50} e demonstrando que novos ensaios são necessários para definição da atividade ou não desse extrato frente a hialuronidase. A hialuronidase tem como uma de suas funções a degradação do ácido hialurônico na matriz extracelular (MEC), enquanto o ácido hialurônico atua preenchendo os espaços vazios entre as células e promovendo uma cicatrização sem marcas (MEDEIROS et al., 1999). Estudos comprovam a presença de flavonóides e taninos na casca e na vagem de *C. ferrea*, como exemplo de taninos desta espécie podemos citar o ácido gálico e ácido elágico

(SOUZA, *et al.*, 2006). Os flavonóides e os taninos são potentes inibidores enzimáticos o que poderia explicar em parte a atividade encontrada (SIMÕES *et al.*, 2010). Estudos com modelos animais e celulares podem ser realizados posteriormente para corroborar com este teste *in vitro*.

Em se tratando de citotoxicidade pelo ensaio azul de Tripán (figuras 10, 11 e 12), pode-se dizer que nos diferentes tipos celulares os extratos da casca e vagem de *L. ferrea* tiveram comportamento tempo-dependente e no período máximo de exposição (72h) ele também apresentou comportamento concentração-dependente. Realizado o ensaio de citotoxicidade em NIH 3T3, as concentrações escolhidas para o ensaio de atividade antioxidante em nesta célula foram de 0; 40, 45, 50, 55 e 60 µg/mL. As concentrações estudadas não afetaram a viabilidade até o período crônico da exposição da célula aos extratos, ou seja, em 72 horas de tratamento. Avaliando o efeito dos extratos de *L. ferrea* sobre a viabilidade celular de fibroblastos NIH3T3, mesmo as maiores concentrações estudadas (60 µg/mL) apresentaram altas porcentagens de viabilidade no período agudo (24 horas), 90,8% para a concentração do extrato da casca 40 µg/mL e 96,2% para o extrato da vagem 40 µg/mL. Já no período de 72 horas de exposição, mas na maior concentração estudada 60 µg/mL, as porcentagens de viabilidade mantiveram-se elevadas: 73,4% com extrato da casca e 68,3% com extrato da vagem para o período de 72 horas. Com estes resultados, é possível observar que a viabilidade celular apresentada no período de 24 horas é bem mais elevada que a viabilidade dos outros períodos, mesmo que a variação não tenha sido tão ampla.

No teste de viabilidade celular pela metodologia do Alamar Blue (Figuras 14, 15 e 16) os resultados encontrados mostraram comportamento tempo-dependente e concentração-dependente. As concentrações estudadas (0; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25;

62,5; 125 e 250 µg/mL) tiveram maior amplitude em relação às concentrações estudadas no teste de viabilidade com a metodologia do azul Tripán, porém os testes mostraram viabilidades sempre maiores que 50% mesmo nas maiores concentrações dos extratos.

As metodologias dos testes de inibição das enzimas elastase, colagenase, hialuronidase e também a metodologia eletroforética com zimografia foram metodologia implementadas nos Laboratórios de Atividade Biológica 1 e 2 da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas e os protocolos estão disponíveis nos laboratórios citados. Todo esse processo de padronização demandou muitos meses de trabalho em cada metodologia apresentada.

Ainda assim, os resultados deste estudo abrem novas perspectivas de pesquisa indicando que os extratos da casca e vagem de *L. ferrea* poderão continuar sendo objeto de estudo tanto em relação as suas propriedades cosméticas quanto em relação a sua citotoxicidade e aspectos fitoquímicos.

7. CONCLUSÃO

- Os extratos não apresentaram citotoxicidade significativa na maior concentração estudada (60µg/mL) pelo ensaio de azul de tripan e não houve citotoxicidade significativa em NIH 3T3 dos extratos de *L. ferrea* em concentrações menores que 200 µg/mL.
- Apesar dos extratos da casca e vagem de *L. ferrea* terem se mostrado bons varredores de radicais de DPPH no teste *in vitro*, no teste celular com fibroblastos NIH3T3, os extratos, em concentrações não tóxicas, não foram capazes de captar radicais de maneira significativa.
- As inibições das enzimas elastase e colagenase não mostraram atividade significativa quando comparadas aos padrões utilizados. Casca e vagem de *L. ferrea* exibiram boa atividade inibitória da hialuronidase, sendo que a vagem apresentou melhor desempenho (acima de 80%).
- Estes resultados demonstram que o extrato de *L. ferrea* pode ser considerado promissor nos estudos referentes a antienvhecimento, pois estes estudos preliminares serão importantes para as pesquisas subseqüentes.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Itajaí de Oliveira. **Citotoxicidade in vitro da Terapia fotodinâmica com Alumínio Cloro-ftalocianina Lipossomal em Melanoma Murino B16F10**. Brasília, UnB, 2008. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília. 2008.
- ALMEIDA, Joaquim Maurício DUARTE; SANTOS, Ricardo José dos SANTOS; GENOVESE, Maria Inês; LAJOLO, Franco Maria. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- ALZUGARAY, D. **Plantas que Curam**. São Paulo: Hemus Press, 1984.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103-8, 1996.
- ARAÚJO, T. A. S., ALENCAR, N. L., AMORIM, E. L. C. A new approach to study medicinal plants with tannins and flavonoids contents from the local knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 72–80, 2008.
- ARNOLD, F.; WEST, D.C. Angiogenesis in wound healing. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 52, p. 407-22, 1991.
- BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax Camporum* and *Caesalpinia Ferrea*. **Planta Médica**, v. 61, n. 3, p. 204-7, 1995.
- BAJAY, H.M., JORGE, S.A., DANTAS, S.R.P.E. **Tratamento de feridas**. Grupo de Estudo de Feridas. Hospital de Clínicas, Unicamp, Campinas, SP, 1999.
- BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M., CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 27–51, 2005.
- BARBOSA, L. H. F.; RAMOS, H. V. L.; NEVES, L. R.; et al. Detecção de receptor de ácido hialurônico em prega vocal humana por método imunohistoquímico. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.74, p. 201-6, 2008.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração e espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-23, 2006.

BAYLAC, S.; RACINE, P. Inhibition of human leukocyte elastase by natural fragrant extracts of aromatic plants. **International Journal of Aromatherapy**, v. 14, p. 179-82, 2004.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 233-61, 1996.

BIACHI, Maria; ANTUNES, Lusânia. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOGDAN ALLEMAN, I.; BAUMANN, L. Antioxidants Used in Skin Care Formulations. **Skin Therapy Letter**, v. 8, n. 13, p. 5-9, 2008.

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no mercado municipal Adolpho Lisboa** – Manaus: Editora Valer / Governo do Estado do Amazonas, 2003.

BRAGANÇA, L. A. R et al. **Plantas Mediciniais Antidiabéticas**, Niterói : EDUFF, p. 172, 1996.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS-FILHO, D.; SART, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CERUTTI, P.A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CILLI, F., KHAN, M., FU, F., WANG, J.H.C. Prostaglandin E2 affects proliferation and collagen synthesis by human patellar tendon fibroblasts. **Clinical Journal of Sport Medicine**, v.14, p. 232–236, 2004.

CLARK, R. A. R. Potential roles of fibronectin in cutaneous wound repair. **Archives of Dermatology**, v.124, 1998.

DA SILVA, L.C.N.; DA SILVA, C.A.J.; DE SOUZA; R. M.; MACEDO, A. J.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrine*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, n. 49, p. 2222-2228, 2011.

DIEGELMANN, R.F.; COHEN, I.K.; KAPLAN, A.M. The role of macrophages in wound repair: a review. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 68, n. 107, 1981.

DOILLON, C.J.; DUNN, M. G.; BENDER, E. et al. Collagen fiber formation in repair tissue. Development of strength and toughness. **Collagen and Related Research**, v. 5, n. 481, 1985.

EURIDES, D. 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.

FAZIO, M.J.; ZITELLI, J.A.; GOSLEN, J. B. **Cicatrização de feridas**. 2ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000.

FRESHNEY, R. Ian. Citotoxicity. In: FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells a manual of basic technique**. 4 ed. New Jersey: Ed. Wiley, 2005.

GALDINO, G.; RABELLO, M. M.; FERRAZ, I. D. K. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 747-49, 2007.

GARROS, I. C. et al., Extrato de *Passiflora edulis* na Cicatrização de Feridas Cutâneas Abertas em Ratos: Estudo Morfológico e Histológico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 24-29, 2006.

GOMATHI, K.; GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices of dermal wound healing process in rat. **Biomaterials**, v. 24, p. 2767-72, 2003.

GONZALEZ, F. G., BARROS, S. B. M., BACHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fito-químico de *Caesalpinia ferrea* MART. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, 2004.

GRINNEL, F.; BILLINGHAM, R.E.; BURGESS, L. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 76, n. 181, 1981.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 3, 2004.

HU, X., BEETON, C. Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. **Journal of Visualized Experiments**, n. 45, p. 2445, 2010.

HUGHES, M.A., CHERRY, G.W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant toward healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.219–226, 2001.

KAUR, R.; ARORA, S.; SINGH, B. Antioxidant activity of the phenol rich fractions of leaves of *Chukrasia tabularis*. A. Juss. **Bio Technol.**, v. 99, p. 7692-7698, 2008.

KHOKHAR, S.; APENTEN, R.K.O. Iron binding characteristics of phenolics compounds: some tentative structure-activity relations. **Food Chem.**, v. 81, p. 133-140, 2003.

KIM, J.-K.; NOH, J.H.; LEE, S.; CHOI, J.S.; SUH, H.; CHUNG, H.Y., SONG, Y.-O. and CHOI, W.C. The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5- ihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, Bull. **Korean Chemical Society**, v. 23, n.5, 661-662, 2002.

KIM, Y.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Inhibition effects of (+)-catechin-aldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, p. 256-61, 2004.

KUMAR, R.; BALAJI, S.; SRIPRIYA, R. NITHYA, N.; UMA, T.S.; SEHGAL, P.K. In vitro evaluation of antioxidants of fruit extract of *Momordica charantia* L. on fibroblasts and keratinocytes. **J Agr Food Chem**, n. 28, p. 1518-1522, 2010.

LEDA M.F. et al. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. In: Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.

LEHNINGER, A L, 1997-1996. **Lehninger Princípios da Bioquímica**/ David L. Nelson, Michael M. Cox; traduzido por Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. – 3. ed. – São Paulo: SARVIER, 2002.

LIN, J.Y.; SELIM, M. A.; SHEA, C.R. et al. UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 866-74, 2003.

LIZARDO, L. G. A.; et al. Citotoxicity and melanogenesis evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on melanocytes. In: XXVI Reunião Anual Federação das Sociedades de Biologia Experimental, 2011, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: FESBE 2011. p. 220.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum , p. 162, 2002.

LUO, J.D.; CHEN, A. F. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 3, p. 259-64, 2005.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, 2002.

MAEHATA, Y. et al. Type III collagen is essential for growth acceleration of human osteoblastic cells by ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative. **Matrix Biology**, v.26, p.371–381, 2007.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS, E.P., MANDELBAUM, M.H.S.A. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources—Part I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 72, p.393–410, 2003.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MATTA, A. A. **Flora Médica Brasileira**. Organização Tenório Telles e apresentação por Otto R. Gottlieb. 3ª Ed. Revista – Manaus: editora Valer e Governo do Estado do Amazonas, 2003.

MENDONÇA, R. J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n.3, p. 257-62, 2009.

MENEZES, I. A. C., MOREIRA, I. J. A., CARVALHO, A. A., ANTONIOLLI, A. R., SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, p. 41–47, 2007.

MENSAH, A.Y. et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant toward healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219–226, 2001.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal of the American Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOLYNEUX, P. The use of stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science Technology**, v.26, n.2, p. 211-19, 2004.

MOSHER, D.F.; FURCHT, L.T. Fibronectin: review of its structure and possible functions. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 77, 1981.

MRUÉ, F.; COUTINHO-NETTO, J.; CENEVIVA, R.; LACHAT, J.J.; THOMAZINI, J.A.; TAMBELINI, H. Evaluation of the biocompatibility of a new biomembrane. **Materials Research**, v. 7, p. 277-83, 2004.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemistry**, v. 417, p. 1-13, 2009.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p.135-7, 2002.

NOZAKI, H., HAYASHI, K., KIDO, M., KAKUMOTO, K., IKEDA, S., MATSUURA, N., TANI, H., TAKAOKA, D., IINUMAE, M., AKAOF, Y. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, p. 8290–8292, 2007.

OU, Y.; DONG, X.; LIU, X.; CHENG, X.; CHENG, Y.; YU, L.; GUO, X. Mechanism of tetramethylpyrazine analogue CXC195 inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis in human endothelial cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 33, n. 3, p. 432-38, 2010.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 68, 1984.

QUEIROZ, M. L. et al. Evaluation. of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, v. 23, n. 3, p. 367-382, 2001.

RAFFETO, J. D; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 346-59, 2008.

RIZZINI, C. T. Botânica econômica brasileira. 2.ed. Rio de Janeiro: **Âmbito Cultural**, 1995. 248p.

SAMPAIO, F. C.; PEREIRA, M. S. V.; DIAS, C. S.; COSTA, V. C. O.; CONDE, N. C. O.; BUZALAF, M. A. R. *in vitro* antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. [Journal of Ethnopharmacology](#), v. 124, n. 2, p. 289-94, 2009.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence: Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213-19, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p.1315-21, 1995.

SIMOES, C. M. O.; PETROVIC, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: UFRGS, 2010.

SINGER, A. J., CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-46, 1999.

SNOEK-VAN BEURDEN, P.A.M; VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Bio Techniques**, v. 38, p.73-83, 2005.

SOUZA, A. B., SOUZA, L. M. S., CARVALHO, J. C. T., MAISTRO, E. L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 380–383, 2006.

TALARICO, S.; HASSUN, K. M.; MONTEIRO, E. O. Avaliação da segurança e eficácia de novo preenchedor à base de ácido hialurônico no tratamento dos sulcus nasolabiais e contorno dos lábios. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 2, p.83-6, 2010.

TAMSYN, A. S.; THRING, P. H.; DECLAN, P. N. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2009.

THRING, T.S.A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. Antioxidant and potential anti-inflammatory activity of extracts and formulations of white tea, rose, and witch hazel on primary human dermal fibroblast cells. **Journal of Inflammation**, n. 8, 2011.

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU1, M.; KAWANISHI, K.; ALVES, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, vol. 8, n. 5, p. 377–81, 2001.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN WART, H. E.; STEINBRINK, D.R. A continuous spectrophotometric assay for *Clostridium histolyticum* collagenase. **Analytical Biochemistry**, v. 113, p. 356-65, 1981.

YANISHILIEVA, N.V.I.; MARINOVA, E.M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chemistry**, v. 54, p. 377-82, 1995.

WANG H, et al. Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 29, p. 225-230, 2010.

WERNER, S.; GROSE, R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 835-70, 2003.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n. 22, p. 8896-07, 2007.

APÊNDICE A – Equipe Científica

Nome	Formação/Função	Instituição
Dr. Emerson Silva Lima	Farmacêutico-bioquímico/Pesquisador Fapeam/CNPq Orientador	UFAM
Dra Marne Carvalho de Vasconcellos	Farmacêutica/Pesquisadora Fapeam/CNPq Co-Orientadora	UFAM
Aline Oliveira Barros	Farmacêutica-Bioquímica Aluna do Mestrado em Ciências da Saúde – UFAM Executora do Projeto de Dissertação	UFAM
Nívea Suely Melo de Oliveira	Farmacêutica-Bioquímica Aluna do Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFAM Colaboradora	UFAM
Vitor Renato da Silva Carvalho	Farmacêutico Aluna do Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UFAM Colaborador	UFAM
Tatiana do Nascimento Pedrosa	Farmacêutica Aluna do mestrado em Ciências Farmacêuticas Colaboradora	UFAM
Jéssica Rodrigues Nogueira	Aluna de Farmácia Aluna do Programa de Iniciação Científica Colaboradora	UFAM
Dra. Tatiane Pereira de Souza	Farmacêutica/Pesquisadora Fapeam/CNPq Colaboradora	UFAM
Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler	Bióloga/Pesquisadora FAPESP/CNPq Colaboradora	USP