

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro Acadêmico de Vitória  
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas



**EFEITO DO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia salzmannii* SOBRE O  
REPARO TECIDUAL DE LESÕES INDUZIDAS EM RATOS WISTAR**

Vitória de Santo Antão

2013

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro Acadêmico de Vitória  
Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas



**EFEITO DO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia salzmannii* SOBRE O  
REPARO TECIDUAL DE LESÕES INDUZIDAS EM RATOS WISTAR**

TCC apresentado ao Curso de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas como requisito para incremento da Disciplina Eletiva do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noemia Pereira da Silva Santos

Co-orientador: Msc. Camilla Vila Nova Soares Silva

Discente: Marlllyn Marques da Silva

Vitória de Santo Antão

2013

Catálogo na fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE – Biblioteca Setorial do CAV

S586e Silva, Marlyn Marques da  
Efeito do ácido barbático de *Cladonia salzmannii* sobre o reparo  
tecidual de lesões induzidas em ratos wistar/ Marlyn Marques da  
Silva. Vitória de Santo Antão: O autor, 2013.  
65 folhas: fig.

Orientador: Noemia Pereira da Silva Santos.  
Co-orientador: Camilla Vila Nova Soares Silva.  
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco.  
CAV, Ciências Biológicas, 2013.  
Inclui anexo.

1. Cicatrização de feridas. 2. Ácido barbático. I. Santos, Noemia  
Pereira da Silva. II. Silva, Camila Vila Nova Soares. Título.

13/2013 546.24 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-**

**EFEITO DO ÁCIDO BARBÁTICO DE *Cladonia salzmannii* SOBRE O  
REPARO TECIDUAL DE LESÕES INDUZIDAS EM RATOS WISTAR**

MARLLYN MARQUES DA SILVA

ORIENTADOR:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Noemia Pereira da Silva Santos  
(Docente do Centro Acadêmico de Vitória/ UFPE)

CO-ORIENTADOR:

---

Msc. Camilla Vila Nova Soares Silva  
(Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde -  
LIKA/UFPE)

EXAMINADORES:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariane Cajubá de Britto Lira Nogueira - Titular  
(Docente Centro Acadêmico de Vitória)

---

Dr<sup>a</sup> Milena Sales Ferraz - Titular  
(Laboratório de Imunopatologia Keiso-Asami)

---

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Cristiano Aparecido Chagas - Suplente  
(Docente Centro Acadêmico de Vitória)

Vitória de Santo Antão

2013

*Dedico este trabalho a todos aqueles que de forma direta ou indireta apoiaram e ajudaram na realização do mesmo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por tudo que ele tem feito em minha vida até hoje, pelas grandes vitórias que tem me concedido.

Agradeço a minha mãe: Marili Rodrigues Silva, e a meu pai: José Cícero Silva que sempre me apoiaram e me ensinaram a nunca desistir de alcançar meus objetivos. E ainda, a toda minha família que sempre incentivaram à minha formação.

Não posso esquecer de agradecer a minha orientadora, a Professora Dr<sup>a</sup> Noemia Pereira pela oportunidade de alcançar o conhecimento científico no campo da pesquisa, que é surpreendente, pela sua dedicação e compreensão quando não podia está presente. Ainda no campo da orientação agradeço a Ms. Camilla Vila Nova pela paciência, compreensão e pelo companheirismo. Te dei trabalho não é Camilla?

Ainda ao professor Dr<sup>o</sup> Francisco Amanajás pela grande força nos trabalhos histopatológicos/estatísticas, pelos ensinamentos, paciência e disposição de nos ajudar.

Agradeço a minha companheira de Iniciação Científica, Maria Claudiana, na qual sempre compartilhamos o conhecimento e também o trabalho de realizar este projeto. Passamos muitas vezes pelas mesmas dificuldades, ela sempre me ajudando. Foi uma grande parceria.

Fico muito grata à Propesq e CNpq pela bolsa de Iniciação Científica.

Em fim, a todos que colaboraram.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b>	iv
<b>AGRADECIMENTOS</b>	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b>	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	x
<b>LISTA DE SIMBOLOS</b>	xi
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	12
<b>1. Introdução</b>	30
<b>2. Materiais e métodos</b>	32
2.1 Estudo da solubilidade de fases do ácido barbático (BAR) e hidroxipropil- y-ciclodextrina (HP $\gamma$ CD)	32
2.2 Preparação do complexo de inclusão ácido barbático e hidroxipropil- $\gamma$ - ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD)	
2.3 Preparação das formulações semi-sólidas tipo gel Natrosol	33
2.4 Estudo do reparo tecidual	34
<b>3. Resultados e discussão</b>	36
3.1 Estudo da solubilidade de fases do ácido barbático (BAR) e hidroxipropil- y-ciclodextrina (HP $\gamma$ CD)	36
3.2 Obtenção do complexo de inclusão ácido barbático e hidroxipropil- $\gamma$ - ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD)	37
3.3 Estudo das formulações semi-sólidas tipo gel Natrosol	37
3.4 Estudo do processo de reparo tecidual em ratos Wistar	38
3.4.1 Análise Macroscópica	38
3.4.2 Análise histopatológica e morfométrica	39
<b>4. Conclusões</b>	45
<b>5. Agradecimentos</b>	46
<b>Referências</b>	46
<b>Anexo</b>	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química do ácido barbático (AHTI et al., 1993).	14
Figura 2	Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).	15
Figura 3	Ilustração das camadas da pele (adaptado de BEAR et al., 2002; VIANNA et al., 2011).	17
Figura 4	Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas (VITORINO FILHO, 2011).	19

## ARTIGO

Figura 1	Estrutura química do ácido barbático (AHTI et al., 1993).	31
Figura 2	Diagrama de solubilidade de fases do ácido barbático em função da concentração da HP $\gamma$ CD.	37
Figura 3	Áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais tratados: Gel base = gel natrosol base; Gel BAR = gel natrosol contendo ácido barbático e Gel BAR:HP $\gamma$ CD = gel natrosol contendo complexos de inclusão (BAR:HP $\gamma$ CD) (n=27).	38
Figura 4	Microfotografia da ferida cirúrgica após o Período operatório (PO) em intervalos de tempos pré-determinados: (1) = 3dias PO; (2) = 7dias PO; (3) = 14 dias PO e (4) = 21dias PO. Grupos experimentais: A= Gel base; B= Gel BAR e C= Gel BAR: HP- $\gamma$ -CD.	39
Figura 5	Fotomicrografia da ferida cirúrgica ao 7º dia PO: (A) gel base, (B) gel BAR e (C) gel BAR:HP $\gamma$ CD. Crosta fibrino-leucocitária (C), reepitelização (E), fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI)	

	e vaso sanguíneo (VS): coloração H.E. Fibras colágenas (FC): coloração Picrosírius	41
Figura 6	Fotomicrografia da ferida cirúrgica ao 14 <sup>o</sup> dia PO: (A) gel base, (B) gel BAR e (C) gel BAR:HP $\gamma$ CD. Crosta fibrino-leucocitária (C), reepitelização (E), fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI) e vaso sanguíneo (VS): coloração H.E. Fibras colágenas (FC): coloração Picrosírius.	42
Figura 7	Análises histomorfométricas dos grupos de animais controle (gel base) e tratados com as formulações tipo gel contendo ácido barbático (gel BAR) e complexo de inclusão (gel BAR:HP $\gamma$ CD). Legenda: A= Células inflamatórias; B= Fibroblastos; C= Vasos sanguíneos. * (p <0,05% ou 5%) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle.	43
Figura 8	Análise histomorfométrica dos grupos de animais controle e tratados com as formulações tipo gel de Natrosol contendo BAR e complexo BAR:HP $\gamma$ CD: contagem de fibras colágenas ao 7 <sup>o</sup> e 14 <sup>o</sup> dia PO * (p <0,05% ou 5%) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle (tratado com Gel base).	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Componentes da formulação semi-sólida tipo gel (20g).	34
----------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrômetro
AB ou BAR	Ácido barbático
AB:HP $\beta$ CD ou BAR:HP $\beta$ CD	Ácido barbático complexado a 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
CDs	Ciclodextrinas
CE	Eficiência de complexação
D.P.	Desvio padrão
g	Gramas
h	Hora
HP $\beta$ CD	2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina
K	constante de solubilidade
kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
nm	nanômetro
PO	Pós operatório
r	Raio
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
UV	Ultravioleta
$\alpha$ CD	$\alpha$ -ciclodextrina
$\beta$ CD	$\beta$ -ciclodextrina
$\gamma$ CD	$\gamma$ -ciclodextrina

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
±	Mais/menos
°C	Graus Celsius
β	Beta
γ	Gama
α	Alfa
<	Menor que
λ	Comprimento de onda

## INTRODUÇÃO GERAL

Apesar dos recentes avanços em modelos de fármacos, a química sintética e a biotecnologia promoverem o desenvolvimento de fármacos novos e potentes, os produtos naturais como plantas e líquens continuam sendo a maior fonte para obtenção de medicamentos para diversos fins. Atualmente, há uma diversidade de compostos naturais bioativos com potencial atividade farmacológica, muitos deles com atividade já comprovada. A possibilidade de utilização econômica das substâncias líquênicas tornam esses seres de particular interesse para a pesquisa fundamental, em face de sua utilização na medicina popular (GARROS et al., 2006; RIBAS et al., 2006; SEGUNDO et al., 2007).

Os líquens são organismos complexos (SULEYMAN et al., 2003) que fazem parte de um grupo extremamente diversificado de fungos, encontrados na natureza simbioticamente associados a algas e/ou cianobactérias (MENEZES et al., 2011). O processo de associação é denominado liquenização e ocorre em mais de 20% de todas as espécies de fungos conhecidas, representando aproximadamente 46% dos fungos do filo Ascomycota (NASH, 2008). O produto desta associação é um talo, o qual pode ter milhões de fotobiontes vivendo em simbiose com um micobionte e, portanto, pode até ser encarado como uma minicomunidade, onde vivem indivíduos de espécies e reinos diferentes. As algas podem ser cianobactérias ou algas verdes. Já os fungos pertencem, em sua grande maioria, ao filo Ascomycota (98% dos líquens), com poucos representantes no filo Basidiomycota (MENEZES et al., 2011).

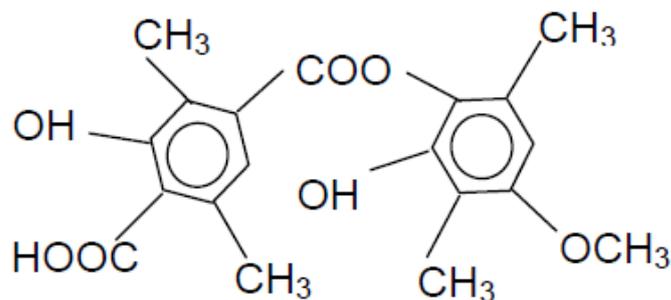
Segundo Menezes e colaboradores (2011), os fungos liquenizados exercem diferentes funções nos ecossistemas, assim como são importantes algumas de suas aplicações pelo homem, por exemplo, o uso destes organismos como bioindicadores de poluição e perturbação antrópica. Por serem muito sensíveis à poluição atmosférica, os líquens são utilizados como instrumento para medição da qualidade do ar, pois sua alta sensibilidade a determinados compostos presentes no ar diminui sua vitalidade. Por não apresentarem estomas e nem cutícula em sua anatomia, os gases presentes no ar podem ser absorvidos pelo talo e difundirem-se com o tecido, local onde se encontra o fotobionte, que é responsável pela produção de energia através da fotossíntese. Por essa condição, os líquens são bastante utilizados como bioindicadores de poluição atmosférica. Dentre os poluentes atmosféricos,

destacam-se principalmente o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>), material particulado, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), metais pesados, oxidantes fotoquímicos como o ozônio (O<sub>3</sub>) e o nitrato de peroxiacetila (PAN) (MARTINS et al., 2008).

Na presença de luz, os líquens produzem uma variedade de produtos altamente complexos e peculiares com propriedades biológicas diversas. (PIOVANO et al., 2002). Esses produtos, denominados metabólitos liquênicos, geralmente são divididos em dois grupos: primários e secundários. Os metabólitos primários são proteínas, lipídeos, carboidratos e outros compostos orgânicos envolvidos no metabolismo e estrutura dos líquens. Os metabólitos secundários são moléculas mais complexas, usualmente insolúveis em água e que podem ser extraídas através de solventes orgânicos (MITROVIC et al., 2011). Esses metabólitos são em geral depsídeos, depsidonas e ácidos úsnicos, dentre outras classes de compostos, alguns ainda não identificados (HUNECK; YOSHIMURA, 1996; MÜLLER, 2001).

Das substâncias ativas de origem liquênica, o ácido úsnico é o mais extensivamente estudado (INGÓLFSÓTTIR, 2002). No entanto, muitos outros compostos vêm ganhando destaque graças ao potencial que apresentam para o uso farmacêutico, como a atranorina, o ácido barbático, o ácido lobárico, o ácido fumarprotocetrárico, o ácido difractáico, dentre outros (MÜLLER, 2001).

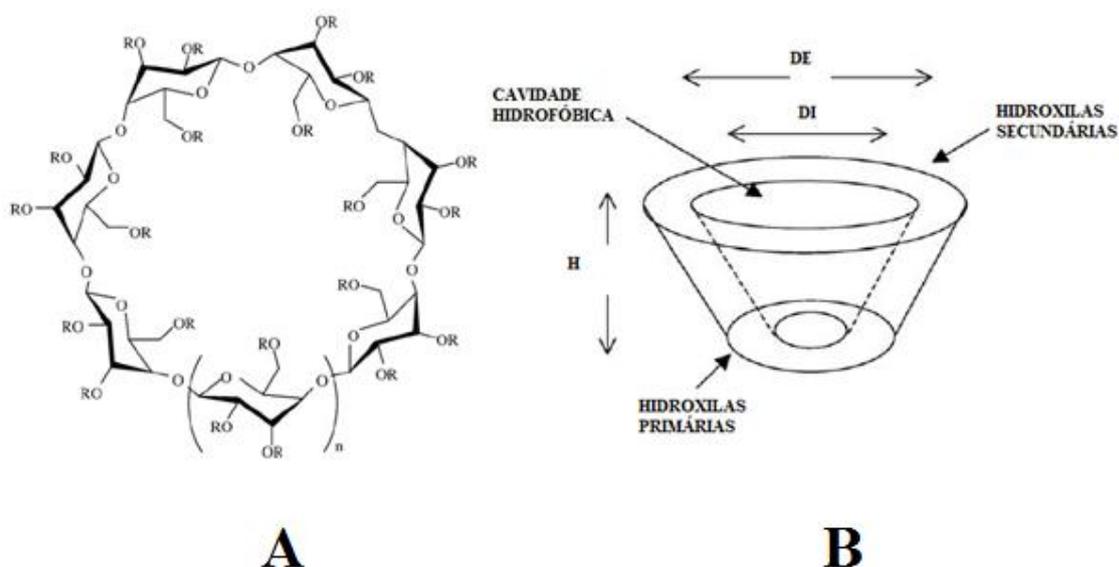
O ácido barbático (BAR) é um depsídeo extraído de *Cladonia salzmannii*, tem estrutura química C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>7</sub>, formado por seis anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster, apresentando um grupo carboxílico em um agrupamento do anel (HUNECK; YOSHIMURA, 1996; HONDA; VILEGAS, 1998). Caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação amarelo-pálido, com cristais em forma de pequenas agulhas, massa molecular de 324 g/mol, ponto de fusão em torno de 187 °C e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em éter, acetona e clorofórmio (Figura 1) (EDWARDS et al., 2003).



**Figura 1.** Estrutura química do ácido barbático (AHTI et al., 1993).

Dentre as atividades biológicas citadas na literatura, destacam-se os efeitos antiviral, antibiótico, antifúngico (PIOVANO et al., 2002), inibidor do crescimento de plantas superiores e inibidor enzimático (HUNECK; YOSHIMURA, 1996). Pereira e colaboradores (1997) detectaram ação antimicrobiana em extratos orgânicos de *Cladonia substellata* e *C. crispatula*, identificando o ácido úsnico e o ácido barbático como princípio ativo das espécies e como tendo ação contra microorganismos, células cancerígenas e tumores. Seus estudos demonstraram que tal substância impedia o desenvolvimento de fungos e bactérias Gram-positivas. Em estudos preliminares, os extratos orgânicos de ácido barbático de líquens coletados no estado de Minas Gerais mostrou propriedade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* (UFPEDA - 39) (MARTINS, 2010).

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos que possuem estrutura rígida e são formados por unidades de glicopiranosas unidas por ligações  $\alpha$  (1-4). Têm a forma de um cone truncado, onde os grupos OH secundários ligados aos carbonos C-2 e C-3 ocupam a base de maior diâmetro do tronco, enquanto as hidroxilas primárias ligadas ao carbono C-6 localizam-se na base menor do tronco (Figura 2) (CHALLA et al., 2005).



**Figura 2.** Estrutura química de uma ciclodextrina (A) e desenho esquemático (B) ilustrando a cavidade hidrofóbica, a posição das hidroxilas primárias e secundárias e suas dimensões: altura (H), diâmetro interno (DI) e diâmetro externo (DE) (adaptado de BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

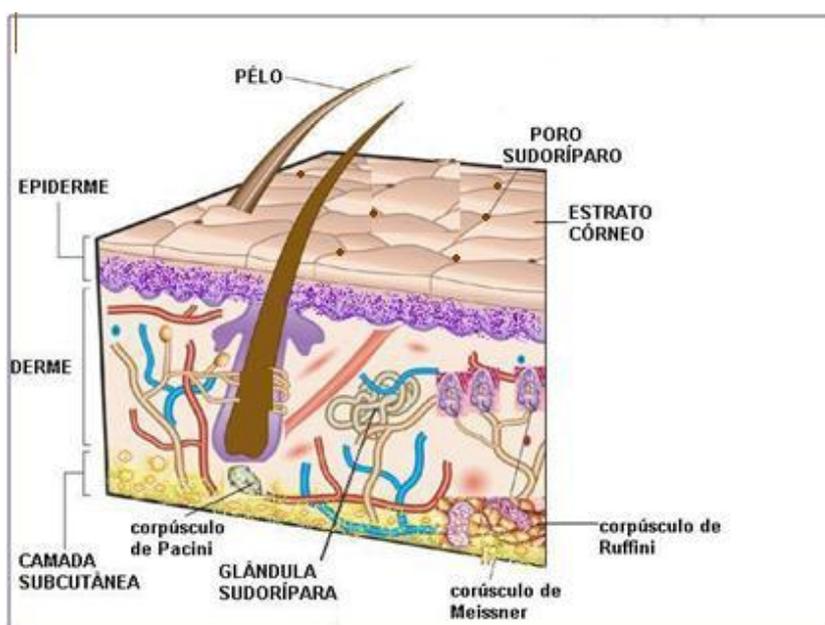
A formação de uma cavidade central hidrofóbica e uma superfície externa hidrofílica nas ciclodextrinas é favorecida pela disposição espacial dos grupamentos químicos, permitindo, desta forma, o processo de complexação molecular. Geralmente, substâncias químicas de baixa polaridade podem alojar-se no interior da cavidade das CDs formando complexos de inclusão dinâmicos em solução (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem, principalmente, o aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água; ademais, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo, diminuindo os efeitos colaterais. Na formação de complexos com ciclodextrina é necessário que a molécula hóspede, ou parte da molécula, entre em contato com a cavidade da ciclodextrina para que seja formada uma associação estável. Uma variedade de forças não-covalentes, como forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, são responsáveis pela formação do complexo, não ocorrendo interações fortes como ligações covalentes (DEVARAKONDA et al., 2005).

Estudos apresentam a ciclodextrina sendo utilizada como carreador de liberação controlada, formando complexos de inclusão com anestésicos locais como etidocaína, lidocaína, prilocaína, mepivacaína e, especialmente, bupivacaína, possibilitando a manipulação de algumas propriedades físico-químicas além de melhorar seus efeitos terapêuticos, favorecendo sua utilização clínica pela formação de complexo de inclusão com a HP $\beta$ CD (ARAÚJO et al., 2003; ARAÚJO et al., 2005). Burgos e colaboradores (2012) demonstraram a formação de complexo de inclusão entre citrato de ródio (II) e  $\beta$ -ciclodextrina, onde o composto de associação foi preparado em razão molar 1:1 em solução aquosa. Há ainda na literatura complexos de inclusão de ciclodextrina com diversos fármacos como o ácido úsnico (LIRA et al., 2009), carvedilol (HIRLEKAR; KADAM, 2009), a azitromicina (PASQUINI; PASQUINI, 2008), o estradiol (DE PAULA et al., 2007), o ácido 13-cis-retinóico (YAP et al., 2005), a  $\beta$ -lapachona (NASONGKLA et al., 2003; CAVALCANTI et al., 2011), o itraconazol (MIYAKE et al., 1999), o ibuprofeno (OH et al., 1998), dentre outros.

A pele é uma importante via de aplicação de fármacos, e nos últimos anos houve um aumento significativo dos estudos para o desenvolvimento de formulações específicas para esse fim. A utilização da via transdérmica oferece vantagens em relação às demais vias convencionais, pois evita o metabolismo de primeira passagem e a degradação pelo trato gastrointestinal. O metabolismo de primeira passagem hepática, comum para fármacos administrados pela via oral, é o responsável por diminuir a biodisponibilidade e degradar diversos fármacos. Além disso, alguns efeitos indesejáveis no estômago, como ocorrem com anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) administrados pela via oral, podem gerar efeitos secundários, como náuseas, dispepsia, diarreia, constipação, ulceração e sangramento na mucosa, o que não ocorre pela via transdérmica (JALÓN et al., 2000; BORTOLON et al., 2008). Ademais, a via transdérmica oferece vantagem sobre a via intravenosa e intramuscular por ser indolor e não invasiva, aumentando a adesão do paciente à terapia (SWART et al., 2005; OZGUNEY et al., 2006; BADRAN et al., 2009). Porém, poucas moléculas conseguem ultrapassar as barreiras da pele (VIANNA et al., 2011). A permeação de substâncias na pele depende, principalmente, de suas propriedades físico-químicas, do seu comportamento quando colocado em um sistema farmacêutico apropriado (CHORILLI et al., 2003).

A epiderme é a camada que protege a pele contra o ambiente externo. Ela apresenta, em sua superfície epitelial externa, o estrato córneo, que é uma camada de células mortas, queratinosas e que funciona como uma barreira eficaz contra microorganismos patogênicos, além de controlar a permeação de componentes pela pele, sendo, na verdade, o estrato córneo considerado a principal barreira à permeação dos fármacos através da pele (Figura 3) (CHORILLI et al., 2003).



**Figura 3.** Ilustração das camadas da pele (adaptado de BEAR et al., 2002; VIANNA et al., 2011).

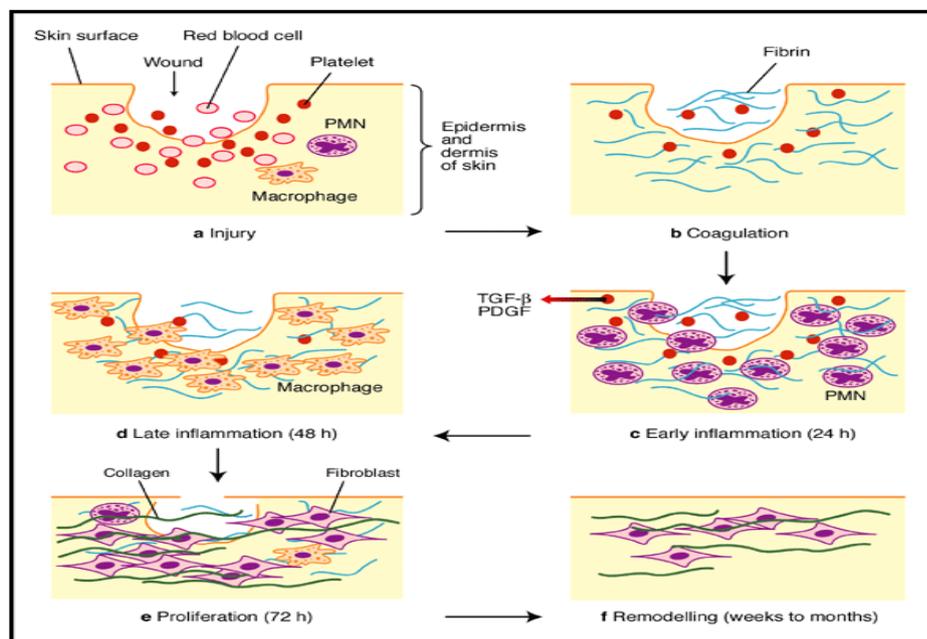
Diversas estratégias têm sido pesquisadas, com os estudos farmacêuticos apontando para o uso de promotores de permeação, bem como o emprego da nanotecnologia no desenvolvimento e produção de sistemas de liberação de fármacos com capacidade de promover sua permeação através da pele (SILVA, 2010). Os desafios implicados no desenvolvimento de formas farmacêuticas transdérmicas são direcionados, sobretudo, a se favorecer de uma liberação eficiente e permeação dos princípios ativos através das camadas da pele, que se apresentam como barreira à penetração de fármacos. Sobre isso, destacam-se novas formas farmacêuticas, como as microemulsões e formulações semi-sólidas

tipo gel, que apresentam propriedades físico-químicas e parâmetros farmacotécnicos adequados para o uso transdérmico (ZHAO, 2009).

É importante assinalar que o desenvolvimento de formulações que garantam uma penetração eficiente através da barreira do estrato córneo é fundamental, já que a forma farmacêutica tem importância na absorção do fármaco. Nesse sentido, alguns aspectos devem ser considerados, tais como natureza e concentração de ingredientes ativos, tipo de excipientes e tipo de sistema usado para transportar o fármaco (SILVA, 2010). Oliveira (2008) relata que fármacos que apresentam uma elevada hidrofília, quando incorporados em formulações destinadas à permeação da via cutânea, terão dificuldade em penetrar o estrato córneo. Por outro lado, se o fármaco apresentar elevada lipofília, terá tendência a ficar retido. Por esse motivo, é importante que o fármaco não apresente um grau de lipofília muito elevado, mas que o seu equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) permita a sua partição, o que acontece quando o seu coeficiente de partição situar-se entre cerca de 1 a 3nm.

Após uma lesão da pele, dá-se início ao processo de cicatrização, o qual tem por finalidade reestabelecer a homeostasia tecidual. Nos processos cicatriciais, a formação do tecido de granulação e a epitelização sempre motivaram estudos com a finalidade de esclarecer aspectos da neoformação tecidual, como também para verificar os efeitos de medicação sistêmica ou tópica na evolução deste processo, sendo este fundamental, pois sem ele a lesão seria um caminho para os microorganismos e para a perda de sangue (ABBAS et al., 2010). Segundo Isaac (2011), a agressão ao tecido induz uma cascata de reações bioquímicas e celulares que se destinam a reparar a integridade dos tecidos.

O processo de reparação tecidual é dividido em fases, de limites não muito distintos, mas sobrepostas no tempo: hemostasia; fase inflamatória; formação do tecido de granulação, com deposição de matriz extracelular (colágeno, elastina e fibras reticulares); e remodelação (OLIVEIRA; DIAS, 2012). Segundo Kokane e colaboradores (2009), o processo de cicatrização de uma ferida está dividido em três fases: inflamação celular, proliferativa e remodelação. Na primeira fase ocorrem a coagulação e inflamação (0 - 3 dias), envolvendo migração de neutrófilos. A fase proliferativa (3-12 dias) ocorre quando o tecido de granulação invade progressivamente o espaço da incisão, já a fase de remodelação (3- 6 meses) envolve acumulação contínua de colágeno e proliferação de fibroblastos (Figura 4) (COTRAN et al., 1997).



**Figura 4.** Representação esquemática das fases da cicatrização de feridas cutâneas. (VITORINO FILHO, 2011).

A complexação do ácido barbático a ciclodextrinas, somada a sua incorporação em uma formulação semi-sólida tipo gel é, desta forma, uma excelente alternativa para a utilização desta substância líquida como agente terapêutico, a fim de superar as limitações relacionadas à solubilidade bem como biodisponibilidade do fármaco, garantindo maior segurança e eficácia terapêutica.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Desenvolver formulações tópicas tipo gel contendo complexo de inclusão ácido barbático:2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina e a avaliar o reparo tecidual em ratos Wistar.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estudar a solubilidade de fases do ácido bártico em função da 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina;
- Preparar complexos de inclusão entre o ácido barbático e 2-hidroxiopropil- $\gamma$ -ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD);
- Desenvolver formulações tópicas do tipo gel contendo os complexos de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD;
- Avaliar o processo de reparo tecidual em ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., FAUSTO, K. V. ROBBINS & COTRAN – Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L., 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Biology**, 7, 55-70.

ARAÚJO, D. R. et. al. Sistema de Liberação Controlada com Bupivacaína Racêmica (S50-R50) e Mistura Enantiomérica de Bupivacaína (S75-R25): Efeitos da Complexação com Ciclodextrinas no Bloqueio do Nervo Ciático em Camundongos. **Rev Bras Anesthesiol.**, 2005; 55: 3: 316 – 328

ARAÚJO, D. R.; PINTO, L. M. A.; BRAGA, A. F. A. et al - Formulações de anestésicos locais de liberação controlada: aplicações terapêuticas. **Rev Bras Anesthesiol.**, 2003; 53:663-671.

BADRAN MM, KUNTSCHE J, FAHR A. Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. **Eur J Pharm Sci.** 2009; 36(4-5):511-23.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: Desvendando o sistema nervoso**, 2<sup>a</sup>. Ed., Artmed Editora: Porto Alegre, 2002.

BORTOLON FF, SATO ME, ANDREAZZA RCS, BRESOLIN TMB. Effect of enhancers on the in vitro percutaneous absorption of piroxicam from compounding formulations. **Rev Bras Farm.** 2008; 44(3):433-49.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.59, p.645-666, 2007.

BURGOS et al. Preparação do composto de associação entre citrato de rório (II) e  $\beta$ -Ciclodextrina. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 4, 762-765, 2012.

CAVALCANTI, I.M.F.; MENDONÇA, E.A.M.; LIRA, M.C.B., et al. The encapsulation of  $\beta$ -lapachone in 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: A physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **Eur. J. Pharm. Sci.** 2011;44:332–340.

CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.6, p.329-357, 2005.

CHORILLI, M.; POLACOW, M. L. O.; LEONARDI, G. R.; PIRES-DE-CAMPOS, M. S. M.; ZAGUE, V.; RIBEIRO, M. C. A. P. Estudo da influência do ultra-som na eficácia de gel acrescido de hialuronidase através de avaliação histológica. **Cosmet Toilet.** 2003; 15(3):58.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T., 1997. **Robbin's Pathological Basis of Disease**, 6<sup>th</sup> ed. A Harcourt Publishing International Company, Singapore, pp. 107–109.

DE PAULA, D.; OLIVEIRA, D.C.R.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancing effect of modified beta-cyclodextrins on *in vitro* skin permeation of estradiol. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.43, p.111-120, 2007.

DEVARAKONDA, B.; HILL, A.R.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; VILLIERS, M.M. Comparasion of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine dendrimers and cyclodextrins. **Intern J Pharm**, 304: 193–209, 2005.

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, D.D. Molecular structural studies of lichen substances II: Atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid. **J Mol Struc**, 651-653, 2003.

GARROS. I.C. e col. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológica. **Acta Cirúrgica Brasileira - Vol 21 (Suplemento 3) 2006 – 55.**

HIRLEKAR, R.; KADAM, V. Preparation and characterization of inclusion complexes of carvedilol with methyl- $\beta$ -cyclodextrin. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.63, p.219-224, 2009.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. Química dos líquens-Divulgação. **Química Nova**, São Paulo, v. 21:110-125, 1998.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I. **Identification of Lichen Substances**. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 251 p, 1996.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochem.**, v.61, p.729-736, 2002.

ISAAC, C.; et al. Keratinocytes have a role in wound contraction: evaluation of impact using a fibroblast populated collagen matrix model. **Rev. Bras. Cir. Plást.** 2011; 26(3): 402-6.

JALÓN EG, JOSA M, CAMPANERO MA, SANTOYO S, YGARTUA P. Determination by high-performance liquid chromatography of ketoprofen in vitro in rat skin permeation samples. **J Chromatogr A.** 2000; 870(1-2): 143-9.

KOKANE, D.D. et al. Evaluation of wound healing activity of root of *Mimosa pudica*. **Journal of Ethnopharmacology**, 124 (2009) 311–315.

LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D.G.V.C.; CORTES, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; CAETANO, N.P.; SINISTERRA, R.D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.64, p.215-224, 2009.

MARTINS, M. C. B. et al.. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and. Antimicrobial Activity. Vol.53, n. 1: pp. 115-122, Jan-Fev 2010.

MARTINS. M.R.; CORTEZ.L.E.R.; FELIPE.D.F. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregado o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 259-263, set./dez. 2008.

MENEZES, A. A.; LEITE, A. B. X.; OTSUKA, A. Y.; JESUS, L. S.; CÁCERES, M. E. S. Novas ocorrências de líquens corticícolos crostosos e microfoliosos em vegetação de Caatinga no semi-árido de Alagoas. **Acta Botanica Brasilica** 25(4): 885-889. 2011.

MITROVIC, T. et al. Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. **International Journal of Molecular Sciences**. 2011.

MIYAKE, K.; IRIE, T.; ARIMA, H.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K.; HIRANO, M.; OKAMOTO, Y. Characterization of itraconazole:2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in aqueous propylene glycol solution. **Int. J. Pharm.**, v.179, p.237-245, 1999.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.56, p.9-16, 2001.

NASH, T.H. III. 2008. Introduction. Pp. 1-8. In: Nash, T.H. III (Ed.) **Lichen Biology**. 2 ed. Cambridge, Cambridge University Press.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A.F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNAMANN, W.G.; BOOTHMAN, D.A.; JINMING, G. Enhancement of solubility and bioavailability of  $\beta$ - lapachone using cyclodextrin inclusion complex. **Pharm. Res.**, v.20, p.1626-1633, 2003.

OH, I.; LEE, M.; LEE, Y.; SHIN, S.; PARK, I. Spectroscopic characterization of ibuprofen/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. **Int. J. Pharm.**, v.175, p.215-223, 1998.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C.; Cicatrização de Feridas: Fases e Fatores de Influência. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.267-271, 2012.

OLIVEIRA, R.C.S. **Desenvolvimento, formulação e avaliação de sistemas de libertação transdérmica incorporando sistemas ternários de complexação (Fármaco/ Ciclodextrina/ Polímero)** [Tese]. Portugal: Universidade do Porto; 2008.

OZGUNEY IS, KARASULU HY, KANTARCI G, SÖZER S, GÜNERI T, EERTAN G. Transdermal delivery of diclofenac sodium through rat skin from various formulations. **AAPS Pharm Sci Tech**. 2006; 7 ( 4): 39-45.

PASQUINI, N.C.; PASQUINI, N.L.S. Biodisponibilidade da azitromicina livre e complexada em  $\beta$ -ciclodextrinas. **Rev. Elet. Farm.**, v.1, p.46-51, 2008.

PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; XAVIER-LAURO, L.; LEGAZ, M.E. & VICENTE, C. 1997. Antimicrobial activity and biologically-active compounds from lichen *Cladonia crispatula*, **Boletim Ecotropical Ecosystemas Tropicais**, 31: 9-19.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GIANNINI. F. A.; CORRECHE, E. R.; FERESIN. G.; TAPIA, A.; ZACCHINO. S.; ENRIZ. R. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**. v. 47. p. 235-240. 2002.

RIBAS, O.R.M.; SOUSA, M.H.; SARTORETTO, J.; LANZONI, T. A.; NORONHA, L.; ACRA, L.A. Efeito da *Schinus terebinthifolius* sobre o processo de reparação tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. **Rev. Odonto. Ciênc.**, v.21, p.245-252, 2006.

SEGUNDO, A.S.; BOSCO, A.F.; MAIA, D.; RIBEIRO, R.V.; AGUIAR, E.B.H.; DIAS ROCATTO, G.; CIRILO, D. M.; BUZELLE, S.L.; VEDOVE, T.A. Influência do Aloe vera e Própolis na contração de feridas em dorso de ratos. **Periodontia**, v.17, p.5-10, 2007.

SILVA, J.A.; APOLINÁRIO, A.C.; SOUZA, M.S.R., DAMASCENO, B.P.G.L., MEDEIROS, A.C.D.. Administração cutânea de fármacos: desafios e estratégias para o desenvolvimento de formulações transdérmicas. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2010;31(3):125-131.

SULEYMAN, F. H.; ODABASOGLU, A. ASLAN, A. CAKIR, Y. KARAGOZ, F. GOCER, M. HALICI, AND Y. BAYIR, 2003. **Anti-inflammatory and antiulcerogenic effects of the aqueous extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm.** *Phytomedicine* 10: 552–557.

SWART H, BREYTENBACH JC, HADGRAFT J, PLESSIS J. Synthesis and transdermal penetration of NSAID glycoside esters. **Int J Pharm.** 2005; 301(1-2):71-9.

VIANNA, D. R.; SILVA, B. V.; HAMERSKI, L. Eletroporação e iontoforese para liberação de fármacos através da pele. **Rev. Virtual Quim.**, 2010, 2 (4), 271-279. Data de publicação na Web: 16 de janeiro de 2011.

VITORINO FILHO, R.N.L.; Uso de Polissacarídeo Extraído do Exsudado de Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) na Terapêutica Tópica de Feridas. 2011, 66p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Animal) – Universidade Federal do Piauí.

YAP, K.L.; LIU, X.; THENMOZHIAL, J.C.; HO, P.C. Characterization of the 13-*cis*-retinoic acid/cyclodextrin inclusion complexes by phase solubility, photostability, physicochemical and computational analysis. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.25, p.49-56, 2005.

ZHAO, Y. et al. Engineering novel topical foams using hydrofluoroalkane emulsions stabilized with pluronic surfactants. **Eur J Pharm Sci.**; v. 37, n. 3-4, p. 370-7. 2009a.

**ARTIGO A SER SUBMETIDO AO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY****Efeito do Ácido Barbático de *Cladonia salzmannii* NYL (Liquen) sobre o Reparo Tecidual de Lesões Induzidas em Ratos Wistar**

Marllyn Marques da Silva<sup>3</sup>, Mosar Lopes da Silva<sup>1,2</sup>, Camilla Vila Nova Soares Silva<sup>4</sup>,  
Thiers Araújo Campos<sup>3,4</sup>, Maria Claudiana Santos Rodrigues<sup>3</sup>, Francisco Carlos  
Amanajás Aguiar-Júnior<sup>3</sup>, Noemia Pereira da Silva Santos<sup>3,4\*</sup>, Nicácio Henrique da  
Silva<sup>1,2</sup>

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

\* Autor para correspondência:

Dr. Noemia Pereira da Silva Santos  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)  
Centro Acadêmico de Vitória (CAV)  
Laboratório de Biotecnologia e Fármacos  
Rua Alto do Reservatório, S/N,  
Bela Vista, 55608-680  
Vitória de Santo Antão - PE, Brasil  
Telefone: 55 (81) 3523-3351  
(Fone/Fax) E-mail: npereiradasilvasantos@gmail.com

## RESUMO

**Relevância etnofarmacológica:** O ácido barbático (BAR) é um depsídeo isolado de *Cladonia salzmannii* que apresenta diversas propriedades biológicas, tais como antiviral, antibiótica, antifúngica, antipirética e anti-inflamatória.

**Objetivo do estudo:** O objetivo deste estudo foi desenvolver formulações tópicas tipo gel contendo complexo de inclusão ácido barbático:2-hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina e avaliar o reparo tecidual em ratos Wistar.

**Material e métodos:** Os complexos de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD foram obtidos pela técnica de *freeze-drying*. O ácido barbático em suspensão e em complexos de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD foram incorporados em formulações semi-sólidas tipo gel de Natrosol®. A avaliação do reparo tecidual foi realizada em ratos machos Wistar e após excisão, foi realizada análise microscópica.

**Resultados:** O complexo de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD apresentou um rendimento de 98,03% e um teor de 95,04%  $\pm$  0,021 do ácido barbático. A evolução das feridas produzidas nos animais tratados com o gel contendo complexo de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD demonstrou a presença de crosta, aumento de proliferação fibroblástica e diminuição do infiltrado inflamatório, culminando com uma evidente reepitelização e colagenização. Analisando-se a proliferação de fibroblastos, visualizou-se diferença significativa, percebendo-se um aumento visível nos animais tratados com gel contendo BAR:HP $\gamma$ CD ( $138,8 \pm 41,5$ ) quando comparado aos animais tratados com gel contendo o ácido barbático ( $115,7 \pm 34,3$ ) ( $p > 0,05$ ). Os animais tratados com gel contendo o ácido barbático livre apresentaram maior quantidade de fibroblastos quando comparados ao grupo de animais tratados com gel base.

**Conclusões:** O ácido barbático complexado à ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD) foi capaz de auxiliar no processo de regeneração tecidual.

**Palavras-chave:** líquens, ácido barbático; hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina; cicatrização

## ABSTRACT

***Ethnopharmacological relevance:*** Barbatic acid (BAR) is a depside isolated from *Cladonia salzmannii* that presents several biological properties, such as antiviral, antibiotic, antifungal, antipyretic e anti-inflammatory.

***Aim of the study:*** The aim of this study was to develop gel-like topical formulations containing inclusion complex barbatic acid:2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin and evaluate the tissue repair process in Wistar rats.

***Material and methods:*** Inclusion complex BAR:HP $\gamma$ CD were obtained by freeze-drying. Barbatic acid in suspension and inclusion complex BAR:HP $\gamma$ CD were incorporated in Natrosol® gel-like topical formulations. The tissue repair evaluation was performed in male Wistar rats with posterior microscopical analysis.

***Results:*** Inclusion complex BAR:HP $\gamma$ CD presented a yield of 98,03% and a barbatic acid content of 95,04%  $\pm$  0,021. The evolution of the wounds produced in animals treated with the gel containing inclusion complex BAR:HP $\gamma$ CD demonstrated the presence of a crust, increase of fibroblast proliferation and decrease of inflammatory infiltrate, culminating with an evident reepithelialization and collagenization. Analyzing fibroblasts proliferation, a significant difference was visualized with a visible increase in the animals treated with the gel containing BAR:HP $\gamma$ CD (138,8 $\pm$ 41,5) when compared to animals treated with the gel containing barbatic acid (115,7 $\pm$ 34,3) ( $p > 0,05$ ). Animals treated with the gel containing barbatic acid presented a greater amount of fibroblasts when compared to the group of animals treated with the base gel.

***Conclusions:*** The barbatic acid complexed to cyclodextrin (BAR:HP $\gamma$ CD) was capable to assist in tissue repair process.

**Key-words:** lichen, barbatic acid; hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin; healing

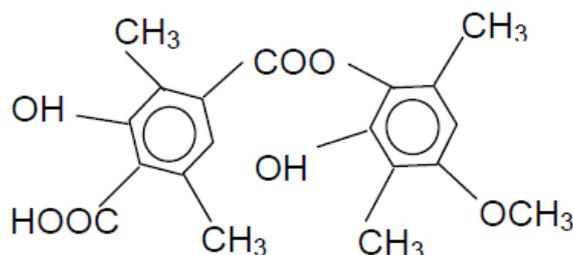
## 1. Introdução

Os líquens são organismos complexos (Suleyman et al., 2003) e fazem parte de um grupo extremamente diversificado de fungos, encontrados na natureza simbioticamente associados a algas e/ou cianobactérias (Menezes et al., 2011).

Os líquens são capazes de produzir substâncias químicas, as quais são agrupadas, de acordo com a localização no talo, em produtos intracelulares e extracelulares. Os produtos intracelulares incluem proteínas, aminoácidos, polióis, carotenóides, polissacarídeos e vitaminas, e estão ligados à parede celular e ao protoplasto. Já os extracelulares, frequentemente chamados metabólitos secundários, são encontrados na medula ou no córtex dos líquens, raramente em ambas as camadas. Classificam-se em grupos químicos bioenergeticamente relacionados: depsídeos, depsidonas, dibenzofuranos e ácidos úsnicos (Honda & Vilegas, 1998). Estes metabólitos são usualmente insolúveis em água e podem ser extraídos através de solventes orgânicos (Mitrovic et al., 2011).

As substâncias liquênicas vêm despertando grande interesse de pesquisadores em diversas áreas como farmacologia, microbiologia, indústria de cosméticos, dentre outras, com sua eficiência justificando pesquisas por novas substâncias liquênicas (Piovano et al., 2002).

Dentre as substâncias, pode-se citar o ácido barbático (BAR), um depsídeo de estrutura química  $C_{19}H_{20}O_7$ , formado por seis anéis aromáticos interligados entre si por uma ligação éster, apresentando um grupo carboxílico em um agrupamento do anel (Huneck & Yoshimura, 1996; Honda & Vilegas, 1998). Caracteriza-se por ser uma substância de pigmentação amarelo-pálido, com cristais em forma de pequenas agulhas, massa molecular de 324 g/mol, ponto de fusão em torno de 187 °C e uma limitada solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel em éter, acetona e clorofórmio (Figura 5) (Edwards et al., 2003).



**Figura 1.** Estrutura química do ácido barbático (Ahti et al., 1993).

Dentre as atividades biológicas citadas na literatura, destacam-se os efeitos antiviral, antibiótico, antifúngico (Piovano et al., 2002), inibidor do crescimento de plantas superiores e inibidor enzimático (Huneck & Yoshimura, 1996). Pereira e colaboradores (1997) detectaram ação antimicrobiana em extratos orgânicos de *Cladonia substellata* e *C. crispatula*, identificando o ácido úsnico e o ácido barbático como princípio ativo das espécies e como tendo ação contra microorganismos, células cancerígenas e tumores. Seus estudos demonstraram que tal substância impedia o desenvolvimento de fungos e bactérias Gram-positivas. Em estudos preliminares, os extratos orgânicos de ácido barbático de líquens coletados no estado de Minas Gerais mostrou propriedade antimicrobiana contra *Bacillus cereus* (UFPEDA - 39) (Martins et al., 2010).

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de glicose unidas entre si por ligações  $\alpha$  (1-4), obtidas a partir da degradação enzimática do amido (Burgos et al., 2012). Esta combinação fornece às ciclodextrinas uma cavidade hidrofóbica e um exterior hidrofílico. A cavidade interna hidrofóbica concede a capacidade de formar complexos de inclusão com uma variedade de moléculas hidrofóbicas, como compostos aromáticos, alcoóis, haletos, ácidos graxos, ésteres, dentre outros. Os complexos de inclusão têm sido amplamente estudados porque promovem, principalmente, o aumento da solubilidade de substâncias pouco solúveis em água; ademais, a complexação proporciona uma melhoria na estabilidade química, maior biodisponibilidade e diminuição dos efeitos indesejáveis do princípio ativo, diminuindo os efeitos colaterais que o fármaco possa apresentar (Devarakonda et al., 2005).

O desenvolvimento de sistemas tópicos de liberação de fármacos para a pele tem se intensificado nos últimos anos com o objetivo de superar os problemas associados às propriedades da pele, sendo o estrato córneo a principal barreira para

a permeação de substâncias (Vianna et al., 2011). A pele é uma importante via de aplicação de fármacos, oferecendo vantagens em relação às demais vias convencionais, pois evita o metabolismo de primeira passagem e a degradação pelo trato gastrointestinal. (Vianna et al., 2011).

Em vista disso, este trabalho teve como objetivo viabilizar a utilização do ácido barbático através do uso da hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP $\gamma$ CD) como agente solubilizante, aumentar a solubilidade através da complexação com ciclodextrina (HP $\gamma$ CD), incorporação do complexo em gel e avaliação do processo de reparo tecidual.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Estudo da solubilidade de fases do ácido barbático (BAR) e hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP $\gamma$ CD)

O estudo da solubilidade de fases foi realizado de acordo com o método de (Higuchi e Connors, 1968). O ácido barbático (3 mg) foi colocado em microtubo contendo 1 mL de água deionizada ou soluções aquosas de HP $\gamma$ CD em diferentes concentrações (0,0; 20; 40; 60; 80 e 100 mM), sendo submetidos a uma agitação vigorosa na temperatura de 25°C. Após 72 horas de agitação, uma alíquota da mistura foi retirada, centrifugada (15.000 rpm/15min), e o ácido barbático foi determinado por espectrofotometria UV em 275 nm (Lira et al., 2008). O diagrama de solubilidade de fases foi obtido a partir da concentração do ácido barbático em função da concentração de HP $\gamma$ CD. Os dados foram analisados por regressão linear e a equação da reta ajustada  $[BAR] = a [HP\gamma CD] + b$ , onde  $a$  e  $b$  correspondem à inclinação e a ordenada na origem, respectivamente, foi utilizada para o cálculo da constante de associação ( $K_{1:1}$ ), considerando uma relação molar na formação do complexo BAR:HP $\gamma$ CD e a solubilidade do ácido barbático em água na ausência da HP $\gamma$ CD ( $S_0$ ), pela seguinte fórmula:

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

A eficiência de complexação (CE) do ácido barbático foi determinada a partir de dados do estudo de solubilidade de fases de acordo com a equação abaixo (Loftsson et al., 2007):

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

## 2.2 Preparação do complexo de inclusão ácido barbático e hidropropil- $\gamma$ -ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD)

Os complexos de inclusão BAR:HP $\gamma$ CD foram obtidos pela técnica de *freeze-drying* (Lira et al, 2009). Neste procedimento, a HP $\gamma$ CD (94,8 mg) foi inicialmente solubilizada em água e o BAR (20 mg) foi adicionado posteriormente, na proporção molar de 1:1. O complexo fármaco:ciclodextrina em solução permaneceu sob agitação magnética à temperatura ambiente até atingir condições de equilíbrio (72 h), sendo em seguida congelado a -80 °C e posteriormente submetido ao processo de liofilização. Os complexos liofilizados foram acondicionados em dessecador à temperatura ambiente até utilização.

O conteúdo de ácido barbático presente nos complexos de inclusão foi quantificado através de espectrofotometria UV a 275 nm. Uma curva padrão do ácido barbático (0,5 a 8  $\mu$ g/mL) foi preparada em metanol com o objetivo de determinar as concentrações das amostras analisadas.

## 2.3 Preparação das formulações semi-sólidas tipo gel Natrosol

Foi preparada uma base galênica geleificante de característica hidrofílica empregando-se hidroxietilcelulose (Natrosol®250) como polímero, na qual foi incorporado o ácido barbático na forma livre e complexado a hidropropil- $\gamma$ -ciclodextrina (BAR:HP $\gamma$ CD). Para preparação do gel base, foram pesados separadamente Natrosol®, Nipagin®, Nipazol®, propilenoglicol (PEG), água e o ácido barbático (Tabela 1).

<b>COMPONENTES</b>	<b>PESO</b>	<b>%</b>
<b>HEC (Natrosol®)</b>	0,2g	1
<b>Nipagin®</b>	0,004g	0,02
<b>Nipazol®</b>	0,036g	0,18
<b>PEG</b>	1g	5
<b>H<sub>2</sub>O</b>	18,64g	93,2
<b>BAR</b>	0,120 g	0,6

**Tabela 1.** Componentes da formulação semi-sólida tipo gel (20g).

Inicialmente, Nipagin® e Nipazol® foram solubilizados num banho ultrassônico juntamente com o propilenoglicol. Em seguida, houve a adição de água destilada previamente aquecida a 60°C sob agitação magnética. Colocou-se então 10 µl de NaOH, com retorno ao banho ultrassônico por 15 minutos. Posteriormente, a base geleificante permaneceu a 60°C em agitação magnética por aproximadamente 3 horas e 30 minutos ou até tornar-se completamente geleificada.

Na preparação dos géis contendo o ácido barbático livre, o fármaco foi adicionado ao propilenoglicol, com posterior adição de Nipagin® e Nipazol®, prosseguindo com o procedimento descrito anteriormente. Para a preparação dos géis contendo o complexo de inclusão (BAR:HPγCD), este foi solubilizado em água e adicionado aos outros componentes durante o processo de geleificação. O pH das formulações foi determinado utilizando-se aparelho previamente calibrado.

A quantificação do BAR presente nas formulações semi-sólidas tipo gel foi realizada através de espectrofotometria UV a 275 nm. Uma alíquota (1g) da formulação tipo gel obtida foi adicionada a um balão volumétrico (10 ml) contendo metanol, permanecendo em banho ultrassônico até dissolução dos componentes da formulação. Uma curva padrão do ácido barbático (0,5 a 8 µg/mL) foi preparada em metanol com o objetivo de determinar as concentrações das amostras analisadas. Uma alíquota do gel base (placebo), também foi submetida ao mesmo procedimento, objetivando analisar a presença de interferentes na leitura das amostras em espectrofotometria UV.

#### *2.4 Estudo do processo de reparo tecidual em ratos Wistar*

Foram utilizados 27 ratos machos (*Ratus albinus Wistar*) pesando de 200 a 300g. Os animais foram procedentes do biotério do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco. Eles foram mantidos à temperatura ambiente (22°C ± 2°C), sob ciclo dia/noite natural (12h luz e 12h escuro), com livre acesso à água e alimento. Os experimentos com os animais foram conduzidos de acordo com

o protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, Processo nº 23076.022086/2009-23.

Os animais foram agrupados em três grupos experimentais, tendo sido marcados e separados aleatoriamente, de nove animais cada (n=27). Foram eles: A= animais que receberam o tratamento com o gel base (placebo); B= animais que receberam o tratamento com o gel contendo o BAR livre e C= animais que receberam o tratamento com o gel contendo o complexo de inclusão (BAR:HP $\gamma$ CD). Os grupos experimentais (n=9) foram subdivididos em três subgrupos, de três animais cada (A1, A2, A3; B1, B2, B3 e C1, C2, C3), de acordo com o período de tratamento (3, 7 e 14 dias). Os animais dos subgrupos (n=3) foram acondicionados em gaiolas plásticas apresentando dimensões de 60 x 50 x 22 cm.

Para o procedimento cirúrgico, os animais foram previamente anestesiados com uma associação de ketamina/xilazina por via intramuscular na dose de 15 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente. Cada animal foi pesado, e disposto em decúbito dorsal sobre a mesa operatória e submetidos à depilação por tração manual. Com auxílio de um punch metálico foi incisado o fragmento cutâneo de 7 mm<sup>3</sup> de diâmetro, no centro da área depilada, até a exposição da fáscia muscular dorsal (Prata et al., 2008). A hemostasia foi realizada com leve compressão de gaze sobre o leito cirúrgico, por cinco minutos. As aplicações dos géis foram realizadas imediatamente após a cirurgia, com cinco aplicações semanais, com um intervalo de dois dias, uma vez ao dia e no mesmo horário, durante os dias pré-determinados (Segundo et al., 2007).

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

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

Na análise morfométrica, levou-se em consideração os eventos de reação inflamatória, colagenização e reepitelização, contabilizando a presença de células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e testes com análise de variância (ANOVA). O teste T de Student foi empregado para comparar as significâncias estatísticas entre os grupos controle e experimentais  $p > 0.05$ .

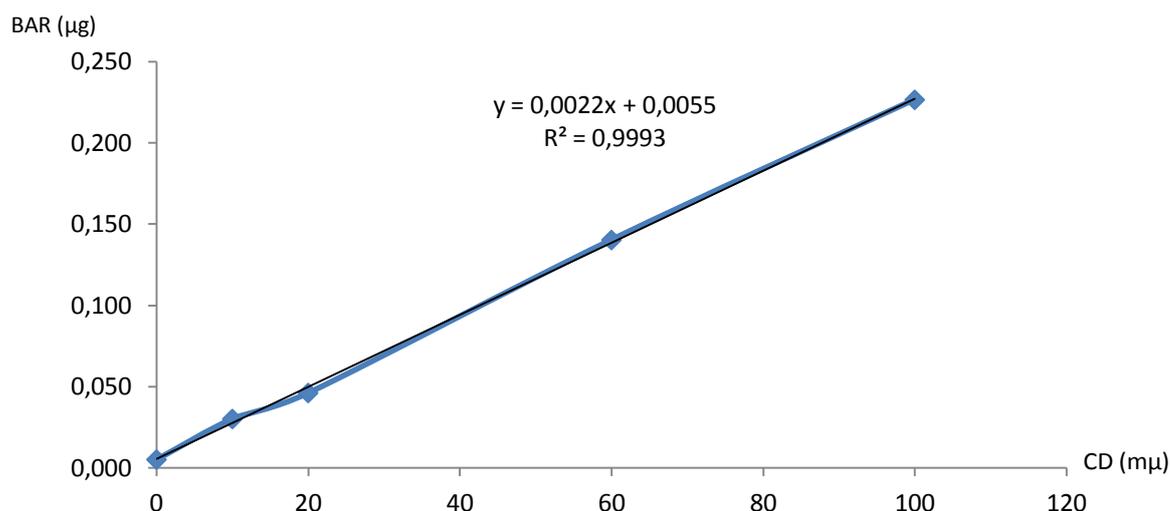
### 3. Resultados

#### 3.1 *Estudo da solubilidade de fases do ácido barbático (BAR) e hidroxipropil- $\gamma$ -ciclodextrina (HP $\gamma$ CD)*

De acordo com a literatura a análise do diagrama de solubilidade de fases tem sido o requisito preliminar para o desenvolvimento de complexos de inclusão com ciclodextrinas porque ele permite avaliar a afinidade entre o fármaco e as ciclodextrinas. Através do diagrama é possível determinar a razão molar que o fármaco pode se associar com as ciclodextrinas. O diagrama de solubilidade de fases resultou em uma curva do tipo  $A_L$  apresentando uma relação linear entre a concentração do ácido barbático e a concentração de HP $\gamma$ CD em solução aquosa a 25°C (Figura 2), apresentando a seguinte equação:

$$[\text{BAR}]_{\text{água}} = 0,0022[\text{BAR}] + 0,0055, r = 0,9993$$

O diagrama de solubilidade de fases apresentou relação linear entre as concentrações do BAR e HP $\gamma$ CD, onde a constante foi de  $419 \text{ M}^{-1}$ , sugerindo um coeficiente de complexação de 0,002 e uma razão molar de 1:453. Estes resultados indicam que o ácido barbático em presença de 100 mM de HP $\gamma$ CD aumenta aproximadamente 45 vezes sua solubilidade em água (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de solubilidade de fases do ácido barbático em função da concentração da HPγCD.

### 3.2 Obtenção do complexo de inclusão ácido barbático e hidropropil-γ-ciclodextrina (BAR:HPγCD)

Os complexos de inclusão BAR:HPγCD obtidos demonstraram um rendimento aproximado de  $98,03 \pm 0,08\%$ . O teor do ácido barbático nos complexos de inclusão (BAR:HPγCD) avaliado por espectrofotometria UV ( $\lambda=275$  nm).

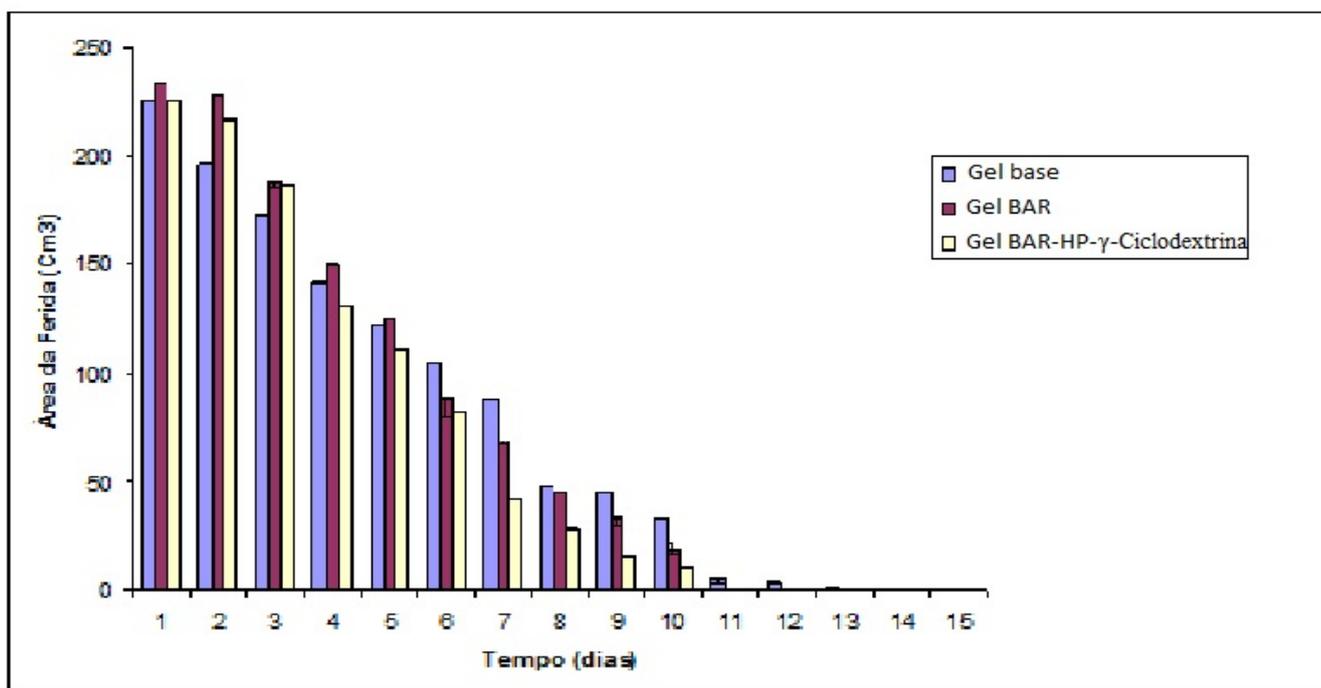
### 3.3 Estudo das formulações semi-sólidas tipo gel Natrosol

As formulações semi-sólidas placebo apresentaram pH de  $7,4 \pm 0,2$ , enquanto as formulações contendo ácido barbático e complexos de inclusão apresentaram um pH de  $7,0 \pm 0,5$  e  $7,2 \pm 0,8$ , respectivamente. O rendimento das formulações tipo gel Natrosol contendo o ácido barbático e complexo de inclusão BAR:HPγCD foi 95% e 98,87%, respectivamente. O controle do pH do gel é importante para evitar efeitos indesejáveis na pele, uma vez que, o pH da pele é um importante indicador funcional (Leonardi et al., 2002). As formulações semi-sólidas tipo gel de Natrosol contendo ácido barbático mantiveram aparente espalhabilidade durante as análises, o que é considerado como um quesito essencial das formas farmacêuticas de aplicação tópica (Martins et al., 2008).

### 3.4 Avaliação do processo de reparo tecidual em ratos Wistar

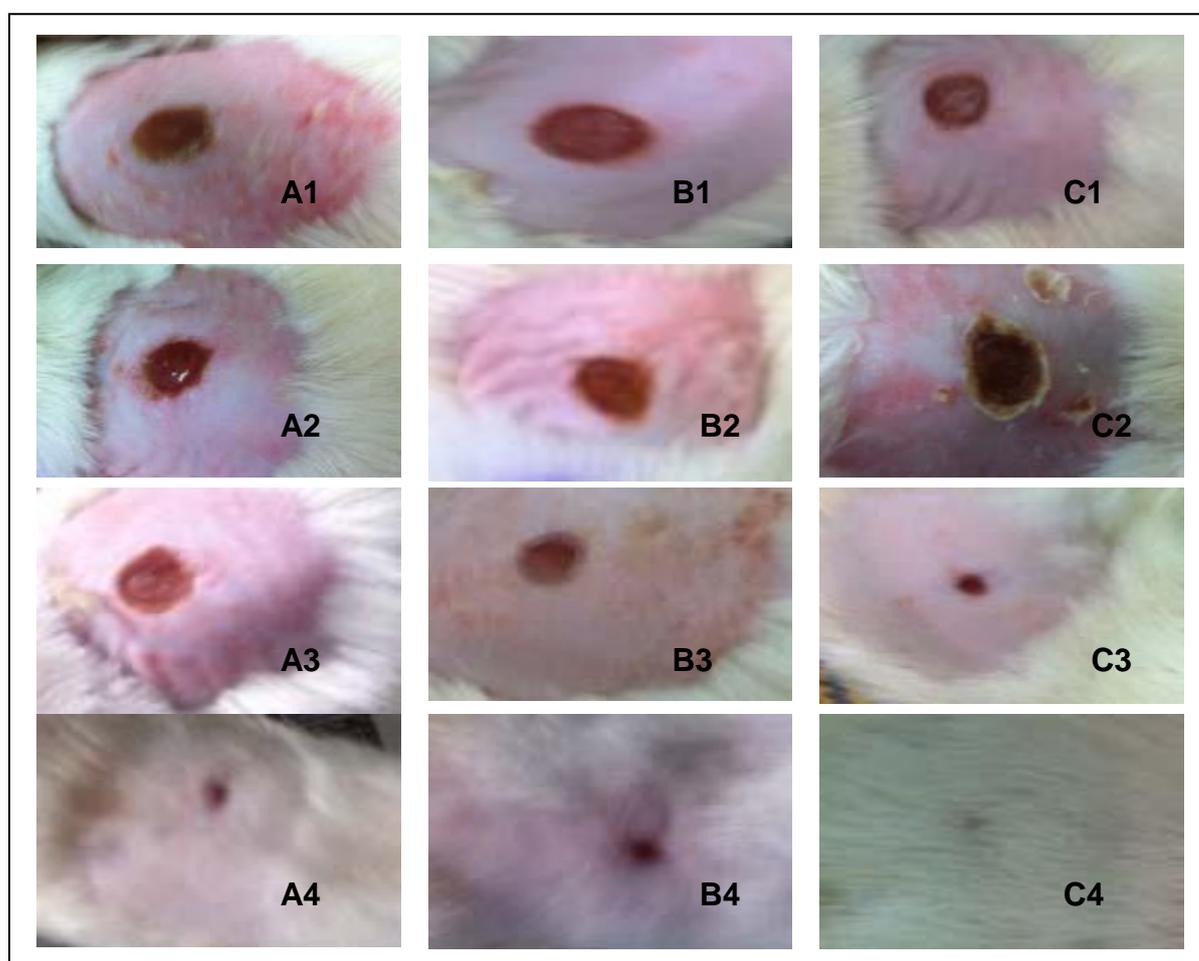
#### 3.4.1 Análise macroscópica

As análises clínicas diárias demonstraram adequada recuperação dos animais experimentais. Avaliando a evolução da área da ferida entre os grupos experimentais, observou-se que a área diminuiu gradativamente com o decorrer do tempo nos grupos estudados. O acompanhamento da ferida foi realizado até o 21º dia. O valor médio e o desvio padrão para cada grupo estão representados na figura 3. Entretanto, quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que as médias das áreas do grupo BAR:HP $\gamma$ CD a partir do 7º dia PO (pós-operatório) apresentaram-se reduzidas quando comparadas às obtidas nos outros grupos. Estes dados evidenciam que a formulação gel BAR:HP $\gamma$ CD apresentou uma relevante ação sobre o reparo tecidual dos animais tratados, acelerando, portanto, o processo de reparo tecidual, com relevante redução no dia 11º PO.



**Figura 3.** Áreas calculadas das feridas cirúrgicas nos grupos experimentais tratados: Gel base = gel natrosol base; Gel BAR = gel natrosol contendo ácido barbático e Gel BAR:HP $\gamma$ CD = gel natrosol contendo complexos de inclusão (BAR:HP $\gamma$ CD) (n=27).

Macroscopicamente, no acompanhamento da evolução das feridas produzidas nos animais experimentais, não foi visualizada a presença de exsudação até o 14° dia PO em todos os grupos experimentais. Igualmente em todos os grupos, foi observada a formação de crosta fibrino-leucocitária até o 14° dia PO. Todavia, o grupo de animais tratados com gel BAR:HP $\gamma$ CD desenvolveu crostas fibrino-leucocitárias em maior proporção a partir do 7° dia PO quando comparada aos demais grupos, evoluindo a partir do 14° dia PO para uma rápida reepitelização do local da lesão. Ao 21° dia PO, não foram evidenciados sinais de cicatrização, pois o tecido demonstrou completo reparo e intenso crescimento de pelos no local da lesão (Figura 4).



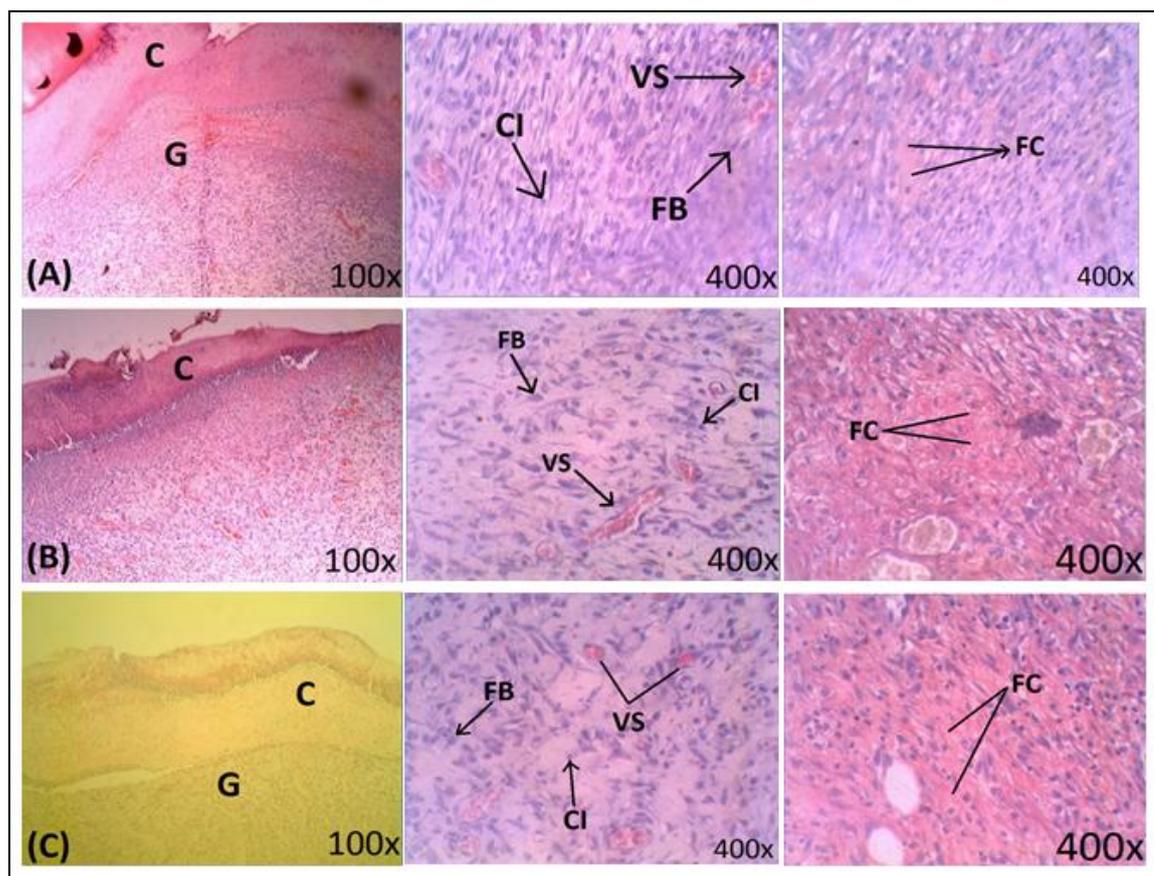
**Figura 4.** Microfotografia da ferida cirúrgica após o Período operatório (PO) em intervalos de tempos pré-determinados: (1) = 3 dias PO; (2) = 7 dias PO; (3) = 14 dias PO e (4) = 21 dias PO. Grupos experimentais: A= Gel base; B= Gel BAR e C= Gel BAR: HP- $\gamma$ -CD.

### 3.4.2 Análise histopatológica e morfométrica

A análise histopatológica foi realizada no intuito de se visualizar o processo de reparo tecidual, o qual apresenta diversas fases com características próprias. Nas avaliações microscópicas dos fragmentos de pele retiradas dos três grupos experimentais, foram evidenciadas diferenças qualitativas detectáveis entre as variáveis analisadas. Para a análise histológica, foram utilizados dois tipos de coloração: Hematoxilina-Eosina (H.E.) e Picrosírius (PS). A primeira para observação dos elementos celulares e esta última, para o estudo do colágeno. As análises microscópicas demonstraram a presença de crosta, tecido de granulação e proliferação fibroblástica, vasos esparsamente situados no campo óptico, infiltrado inflamatório e consequente reepitelização, em todos os grupos experimentais.

A capacidade de reparação tecidual é de grande importância para manutenção dos organismos vivos quando ocorrem lesões acidentais ou cirúrgicas (Sanchez Neto et al., 1993). Todos os animais experimentais estudados apresentaram essa capacidade.

No 7º dia PO, o grupo controle (gel base), demonstrou a presença de crosta, tecido de granulação e reduzida proliferação fibroblástica, poucos vasos esparsamente situados no campo óptico, infiltrado inflamatório. No grupo de animais tratados com gel BAR:HPyCD, observou-se uma acentuada crosta fibrino-leucocitária, marcante presença de tecido de granulação, intensa proliferação vascular, relevante presença de células inflamatórias e intensa proliferação de fibroblastos (figura 5), culminando com uma rápida reepitelização ao 14º dia PO (figura 6).

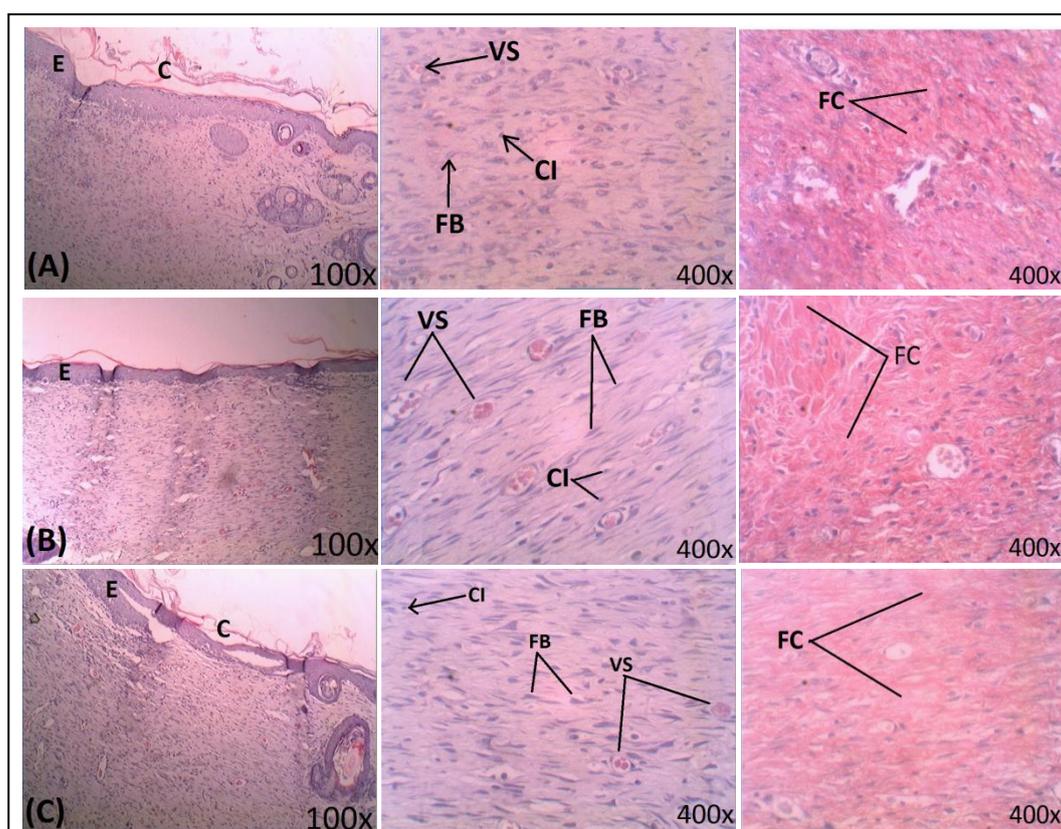


**Figura 5.** Fotomicrografia da ferida cirúrgica ao 7º dia PO: (A) gel base, (B) gel BAR e (C) gel BAR:HP $\gamma$ CD. Crosta fibrino-leucocitária (C), reepitelização (E), fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI) e vaso sanguíneo (VS): coloração H.E. Fibras colágenas (FC): coloração Picrosirius.

De acordo com a literatura, uma ferida não exudativa acompanhada de formação de crosta favorece o processo de cicatrização (Oliveira, 2008). Sabe-se, portanto, que o fibroblasto, célula fundamental no processo de reparação do tecido conjuntivo, é responsável pela síntese do material intercelular do tecido de granulação (Cotran et al., 2000). Somente na presença dos fibroblastos é que ocorre a diferenciação epidermal e a deposição da proteína laminina, colágeno tipo IV e VII, elementos essenciais no processo cicatricial (Garros et al., 2006). Segundo Ribeiro e colaboradores (2005), a formação de uma crosta é considerada como um sinal positivo no reparo, sendo comprovado histologicamente com maior formação de infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos e fibras colágenas.

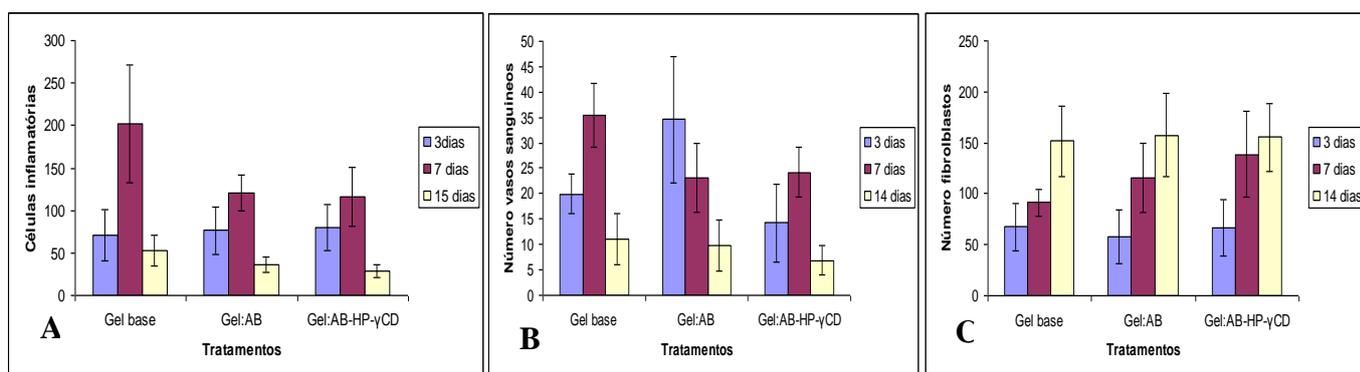
Estudos realizados comprovam que a vascularização também pode contribuir com a recuperação funcional do órgão, tornando-se recuperação do “espaço morto” localizado entre as duas bordas da ferida (Winter, 1962). Este fato foi evidenciado nos grupos tratados com gel BAR e gel BAR:HPyCD. Relatos da literatura afirmam que a reepitelização é favorecida quando o ambiente torna-se úmido, onde o movimento dos queratinócitos migrantes é determinado pelo conteúdo de água no leito da ferida. Feridas abertas e ressecadas reepitelizam mais lentamente do que as ocluídas. A crosta, portanto, favorece o meio ocluído e úmido contribuindo assim uma acentuada reepitelização (Winter, 1962).

A partir do 14º dia PO, como demonstra a figura 6, as células que se formam na borda se aderem ao tecido de granulação, evidenciando o epitélio. Nesta análise visual, foi observado que no grupo controle houve uma proliferação moderada de fibroblastos, entretanto, no grupo do complexo a proliferação de fibroblastos foi intensa.



**Figura 6.** Fotomicrografia da ferida cirúrgica ao 14º dia PO: (A) gel base, (B) gel BAR e (C) gel BAR:HPyCD. Crosta fibrino-leucocitária (C), reepitelização (E), fibroblasto (FB), célula inflamatória (CI) e vaso sanguíneo (VS): coloração H.E. Fibras colágenas (FC): coloração Picosírius.

Análises morfométricas foram realizadas a fim de comprovar a aparente aceleração do reparo tecidual visualizada nos animais tratados com gel BAR:HPyCD (Figura 7). Logo após o ferimento, o sangue preenche a área lesada, seguido da coagulação, desidratação e formação de crosta, protegendo a lesão. Com a liberação de mediadores químicos por parte do coágulo, desenvolve-se uma reação inflamatória aguda. A inflamação é um pré-requisito para a cicatrização (Nitz et al., 2006), com a formação de tecido de granulação dentro de 3 a 5 dias, segundo Cotran e colaboradores, 2000.



**Figura 7.** Análises histomorfométricas dos grupos de animais controle (gel base) e tratados com as formulações tipo gel contendo ácido barbático (gel BAR) e complexo de inclusão (gel BAR:HPyCD). Legenda: A= Células inflamatórias; B= Fibroblastos; C= Vasos sanguíneos. \* ( $p < 0,05\%$  ou 5%) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle.

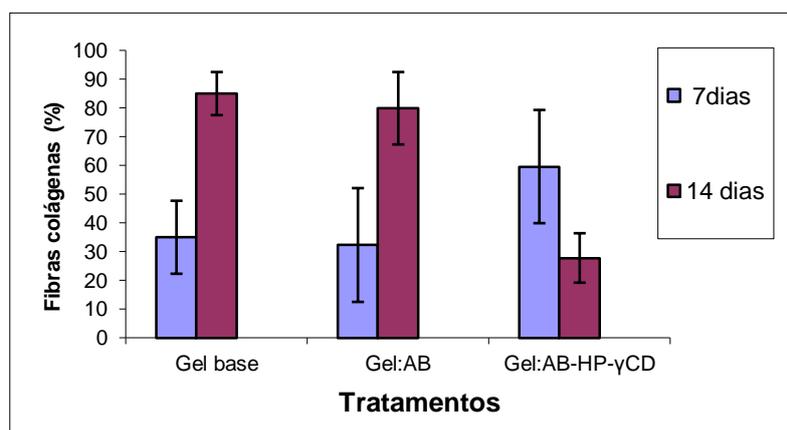
Ao 3º dia PO, foi visualizado perceptível aumento nas células inflamatórias ( $76,2 \pm 28,3$ ) e vascularização ( $34,6 \pm 12,4$ ) nos animais tratados com gel BAR, quando comparado ao grupo controle ( $70,9 \pm 29,7$  e  $19,9 \pm 3,9$ , respectivamente). No 14º dia PO notou-se uma redução das células polimorfonucleares ( $36,3 \pm 8,8$ ) e marcante aumento do tecido de granulação, com predomínio significativo de fibroblastos ( $157,1 \pm 40,8$ ), favorecendo, portanto, a cicatrização no grupo tratado com gel BAR ( $p=0,01$ ), culminando no reparo tecidual ao 14º dia PO. Por outro lado, nos animais tratados com a formulação gel BAR:HPyCD, observou-se relevante aumento na inflamação, avaliada pela relevante presença de células polimorfonucleares do 3º ao 7º dia PO;  $80,2 \pm 27,3$  e  $115,6 \pm 34,6$ , respectivamente (Figura 7A).

A quantidade de vasos sanguíneos foi significativamente maior, nos animais tratados com gel BAR em relação aos outros grupos, observado no 3º dia PO (Figura 7B). O aumento de vasos sanguíneos é favorável a uma maior oxigenação e aporte de nutrientes no local da lesão, influenciando um reparo tecidual mais rápido (Balbino et al., 2005). Arteriolas e vênulas surgem na área lesada por diferenciação de células mesenquimais em células musculares que envolvem os capilares, passando a constituir a parede desses novos vasos. Estas alterações fazem com que o tecido de granulação mude sua estrutura, constituindo um tecido conjuntivo típico (Montenegro & Franco, 1999).

Analisando-se a proliferação de fibroblastos, visualizou-se diferença significativa, com a percepção de um aumento nos animais tratados com gel BAR:HPyCD ( $189,6 \pm 65,2$ ) quando comparado aos animais tratados com gel BAR ( $115,7 \pm 34,3$ ) ( $p > 0,05$ ) no 7º dia PO (Figura 7C). O fibroblasto é a célula reguladora por apresentar a dupla função de síntese e reabsorção de colágeno. Segundo Biondo-Simões e colaboradores (1993), o 7º dia PO corresponde ao período de maior número de fibroblastos no tecido. Nos valores obtidos na proliferação fibroblástica, houve diferença estatística entre os grupos somente no 7º dia PO. A fibroplasia foi maior no grupo dos animais tratados com gel BAR:HPyCD quando comparado com os outros grupos. Os animais tratados com gel BAR apresentaram uma maior quantidade de fibroblastos quando comparados aos animais tratados com gel base. Achados semelhantes foram obtidos por Garros et al., 2006, onde o grupo tratado com extrato hidroalcoólico de *Passiflora edulis* apresentou maior quantidade de fibroblastos ao 7º dia PO. No 14º dia PO, foi observado que a proliferação fibroblástica decresceu, mas não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais, o que corrobora com os resultados citados na literatura (Garros et al., 2006).

Concernente às fibras colágenas, ao 7º dia PO, o processo de colagenização apresentou-se significativamente maior nos animais tratados com gel BAR:HPyCD ( $59,6\% \pm 19,7$ ) em relação aos animais tratados com gel base ( $35,0\% \pm 22,7$ ) e com gel BAR ( $32,3\% \pm 19,8$ ) (Figura 8). Todavia, ao 14º dia tornou-se significativamente mais discreta nos animais tratados com gel BAR:HPyCD ( $27,8\% \pm 18,6$ ) e mais intensa nos tratados com gel BAR ( $79,9 \pm 12,6$ ), e nos animais tratados com gel base ( $85,0\% \pm 7,5$ ). Isto demonstra que o tratamento com o gel BAR:HPyCD promoveu uma correta colagenização, favorecendo, portanto, a redução da formação de

quelóides durante o processo cicatricial, as quais são desordens fibroproliferativas decorrentes de uma cicatrização anormal por alteração na migração e na proliferação de células, inflamação, aumento na síntese de citocinas e proteínas da matriz extracelular e remodelamento da matriz sintetizada (Alves et al., 2002).



**Figura 8.** Análise histomorfométrica dos grupos de animais controle e tratados com as formulações tipo gel de Natrosol contendo BAR e complexo BAR:HPγCD: contagem de fibras colágenas ao 7º e 14º dia PO \* ( $p < 0,05\%$  ou  $5\%$ ) entre grupos, e quando comparado ao grupo controle (tratado com Gel base).

#### 4. Conclusões

O uso tópico do ácido barbático incorporado em gel associou-se a presença de crosta, aumento da proliferação fibroblástica e proliferação vascular, com evidente reepitelização e colagenização. Sugerindo, assim, efeito benéfico no processo cicatricial de feridas cutâneas abertas em ratos. É importante salientar que a complexação do ácido barbático a hidroxipropil-γ-ciclodextrina aumentou sua hidrosolubilidade e viabilizou sua eficácia terapêutica quando da incorporação em formulação semi-sólida tipo gel, favorecendo, portanto, o processo de cicatrização de feridas cutâneas experimentais.

## 5. Agradecimentos

Marllyn Marques agradece a Propesq e CNPq pelo auxílio financeiro, concedido como bolsa de Iniciação Científica.

## Referências

AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L., 1993. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Biology**, 7, 55-70.

ALVES JCRR, SILVA FILHO AF, PEREIRA NA. **Cicatrização patológica e seu tratamento**. In: Mélega JM, ed. Cirurgia plástica fundamentos e arte - princípios gerais. Rio de Janeiro:Medsi;2002. p.15-24.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005.

BIONDO-SIMÕES M.L.P.; LIMA E.J.B.; ROSÁRIO M.A.K.; MARQUES L.O.; Adurrc.; Cavazana W.C.; Colaço L.M. Açúcar e ácido acexamico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Acta cirúrgica brasileira**, v. 8 (2), p. 83-85, 1993.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Adv. Drug Del. Rev.**, v.59, p.645-666, 2007.

BURGOS et al. Preparação do composto de associação entre citrato de rório (II) e  $\beta$ -Ciclodextrina. **Quim. Nova**, Vol. 35, No. 4, 762-765, 2012.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. T.; **Patologia estrutural e funcional**. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000; 87-99.

DEVARAKONDA, B.; HILL, A.R.; LIEBENBERG, W.; BRITS, M.; VILLIERS, M.M. Comparasion of the aqueous solubilization of pratically insoluble niclosamide by polyamidoamine dendrimers and cyclodextrins. **Intern J Pharm**, 304: 193–209, 2005.

EDWARDS, H.G.M.; NEWTON, E.M.; WYNN-WILLIAMS, D.D. Molecular structural studies of lichen substances II: Atranorin, gyrophoric acid, fumarprotocetraric acid, rizocarpic acid, calycin pulvinic dilactone and usnic acid. **J Mol Struc**, 651-653, 2003.

GARROS. I.C. e col. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológica. **Acta Cirúrgica Brasileira** - Vol 21 (Suplemento 3) 2006 – 55.

HIGUCHI, T. & BROCHMANN -HANSEN, E. Pharmaceutical analysis. New York, **John Wiley & SONS**, 1968.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. Química dos liquens-Divulgação. **Química Nova**, São Paulo, v. 21:110-125, 1998.

HUNECK, S.; YOSHIMURA, I., 1996 **Identification of Lichen Substances**. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 251.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. 2002. Study of pH variation on the skin using cosmetic formulations with and without vitamins A, E or ceramide: by a non-invasive metho. **An bras Dermatol**, Rio de Janeiro, 77(5):563-569.

LIRA, M.C.B.; FERRAZ, M.S.; SILVA, D.G.V.C.; CORTES, M.E.; TEIXEIRA, K.I.; CAETANO, N.P.; SINISTERRA, R.D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Inclusion complex of usnic acid with  $\beta$ -cyclodextrin: characterization and nanoencapsulation into liposomes. **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, v.64, p.215-224, 2009.

LIRA, M. C.B.; CORTES, M. E.; TEIXEIRA, RUBEN, K. I.; SINISTERRA, D.; PONCHEL, G.; SANTOS-MAGALHÃES N. S. Inclusion complex of usnic acid/ $\beta$ ciclodextrin: Characterization and nanoencapsulation into lipossomes. **Intern J Pharm.**, 42:362-371, 2008.

MARTINS, M. C. B. et al.. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: Chemical Characterization and. **Antimicrobial Activity**. Vol.53, n. 1: pp. 115-122, January-February 2010.

MARTINS. M.R.; CORTEZ.L.E.R.; FELIPE.D.F. Desenvolvimento de formulações de uso tópico empregado o óleo essencial extraído do cravo-da-índia. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 259-263, set./dez. 2008.

MENEZES, A. A.; LEITE, A. B. X.; OTSUKA, A. Y.; JESUS, L. S.; CÁCERES, M. E. S. Novas ocorrências de líquens corticícolos crostosos e microfoliosos em vegetação de Caatinga no semi-árido de Alagoas. **Acta Botanica Brasilica** 25(4): 885-889. 2011.

MITROVIC, T. et al., 2011 Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activities of Five Lichen Species. **International Journal of Molecular Sciences**. 5428-5448.

MONTENEGRO MR, FRANCO M. **Patologia processos gerais**. 4th ed. São Paulo: Atheneu; 1999; 146-50.

NITZ, A. C. et al. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, 2006.

OLIVEIRA, R.C.S. **Desenvolvimento, formulação e avaliação de sistemas de liberação transdérmica incorporando sistemas ternários de complexação (Fármaco/ Ciclodextrina/ Polímero)** [Tese]. Portugal: Universidade do Porto; 2008.

PEREIRA, E.C.; SILVA, N.H.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; XAVIER-LAURO, L.; LEGAZ, M.E. & VICENTE, C. 1997. Antimicrobial activity and biologically-active compounds

from lichen *Cladonia crispatula*. **Boletim Ecotropical Ecosystemas Tropicais**, 31: 9-19.

PIOVANO, M.; GARBARINO, J. A.; GIANNINI, F. A.; CORRECHE, E. R.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; ZACCHINO, S.; ENRIZ, R., 2002. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**. v. 47. p. 235-240.

PRATA, M. et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.3, n.2, p.43-48, 2008.

RIBEIRO AQ, LEITE JPV, DANTAS-BARROS. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Rev Bras Farmacogn**. v,15.n, 65-70. 2005.

SANCHEZ NETO, R.; BARONE, B.; TEVÊS, D. C; SIMÕES, MJ; NOVO, NF; JULIANO, Y. 1993. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta cirúrgica Brasileira**.

SEGUNDO, A. S. et al., 2007. Influência do *Aloe vera* e própolis na contração de feridas em dorso de ratos. Vol 17-Nº1.

SULEYMAN, F. H.; ODABASOGLU, A. ASLAN, A. CAKIR, Y. KARAGOZ, F. GOCER, M. HALICI, AND Y. BAYIR, 2003. Anti-inflammatory and antiulcerogenic effects of the aqueous extract of *Lobaria pulmonaria* (L.) Hoffm. **Phytomedicine** 10: 552–557.

VIANNA, D. R.; SILVA, B. V.; HAMERSKI, L. Eletroporação e iontoforese para liberação de fármacos através da pele. *Rev. Virtual Quim.*, **2011**, 2 (4), 271-279. Data de publicação na Web: 16 de janeiro de 2011.

WINTER, G.D. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. **Nature**, v.193, p.293, 1962.

**ANEXO**

**NORMAS PARA A SUBMISSÃO PARA O JOURNAL DE  
ETHNOPHARMACOLOGY**

## GUIA DE AUTORES

The *Journal of Ethnopharmacology* é dedicado à troca de informações e entendimentos sobre o uso de plantas, fungos, animais, microorganismos e minerais e seus efeitos biológicos e farmacológicos com base nos princípios estabelecidos através de convenções internacionais das pessoas. Pessoas cedo, confrontados com a doença ea doença, descobriram uma riqueza de agentes terapêuticos úteis nos reinos vegetal e animal. O conhecimento empírico dessas substâncias medicinais e seu potencial tóxico foi transmitida pela tradição oral e, por vezes registrado em ervas e outros textos sobre a *matéria médica*. Muitos medicamentos valiosos de hoje (por exemplo, atropina, efedrina, tubocurarina, digoxina, reserpina), entrou em uso através do estudo de remédios indígenas. Farmácias continuam a usar drogas derivadas de plantas (por exemplo, a morfina, taxol, fisostigmina, quinidina, emetine) como protótipos em suas tentativas de desenvolver mais eficaz e menos tóxico medicinais.

**Por favor note que as figuras e tabelas devem ser incorporados no texto o mais próximo possível de onde eles são, inicialmente, citou.** Também é obrigatório para fazer upload de arquivos gráficos e tabela separada como estes irão ser necessária se o seu manuscrito for aceito para publicação.

### Classificação de seu papel

Por favor, note que, ao enviar o seu artigo, você terá que selecionar **pelo menos uma classificação** e , **pelo menos, três das palavras dadas**. Você pode visualizar a lista de classificações e palavras-chave ( [aqui](#) ) . Esta informação é necessária pelos Editores de processar mais rapidamente o seu artigo. Além disso, você pode enviar palavras-chave gratuitos, conforme descrito abaixo em "Palavras-chave".

### As "regras de 5"

Os Editores e Conselho Editorial têm desenvolvido as "Regras de 5" para a publicação no PEC. Nós produzimos cinco critérios claros de que cada autor precisa pensar antes de submeter um manuscrito e definir todo o processo de edição e revisão no trabalho. [Clique aqui](#).

Para mais detalhes sobre como escrever um papel de classe mundial, visite o nosso [Resources Autor Farmacologia](#) página.

**Os autores são incentivados a enviar material de vídeo ou seqüências de animação** para apoiar e melhorar a sua pesquisa científica. Para mais informações consulte o parágrafo sobre os dados de vídeo abaixo.

### Tipos de papel

The *Journal of Ethnopharmacology* aceitará as seguintes contribuições:

1. Artigos originais de pesquisa - cujo comprimento não é limitada e deve incluir título, resumo, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Referências. Como uma diretriz, um artigo completo normalmente não ocupa mais do que 10 páginas impressas da revista, incluindo tabelas e ilustrações.

2. Comunicações etnofarmacológicas (Communications anteriormente Short) - cuja duração média não é mais do que quatro páginas em impressão (aprox. 2000-2300 palavras, incluindo resumo e referências). É permitido um máximo de duas ilustrações (figuras ou tabelas). Ver ponto abaixo a descrição e formato.

3. Cartas à Redação.

4. Comentários - Autores que pretendem escrever artigos de revisão deve consultar e enviar um esboço para as avaliações Editor (ver contra-capa para informações de contato) antes de preparar os manuscritos. A organização e subdivisão de artigos de revisão podem ser organizadas a critério do autor. Os autores devem ter em mente que uma boa revisão define a tendência e direção de futuras pesquisas sobre o assunto que está sendo analisado. Tabelas, figuras e referências devem ser organizadas da mesma forma como artigos de pesquisa no periódico. . Comentários sobre temas que os problemas de ponta de endereço são particularmente bem-vindos esboços para possíveis comentários devem incluir:

- Um resumo detalhado usando a estrutura fornecida nas orientações
- Uma tabela com anotações de conteúdo
- Uma breve CV do autor

5. Resenhas de livros - Livros para análise devem ser enviados para o Comentários Editor.

6. Comentários - *convidou*, peer-reviewed, a discussão crítica sobre aspectos cruciais do campo, mas os desenvolvimentos mais importante metodológico e conceitual-teórico no campo e também deve fornecer um padrão, por exemplo, por métodos farmacológicos para ser usado em papéis no *Journal of Etnofarmacologia*. O diálogo científico é muito diferente nas ciências sociais / culturais e naturais, as discussões sobre os fundamentos comuns do campo estão em andamento e os trabalhos publicados devem contribuir para um debate transdisciplinar e multidisciplinar. O comprimento deve ser no máximo de 2-3 páginas impressas ou 2500 palavras. Entre em contato com o editor Comentários [j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk](mailto:j.ethnopharmacol@pharmacy.ac.uk) com um esboço.

7. Anúncios de conferências e notícias.



### Before You Begin

## Ética na publicação

Para obter informações sobre Ética em diretrizes editoriais e éticos para revista publicação ver <http://www.elsevier.com/publishingethics> e <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

## Política e ética

na carta, o autor também deve declarar que o estudo foi realizado de acordo com as regras internacionais, nacional e institucional, considerando experiências com animais, estudos clínicos e os direitos da biodiversidade. Veja abaixo para mais informações. A importância etnofarmacológica do estudo também deve ser explicada na carta de apresentação.

**Animais e estudos clínicos** - Investigações utilizando animais experimentais deve indicar na seção Métodos que a pesquisa foi conduzida de acordo com os princípios internacionalmente aceites para uso de animais de laboratório e cuidar como os encontrados em, por exemplo, as orientações da Comunidade Europeia (Directivas CEE de 1986; 86 / 609/EEC) ou as diretrizes dos Estados Unidos (NIH publicação # 85-23, revisado

em 1985). Investigações com seres humanos devem indicar na seção Métodos que a pesquisa seguiu as orientações da Declaração de Helsinki e Tóquio para os seres humanos, e foi aprovado pelo comitê de experimentação humana institucional ou equivalente, e que o consentimento informado foi obtido. Os editores vão rejeitar papéis se houver qualquer dúvida sobre a adequação do animal ou procedimentos humanos utilizados.

**Direitos da Biodiversidade** - Cada país tem seus próprios direitos sobre sua biodiversidade. Consequentemente, para estudar as plantas é preciso seguir as regras internacionais, nacional e institucional sobre os direitos da biodiversidade.

### **Conflito de interesse**

Todos os autores são obrigados a divulgar qualquer conflito real ou potencial de interesse, incluindo quaisquer relações financeiras, pessoais ou outros com outras pessoas ou organizações dentro de três anos do início do trabalho apresentado que poderiam influenciar inadequadamente ou ser percebida de influenciar, o seu trabalho . Veja também <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest> .

### **Declaração de submissão e verificação**

Apresentação de um artigo implica que o trabalho descrito não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de um resumo ou como parte de uma palestra publicada ou tese acadêmica ou como um pré-impressão eletrônica, consulte <http://www.elsevier.com/postingpolicy> ), que não está sendo considerado para publicação em outro, que a sua publicação é aprovado por todos os autores e tácita ou explicitamente por parte das autoridades responsáveis, onde o trabalho foi realizado e que, se aceito, não será publicado em outro lugar, na mesma forma, em Inglês ou em qualquer outra língua, inclusive eletronicamente, sem o consentimento por escrito do portador dos direitos autorais. Para verificar a originalidade, o seu artigo podem ser verificados pela originalidade detecção serviço CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect> .

### **Alterações autoria**

Esta política diz respeito à adição, exclusão ou rearranjo de nomes de autores na autoria de manuscritos aceitos: *Antes do manuscrito aceito é publicado em uma edição on-line* : Os pedidos para adicionar ou remover um autor, ou para reorganizar os nomes dos autores, deve ser enviados para o Editor Gerente do autor do manuscrito aceito e deve incluir: (a) a razão pela qual o nome deve ser adicionado ou removido, ou os nomes dos autores reorganizados e (b) a confirmação por escrito (e-mail, fax, carta ) de todos os autores que concordam com a adição, remoção ou rearranjo. No caso da adição ou remoção dos autores, este inclui a confirmação do autor sendo adicionadas ou removidas. Os pedidos que não são enviadas pelo autor correspondente será transmitido pelo Editor Gerente ao autor correspondente, que deve seguir o procedimento descrito acima. Note-se que: (1) Jornal Gerentes informará os Editores de Revistas de tais pedidos e (2) a publicação do manuscrito aceito em uma edição on-line está suspensa até que a autoria foi acordado. *Após o manuscrito aceito é publicado em uma edição on-line* : Qualquer pedidos para adicionar, excluir ou reorganizar os nomes dos autores em um artigo publicado em uma

edição on-line vai seguir as mesmas políticas como mencionado acima e resultar em uma corrigenda.

### **Copyright**

Após a aceitação de um artigo, os autores serão convidados a preencher um "Acordo de Publicação Jornal" (para mais informações sobre este e direitos autorais ver <http://www.elsevier.com/copyright> ). A aceitação do acordo irá garantir a mais ampla divulgação de informações. Um e-mail será enviado ao autor correspondente confirmando o recebimento do manuscrito, juntamente com um formulário de «Acordo Publishing Jornal" ou um link para a versão online deste acordo.

assinantes podem reproduzir tabelas de conteúdo ou preparar listas de artigos, incluindo resumos para circulação interna dentro de suas instituições. Permissão do editor é necessário para revenda ou distribuição no exterior da instituição e para todos os outros trabalhos derivados, incluindo compilações e traduções (por favor consultar <http://www.elsevier.com/permissions> ). Se excertos de outras obras com direitos autorais estão incluídos, o autor (s) deverá obter permissão escrita dos proprietários dos direitos autorais e de crédito da fonte (s) no artigo. Elsevier tem formulários pré-impressos para uso pelos autores, nestes casos: consulte <http://www.elsevier.com/permissions> .

### **Direitos autorais retidos**

Como um autor que você (ou seu empregador ou instituição) reter certos direitos, por detalhes que são mencionados: <http://www.elsevier.com/authorsrights> .

### **Papel da fonte de financiamento**

Você é solicitado a identificar quem forneceu apoio financeiro para a realização da pesquisa e / ou preparação do artigo e descrever brevemente o papel do patrocinador (s), se houver, no desenho do estudo, na coleção , análise e interpretação dos dados, na redação do relatório e na decisão de enviar o artigo para publicação. Se a fonte de financiamento (s) não tinha esse envolvimento, então isso deve ser declarado. Por favor, veja <http://www.elsevier.com/funding> .

### **Acordos e políticas Entidade**

Elsevier estabeleceu acordos e políticas desenvolvidas para permitir que os autores cujos artigos aparecem em revistas publicadas pela Elsevier, em conformidade com potencial manuscrito requisitos de arquivamento, conforme especificado em suas condições de conceder prêmios. Para saber mais sobre os acordos e as políticas existentes visite <http://www.elsevier.com/fundingbodies> .

### **Abra acessar**

Esta revista oferece uma escolha autores em publicar sua pesquisa:

### **Open Access**

- artigos estão disponíveis para os assinantes e ao público em geral com a reutilização

permitida livremente

- Uma taxa de publicação Open Access é pago por autores ou suas pesquisas financiador
- Inscrição** • Os artigos são disponibilizados aos assinantes, bem como os países em desenvolvimento e grupos de pacientes através do nosso acesso programas (<http://www.elsevier.com/access>) • No Aberto da taxa de publicação de acesso

Sua escolha publicação não terá nenhum efeito sobre o processo de revisão por pares ou a aceitação de sua inscrição.

Todos os artigos publicados Acesso Livre será imediatamente e permanentemente livre para que todos possam ler e baixar. Reutilização permitida é definida por sua escolha de uma das seguintes licenças de uso Creative Commons: **Creative Commons Atribuição (CC-BY)** : permite que outros distribuir e copiar o artigo, para criar extratos, resumos, e outras versões revistas, adaptações ou trabalhos derivados do ou a partir de um artigo (como uma tradução), para incluir em um trabalho coletivo (como uma antologia), em texto ou o meu dados do artigo, mesmo para fins comerciais, contanto que o autor de crédito (s), não representar o autor como endossando sua adaptação do artigo, e não modificar o artigo de tal forma a prejudicar a honra ou reputação do autor. **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC-BY-NC-SA)** : para não fins comerciais, permite que outros distribuir e copiar o artigo, para criar extratos, resumos e outras versões revistas, adaptações ou trabalhos derivados ou de um artigo (como uma tradução), para incluir em um trabalho coletivo (como uma antologia), para o texto e dados mina do artigo, desde que a creditar a (s) autor, não representam o autor como favorável a adaptação do artigo, não alteram o artigo de tal modo que danifique honra ou reputação do autor, e licença de suas novas adaptações ou criações sob termos idênticos (CC-BY-NC-SA). **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC-BY-NC-ND)** : para fins não comerciais, permite que outros distribuir e copiar o artigo e incluir em um trabalho coletivo (como uma antologia), desde que seja dado crédito ao autor (s) e desde que não altere ou modifique o artigo.

Para fornecer acesso aberto, a revista tem uma taxa de publicação, que precisa ser cumprida pelos autores ou seus financiadores de pesquisa para cada artigo publicado Open Access.

Sua escolha publicação não terá nenhum efeito sobre o processo de revisão por pares ou aceitação de artigos submetidos.

A taxa de publicação desta revista é **3.000 dólares** , excluindo impostos. Saiba mais sobre a política de preços da Elsevier: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing> .

### **Language (serviços de uso e edição)**

Por favor, escreva seu texto em Inglês bom (uso americano ou britânico é aceito, mas não uma mistura destes). Autores que sentem que seu manuscrito idioma Inglês pode exigir de edição para eliminar possíveis erros gramaticais ou de ortografia e conformar para corrigir Inglês científica pode querer usar o serviço de edição Idioma Inglês disponível a partir da

Elsevier WebShop <http://webshop.elsevier.com/languageediting/> ou visite nosso site de suporte ao cliente <http://support.elsevier.com> para mais informações.

## Apresentação

Apresentação à revista procede totalmente online e você será guiado passo a passo através da criação e upload de seus arquivos. O sistema converte automaticamente arquivos de origem em um único arquivo PDF do artigo, que é usado no processo de peer-review. Por favor, note que mesmo que os arquivos de origem do manuscrito são convertidos em arquivos PDF no envio para o processo de revisão, esses arquivos de origem são necessários para processamento adicional após a aceitação. Toda a correspondência, incluindo a notificação da decisão do Editor e pedidos de revisão, ocorre por e-mail eliminando a necessidade de uma trilha de papel.

## Informações adicionais

Autores que queiram submeter um manuscrito deve consultar e ler as questões com atenção recente da revista para o formato e estilo. Os autores devem incluir as seguintes informações na página de rosto de seu manuscrito submetido: endereço postal completo, fax, e-mail. Todos os trabalhos apresentados estão sujeitos à revisão por pares. Os requisitos mínimos para um manuscrito para se qualificar para revisão por pares são de que ele foi preparado seguindo estritamente o formato e estilo da revista, como mencionado, que é escrito em Inglês bom, e que é completo. Os manuscritos que não tenham cumprido estes requisitos serão devolvidos ao autor (s).

Além disso, recomenda-se seguir as normas de pesquisa descritos nos seguintes artigos:

Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, et al. *potencial anti-infeccioso de produtos naturais: como desenvolver uma forte in vitro 'prova de conceito'* J Ethnopharmacol 2006, 106: 290-302 [Clique aqui](#).

Matteucci, E., Giampietro, O. *Proposta aberto para a discussão: a definição de procedimentos de diagnóstico em pesquisa experimental diabetes concordou.* J Ethnopharmacol 2008.115: 163-172 [Clique aqui](#).

T.SA. Froede e YS Medeiros *modelos animais para testar drogas com atividade antidiabética potencial.* J Ethnopharmacol de 2008, 115: 173-183 [Clique aqui](#).



## Preparation

### Uso de software de processamento de texto

É importante que o arquivo seja salvo no formato nativo do processador de texto utilizado. O texto deve ser em formato de coluna única. Mantenha o layout do texto o mais simples possível. A maioria dos códigos de formatação será removido e substituído no processamento do artigo. Em particular, não use as opções do processador de texto para justificar o texto ou para hifenizar as palavras. No entanto, não usar negrito, itálico, subscritos, sobrescritos, etc Ao preparar tabelas, se você estiver usando uma grade de

tabela, use apenas uma grade para cada tabela individual e não uma grade para cada linha. Se nenhuma rede for utilizado, guias, e não os espaços, para alinhar colunas. O texto eletrônico deve ser preparado de uma forma muito semelhante ao de manuscritos convencionais (ver também o Guia para a publicação com Elsevier:<http://www.elsevier.com/guidepublication> ). Note-se que os arquivos de origem de figuras, tabelas e gráficos de texto será necessária ou não você inserir seus dados no texto. Veja também a seção sobre arte eletrônica.

Para evitar erros desnecessários que são fortemente aconselhados a usar o "corretor ortográfico" e funções "-check gramática" de seu processador de texto.

## **Estrutura artigo**

### ***Bairro - seções numeradas***

Divida o seu artigo em seções bem definidas e numeradas. Subseções devem ser numeradas 1.1 (então 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc (o resumo não está incluído na seção numeração). Utilize esta numeração também para internos de referência cruzada: não se refere apenas ao "texto". Qualquer subseção pode ser dado um título breve. Cada título deve aparecer na sua própria linha separada.

### ***Introdução***

Declare os objetivos do trabalho e fornecer uma base adequada, evitando-se um levantamento bibliográfico detalhado ou um resumo dos resultados.

### ***Material e métodos***

fornecem detalhes suficientes para permitir que o trabalho a ser reproduzida. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas modificações relevantes devem ser descritas.

### ***Teoria / cálculo***

A seção Theory deve se estender, não repetir, o fundo para o artigo já tratado na Introdução e estabelecer as bases para a continuação dos trabalhos. Em contraste, uma seção de Cálculo representa um desenvolvimento prático a partir de uma base teórica.

### ***Resultados***

Os resultados devem ser clara e concisa.

### ***Discussão***

Este deve explorar a significância dos resultados do trabalho, não repeti-los. Um combinado de Resultados e seção de discussão muitas vezes é apropriado. Evite citações extensas e discussão de literatura.

### ***Conclusões***

As principais conclusões do estudo podem ser apresentados em uma seção Conclusões curto, que pode ficar sozinho ou formar uma subseção de uma seção de discussão ou Resultados e Discussão.

### ***Glossário***

favor de abastecimento, como uma lista separada, as definições de termos específicos do campo usado em seu artigo.

### **Apêndices**

Se houver mais do que um apêndice, eles devem ser identificadas como A, B, etc. Fórmulas e equações em apêndices deve ser dada numeração separada: Eq.. (A.1), eq. (A.2), etc, num apêndice posterior, a Eq.. (B.1) e assim por diante. Da mesma forma para tabelas e figuras: Tabela A.1; Fig. A.1, etc

### **Informações da página de título essencial**

- **Título.** conciso e informativo. Títulos são frequentemente utilizados em sistemas de recuperação de informação. Evite abreviações e fórmulas, sempre que possível.
- **nomes e afiliações autor.** Onde o nome da família pode ser ambíguo (por exemplo, um nome duplo), indique isso claramente. Apresentar os endereços de filiação dos autores (onde o trabalho real foi feito) abaixo os nomes. Indique todas as afiliações com uma letra minúscula sobrescrito, imediatamente após o nome do autor e em frente ao endereço apropriado. Fornecer o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se possível, o endereço de cada autor e-mail.
- **Autor para correspondência.** indicam claramente quem vai lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. **Certifique-se de que os números de telefone (com o país eo código de área) são fornecidos, além do endereço de e-mail eo endereço postal completo. Os detalhes de contacto deve ser mantido até à data pelo autor correspondente.**
- **endereço Present / permanente.** Se um autor mudou desde o trabalho descrito no artigo foi feito, ou estava visitando na época, um "endereço Present '(ou' Permanent endereço ' ) pode ser indicada como uma nota de rodapé para que o nome do autor. O endereço no qual o autor realmente fez o trabalho deve ser mantido como, endereço afiliação principal. Números arábicos sobrescritos são utilizados para tais notas de rodapé.

### **Resumo**

Um resumo conciso e factual é necessária. O resumo deve indicar sucintamente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e as principais conclusões. Um resumo é muitas vezes apresentada separadamente do artigo, então deve ser capaz de ficar sozinho. Por esta razão, as referências devem ser evitados, mas se necessário, em seguida, citar o autor (es) e ano (s). Além disso, abreviaturas não-padrão ou incomum deve ser evitada, mas se essencial que deve ser definida na sua primeira menção no abstrato em si.

O autor deve dividir o resumo com a **títulos de relevância etnofarmacológica , Materiais e Métodos , Resultadose Conclusões .**

Clique [aqui](#) para ver um exemplo.

### **Gráfica abstrato**

A abstrato gráfica é obrigatória para a revista. Ele deve resumir o conteúdo do artigo em uma forma pictórica concisa projetado para capturar a atenção de um grande número de leitores online. Autores deve fornecer imagens que representam claramente o trabalho descrito no artigo. Resumos gráficos devem ser apresentados como um arquivo separado no sistema de submissão online. Tamanho da imagem: por favor fornecer uma imagem com

um mínimo de 531 × 1328 pixels (h × w) ou proporcionalmente mais. A imagem deve ser lida em um tamanho de 5 × 13 cm, utilizando uma resolução de tela normal de 96 dpi. Tipos de arquivos preferidos: TIFF, EPS, PDF ou arquivos do MS

Office. Veja <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> para exemplos.

autores podem fazer uso de Ilustração da Elsevier e serviço Enhancement para garantir a melhor apresentação de suas imagens também de acordo com todos os requisitos técnicos: [Serviços Ilustração](#) .

### **Palavras-chave**

Depois de ter selecionado a classificação no sistema de submissão, os autores devem, no mesmo passo selecionar cinco palavras-chave. Essas palavras-chave irá ajudar os editores a categorizar o seu artigo com precisão e processá-la mais rapidamente. A lista das classificações e conjunto de palavras-chave pode ser encontrada [aqui](#) .

Além disso, você pode fornecer um máximo de 6 palavras-chave específicas, usando a ortografia americana e evitar gerais e plural termos e vários conceitos (evitar, por exemplo, "e", "de"). Ser poupado com abreviaturas: apenas abreviaturas firmemente estabelecidos no campo pode ser elegível. Essas palavras-chave será utilizada para fins de indexação.

### **Agradecimentos**

Agrupar reconhecimentos em uma seção separada no final do artigo, antes das referências bibliográficas e não, portanto, incluí-los na página de título, como uma nota de rodapé para o título ou não. Listar aqui os indivíduos que prestaram ajuda durante a pesquisa (por exemplo, oferecendo ajuda a linguagem, a escrita assistência ou prova de ler o artigo, etc.)

### **Banco de dados que liga**

Elsevier encoraja os autores a ligar artigos com bancos de dados externos, dando a seus leitores um-clique acesso a bases de dados relevantes que ajudam a construir uma melhor compreensão da pesquisa descrita. Por favor, consulte os identificadores de banco de dados relevantes usando o seguinte formato em seu artigo: Base de dados: xxxx (por exemplo, TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). Veja <http://www.elsevier.com/databaselinking> para mais informações e uma lista completa de bancos de dados suportados.

### **Math fórmulas**

Presente fórmulas simples na linha de texto normal, onde possível, e usar a solidificação (/) em vez de uma linha horizontal para pequenas termos fracionada, por exemplo, X / Y. Em princípio, as variáveis devem ser apresentados em itálico. Poderes do e muitas vezes são mais convenientemente denotado por exp. Número consecutivamente as equações que têm de ser apresentado separadamente a partir do texto (se referido explicitamente no texto).

### **Notas de rodapé**

As notas de rodapé devem ser usados com moderação. Numerá-las consecutivamente ao longo do artigo, usando números arábicos sobrescritos. Muitos wordprocessors construir notas de rodapé no texto, e esta característica pode ser usada. Se não for este o caso,

indicar a posição das notas de rodapé no texto e apresentar as próprias notas separadamente no final do artigo. Não incluir notas de rodapé na lista de referência. *notas de rodapé da tabela* Indique cada nota de rodapé em uma tabela com uma letra minúscula sobrescrita.

## Obra

### **Arte eletrônica**

#### *pontos Gerais*

- Certifique-se de usar letras uniforme e dimensionamento de sua arte original.
- Incorporar as fontes usadas, se o aplicativo oferece essa opção.
- Objetivo de usar as seguintes fontes em suas ilustrações: Arial, Courier, Times New Roman, Símbolo , ou usar fontes que parecem semelhantes.
- Número das ilustrações de acordo com a sua seqüência no texto.
- Use uma convenção de nomenclatura lógica para seus arquivos de arte.
- Fornecer legendas para as ilustrações separadamente.
- Tamanho das ilustrações perto as dimensões desejadas do impresso versão.
- Apresentar cada ilustração como um arquivo separado.

Um guia detalhado sobre arte eletrônica está disponível em nosso

website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> **Você está convidada a visitar este**

**site, alguns trechos da informações detalhadas são dadas aqui.** *Formatos* Se a sua arte eletrônica é criado em um aplicativo do Microsoft Office (Word, PowerPoint, Excel), por favor oferta "como está" no formato de documento nativo. Independentemente do aplicativo usado diferente Microsoft Office, quando o seu trabalho artístico eletrônico é finalizado , por favor, 'Salvar como' ou converter as imagens para um dos seguintes formatos (observe os requisitos de resolução para desenhos de linhas, meios-tons e de linha / meio-tom combinações dadas abaixo): EPS (ou PDF): desenhos vetoriais, incorporar todas as fontes utilizadas. TIFF (ou JPEG): cores ou tons de cinza fotografias (meios-tons), manter um mínimo de 300 dpi. TIFF (ou JPEG): bitmap desenhos de linha (preto puro e pixels brancos), para manter um mínimo de 1.000 dpi. TIFF (ou JPEG): Combinações de linha / meio-tom (cor ou escala de cinza) de bitmap, manter um mínimo de 500 dpi. **favor não:** • Fornecer arquivos que são otimizados para uso em tela (por exemplo, GIF, BMP, PICT, WPG), estes geralmente têm um baixo número de pixels e conjunto limitado de cores; • Fornecer arquivos que são muito baixos em resolução; • Apresentar os gráficos que são desproporcionalmente grande para o conteúdo.

Por favor note que as figuras e tabelas devem ser incorporados no texto o mais próximo possível de onde eles são, inicialmente, citou. Também é obrigatório para fazer upload de arquivos gráficos e tabela separada como estes irão ser necessária se o seu manuscrito for aceito para publicação.

### **Artwork cor**

Por favor, certifique-se de que os arquivos são obras de arte em um formato aceitável (TIFF (ou JPEG), EPS (ou PDF), ou arquivos do MS Office) e com a resolução correta. Se, juntamente com o seu artigo aceito, você enviar figuras em cores utilizáveis Elsevier, em seguida, irá garantir, sem nenhum custo adicional, que esses números aparecem a cores na Web (por exemplo, ScienceDirect e outros sites) independentemente de ter ou não essas ilustrações são reproduzidas em cores na versão impressa. **Para reprodução de cor na impressão, você receberá informações sobre os custos de Elsevier, após a recepção do seu artigo aceito.** Indique sua preferência por cor: na impressão ou somente na web. Para mais informações sobre a elaboração de obras de arte eletrônica, consulte <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> .

Atenção: Devido a complicações técnicas que podem surgir através da conversão de figuras coloridas de "escala de cinza" (para a versão impressa deve você não optar pela cor na impressão) envie além versões preto e branco utilizáveis de todas as ilustrações a cores.

### **As legendas das figuras**

Assegurar que cada ilustração tem uma legenda. Fornecer legendas em separado, não ligado à figura. Uma legenda deve compreender um breve do título ( **não** na própria figura), bem como uma descrição da ilustração. Manter texto nas próprias figuras para um mínimo, mas explicar todos os símbolos e as abreviaturas utilizadas.

### **Tabelas**

tabelas de números consecutivos, de acordo com o seu aparecimento no texto. Coloque notas de rodapé nas tabelas abaixo do corpo da tabela e indicá-los com letras minúsculas sobrescritas. Evite regras verticais. Ser poupar na utilização de tabelas e assegurar que os dados apresentados nas tabelas não duplicar os resultados descritos noutra local no artigo.

### **Referências**

#### **Citação no texto**

Certifique-se que todas as referências citadas no texto também está presente na lista de referências (e vice-versa). Todas as referências citadas no resumo deve ser dada na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendadas na lista de referência, mas pode ser mencionada no texto. Se essas referências estão incluídas na lista de referências devem seguir o estilo da revista de referência padrão e deve incluir a substituição da data de publicação, com "resultados não publicados". " *Comunicação pessoal* " não será aceito como uma referência. Citação de uma referência como "in press" implica que o artigo foi aceito para publicação.

### **Software de gerenciamento de referências**

Esta revista tem modelos padrão disponíveis na chave de referência de gerenciamento de pacotes EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) e Gerente de referência (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Usando plug-ins para os pacotes de processamento de texto, os autores só precisa selecionar o modelo revista apropriada quando se preparava seu artigo ea lista de referências e citações a estes será formatado de acordo com o estilo da revista, que é descrito abaixo.

### **Estilo de referência**

*Texto:* Todas as citações no texto devem se referir a:

1. *autor único:* o nome do autor (sem iniciais, a menos que haja ambigüidade) e ano de publicação;
  2. *Dois autores:* os nomes dos dois autores eo ano de publicação ,
  3. *Três ou mais autores:* o nome do primeiro autor seguido de "et al." eo ano de publicação.
- Citações podem ser feitas diretamente (ou entre parênteses). Grupos de referências deve ser o primeiro da lista em ordem alfabética, em seguida, em ordem cronológica.

Exemplos: "como demonstrado (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan e Jones, 1995), Kramer et al (2000) têm mostrado recentemente .....". *List:* As referências devem ser organizadas em ordem alfabética primeiro e depois mais ordenadas cronologicamente, se necessário. Mais de uma referência do mesmo autor (es) no mesmo ano devem ser identificados pelas letras "a", "b", "c", etc, colocado após o ano de publicação. Utilize nomes de periódicos completos. *Exemplos:* referência a uma publicação da revista: Van der Geer, J., Hanraads, JAJ, Lupton, RA, 2000. A arte de escrever um artigo científico. *Jornal de Comunicação Científica*. 163, 51-59. referência a um livro: Strunk Jr., W., Branco, EB, 1979. *The Elements of Style*, terceira ed. Macmillan, New York. Referência a um capítulo em um livro editado: Mettam, GR, Adams, LB, 1999. Como preparar uma versão eletrônica do seu artigo, in: Jones, BS, Smith, RZ (Eds.), *Introdução à era eletrônica*. E-Publishing Inc., New York, pp 281-304.

### **Vídeo dados**

Elsevier aceita material de vídeo e seqüências de animação para apoiar e melhorar a sua pesquisa científica. Autores que têm arquivos de vídeo ou animação que desejam apresentar, juntamente com seu artigo são fortemente encorajados a incluir links para estes dentro do corpo do artigo. Isto pode ser feito da mesma maneira como uma figura ou tabela, referindo-se o conteúdo de vídeo ou animação e registrando no corpo do texto, onde ele deve ser colocado. Todos os arquivos enviados devem ser devidamente rotulados de forma que eles se relacionam diretamente com o conteúdo do arquivo de vídeo. A fim de garantir que o seu material de vídeo ou animação é directamente utilizável, por favor fornecer os

arquivos em um de nossos formatos de arquivo recomendadas com um tamanho máximo preferido de 50 MB. Vídeo e animação arquivos fornecidos será publicado online na versão eletrônica do seu artigo na Elsevier produtos da Web, incluindo ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com> . Por favor, forneça "stills" com seus arquivos: você pode escolher qualquer frame do vídeo ou animação ou fazer uma imagem separada. Estes serão utilizados em vez de ícones padrão e personalizar o link para seus dados de vídeo. Para obter instruções mais detalhadas, visite nossas páginas de instruções em vídeo em <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> . Nota: desde vídeo e animação não pode ser incorporado na versão impressa da revista, forneça texto, tanto para a electrónica ea versão impressa para as partes do artigo que se referem a este conteúdo.

### Complementar dados

Elsevier aceita material suplementar eletrônico para apoiar e melhorar a sua pesquisa científica. Arquivos suplementares oferecer o autor possibilidades adicionais para publicar aplicativos de apoio, imagens de alta resolução, conjuntos de dados de fundo, clipes de som e muito mais. Arquivos complementares fornecidos serão publicados on-line junto com a versão eletrônica do seu artigo na Elsevier produtos da Web, incluindo ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com> . A fim de garantir que o seu material enviado é directamente utilizável, por favor fornecer os dados em um de nossos formatos de arquivo recomendadas. Os autores devem enviar o material em formato electrónico, juntamente com o artigo, e fornecer uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo. Para obter instruções mais detalhadas, visite nossas páginas de instruções arte em <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> .

### Lista de checagem

A lista a seguir será útil durante a verificação final de um artigo antes de enviá-lo para a revista para a revisão. Por favor, consulte este Guia de Autores para mais detalhes de qualquer item. **Certifique-se que os seguintes itens estão presentes:** Um autor foi designado como o autor correspondente com detalhes de contato: • Endereço de E-mail • endereço postal completo • Os números de telefone todos os arquivos necessários têm foi carregado, e conter: • Palavras-chave • Todos legendas de figuras • Todas as tabelas (incluindo título, descrição, notas de rodapé) Outras considerações • Manuscrito foi 'spell-check "e" gramática verificado' • As referências estão no formato correto para esta revista • Todas as referências citadas na lista de referências devem ser citadas no texto, e vice-versa • A permissão foi obtida pelo uso de material com direitos autorais de outras fontes (incluindo o Web) • Figuras coloridas são claramente marcados como sendo destinados à reprodução de cor na Web (gratuito) e em versão impressa, ou para ser reproduzidos em cores na Web (gratuito) e em preto-e-branco na impressão • Se só cor na Web é necessária, versões em preto-e-branco da números também são fornecidos para fins de impressão Para mais informações, visite nosso site de suporte ao cliente em <http://support.elsevier.com> .



## After Acceptance

### O uso do Digital Object Identifier

O Digital Object Identifier (DOI) pode ser usado para referenciar e link para documentos eletrônicos. O DOI é composto por uma seqüência de caracteres alfa-numérico único que é atribuído a um documento do editor sobre a publicação eletrônica inicial. O DOI atribuído nunca muda. Portanto, é um meio ideal para citando um documento, em particular «artigos na imprensa», porque ainda não recebeu a sua informação bibliográfica completa. Exemplo de um dado corretamente DOI (no formato de URL, aqui um artigo na revista *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059> Quando você usa uma DOI para criar links para documentos na web, os DOI está garantido para nunca mudar.

### Provas de

um conjunto de provas de página (como arquivos PDF) será enviada por e-mail ao autor (se não tiver um endereço de e-mail, em seguida, provas em papel serão enviados por correio) ou, um link será fornecido em o e-mail para que os autores possam baixar os próprios arquivos. Elsevier oferece agora autores com provas em PDF que pode ser anotado, para isso você vai precisar baixar o Adobe Reader versão 7 (ou superior) disponível gratuitamente a partir <http://get.adobe.com/reader> . Instruções sobre como fazer anotações em arquivos PDF vai acompanhar as provas (também dado online). Os requisitos exatos do sistema são dadas no site da Adobe:<http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html> .

Se você não quiser usar a função de anotações de PDF, você pode listar as correções (incluindo respostas ao formulário de consulta) e devolvê-los à Elsevier em um e-mail. Por favor, liste suas correções, citando o número da linha. Se, por qualquer motivo, não for possível, em seguida, marcar as correções e quaisquer outros comentários (incluindo respostas ao formulário de consulta) sobre a impressão da prova e retorno por fax ou escanear as páginas e e-mail ou por correio . Utilize esta prova apenas para verificar a composição, edição, integralidade e exactidão do texto, tabelas e figuras. Alterações significativas no artigo, aceito para publicação só será considerada nesta fase com a permissão do Editor. Faremos todo o possível para obter o seu artigo publicado com rapidez e precisão - por favor, deixe-nos ter todas as suas correções no prazo de 48 horas. É importante assegurar que todas as correções são enviados de volta para nós em uma

comunicação: por favor, verifique com cuidado antes de responder, como a inclusão de eventuais correções não podem ser garantidos. Revisão é de sua responsabilidade exclusiva. Note-se que Elsevier pode prosseguir com a publicação de seu artigo, se nenhuma resposta for recebida.

### **Separatas**

o autor correspondente, sem nenhum custo, será fornecido com um arquivo PDF do artigo via e-mail (arquivo PDF é uma versão com marca d'água do artigo publicado e inclui uma folha de rosto com a imagem da capa do jornal e um aviso descrevendo o termos e condições de uso). Por uma taxa extra, separatas em papel podem ser encomendados através do formulário de pedido de separata, que é enviado assim que o artigo for aceito para publicação. Ambos correspondente e co-autores podem pedir separatas a qualquer momento através da Elsevier WebShop

( <http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints> ). Autores requerem cópias impressas de vários artigos poderá usar da Elsevier WebShop "Criar seu próprio livro" serviço para reunir vários artigos dentro de uma única cobertura ( <http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints/myarticlesservices/booklets> ).



### **Author Inquiries**

Para mais informações relativas à apresentação de artigos (incluindo a apresentação eletrônica), por favor visite o site deste jornal. Para obter instruções detalhadas sobre a preparação de obras de arte eletrônica, visite <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> . Detalhes do contato para perguntas que surgem após a aceitação de um artigo, especialmente as relacionadas com as provas, serão fornecidos pelo editor. Você pode acompanhar os artigos aceitos em <http://www.elsevier.com/trackarticle> . Você também pode verificar o nosso