



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



BÁRBARA LONGHINI GONZALEZ

**ANÁLISE DO PERFIL FITOQUÍMICO DA CASCA CAULINAR DE
Stryphnodendron adstringens (Mart.) Coville E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE CICATRIZANTE EM CÉLULAS L-929**

Maringá

2024

BÁRBARA LONGHINI GONZALEZ

Análise do perfil fitoquímico da casca caulinar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e avaliação da atividade cicatrizante em células L-929

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

Maringá

2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

G643a

Gonzalez, Bárbara Longhini

Análise do perfil fitoquímico da casca caulinar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e avaliação da atividade cicatrizante em células L-929 / Bárbara Longhini Gonzalez. -- Maringá, PR, 2024.
108 f. : il. color., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2024.

1. Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) - Atividade cicatrizante. 2. Cultura de células. 3. Fibroblastos. 4. Cicatrização de feridas. 5. Taninos. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 23.ed. 615.321

Síntique Raquel Eleutério - CRB 9/1641

BÁRBARA LONGHINI GONZALEZ

**Análise do perfil fitoquímico da casca caulinar de *Stryphnodendron adstringens*
(Mart.) Coville e avaliação da atividade cicatrizante em células L-929**

336ª Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 13 de março de 2024

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Naiara Cássia Gancedo
Universidade Estadual de Maringá

gov.br

Documento assinado digitalmente
PAULO WENDER PORTAL GOMES
Data: 13/03/2024 16:51:10-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Dr. Paulo Wender Portal Gomes
University of California San Diego

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

Partes deste trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

Apresentação oral

Gonzalez, B. L.; Lima, C. B.; De Paula, M. N.; Mello, J. C. P. Cell viability assay of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville extract and fractions on L929 cells. 3rd International Conference on Natural Products and Human Health, 2023, Catanduva, SP.

Apresentação na forma de pôster

Gonzalez, B. L.; Luvizotto, R. I.; Mello, J. C. P. Evaluation of heel pressure ulcer wound healing using *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão) gel: A case report. Simpósio integrado de Inovação em Farmácia, Fisiopatologia e Diagnóstico Laboratorial, 2023. Maringá, PR.

Parte deste trabalho foi publicada nos anais do 3rd International Conference on Natural Products and Human Health em forma de resumo simples:

Gonzalez, B. L.; Lima, C. B.; De Paula, M. N.; Mello, J. C. P. Cell viability assay of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville extract and fractions on L929 cells. In: 3rd International Conference on Natural Products and Human Health, 2023, Catanduva, SP. Proceedings of the 3rd International Conference on Natural Products and Human Health. Campinas: Galoá, 2023. v. 1. p. 166380. Available in: <https://proceedings.science/icnphh-2023/papers/cell-viability-assay-of-stryphnodendron-adstringens-mart-coville-extract-and-fra?lang=en#>

Parte deste trabalho foi premiada no 3rd International Conference on Natural Products and Human Health:

2nd best research work, Oral On site mode, ongoing category, during the 3rd Conference on Natural Products and Human Health - ICNPHH 2023, UNIFIPA, World Union for Herbal Drug Discovery (WUHeDD), and Deshbandhu College, University of Delhi, India (DPSRU).

A minha família
À memória de minha querida avó,
Buia.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus que sempre nos momentos mais desafiantes tem me segurado, guiado e vigiado! Pela saúde que me permite exercer o dom da perseverança!

À minha família, meus queridos pais e irmãos pelo apoio emocional incondicional e serem meus maiores incentivadores! À minha querida Buia, vulgo ‘*abuela*’, (*in memoriam*), que me apoiou e desejou que eu fosse uma pessoa íntegra e continuasse estudando para ajudar as pessoas. Amo vocês!

Aos meus amigos, meus apoiadores que nesses anos de estudo têm escutado todas as minhas queixas, mas também compartilhado comigo os bons momentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de aprendizado e realização desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, por ter me acolhido com orientanda e pela oportunidade de seguir meus estudos. Agradeço pela confiança, ensinamentos, compreensão e orientação! Assim como pela amizade e boas risadas!

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos conhecimentos compartilhados, e a todos os docentes que já passaram pela minha vida.

Aos colegas do Laboratório PALAFITO, por compartilhar tanto os empecilhos do dia-a-dia quanto as risadas e bons momentos! Pela amizade, companheirismo e pelo conhecimento compartilhado e paciência em transmiti-los a mim. Tenho orgulho em fazer parte deste grupo!

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Helena Francisca, ao técnico Admir, e aos demais funcionários da Universidade Estadual de Maringá, pela atenção e paciência;

Aos professores participantes da banca examinadora de qualificação, que dividiram comigo um momento importante e desafiador, Profa. Dra. Eneri Mello e Profa. Dra. Raquel Isolani.

Aos participantes da banca examinadora de defesa, que dividiram comigo um momento determinante em minha vida, por aceitarem colaborar com seus conhecimentos para o aprimoramento da minha dissertação e trabalho, Prof. Paulo Wender Portal Gomes e Profa. Dra. Naiara Cássia Gancedo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e bolsa cedida durante os anos de 2022-2023.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma estiveram e estão presentes em minha vida, me auxiliando a concluir mais esta etapa em minha vida. Meu respeito e muito obrigada a vocês!

'Ora essa, mas que lindas flores tivemos este ano. Olhe, só falta aquela, mas eu sei que quando ela desabrochar ela será a mais bela de todas' – Hua, Z. Mulan, 1998.

BIOGRAFIA



Bárbara Longhini Gonzalez nasceu em Paranavaí, PR, no dia 28/02/1996. Cresceu na cidade de Paranavaí, PR, e aos oito anos mudou-se para a Espanha, onde estudou parte do ensino fundamental e médio em escola pública, cursando as diferentes disciplinas de Música, Língua Inglesa, Língua Francesa, Língua Castelhana e Ciências Tecnológicas. Em 2010 retornou ao Brasil e iniciou seus estudos novamente em Paranavaí, onde os concluiu em escolas particulares como bolsista integral. Em 2018 ingressou como bolsista pelo Programa Universidade Para Todos (PROUNI) no curso de Farmácia do Centro Universitário Ingá. Durante a graduação (2018-2021): foi membro durante dois anos da Liga de Embriologia e Genética Médica (LAEGEM) do curso de Medicina-UNINGÁ; participou de congressos internacionais com apresentação de trabalhos com resumos publicados em anais; foi monitora da disciplina de Estágio de Manipulação Farmacêutica e Veterinária; ministrou aulas particulares das disciplinas de Química Geral, Química Orgânica, Farmacologia, Farmacotécnica, Tecnologia Farmacêutica, e Controle de Qualidade; trabalhou com a tradução de trabalhos para a língua Inglesa e/ou Castelhana; realizou correções de trabalhos de conclusão de curso e artigos científicos das áreas de Ciências da Saúde e Humanas. Além disso, participou do projeto de Iniciação Científica intitulado ‘Avaliação da equivalência farmacêutica de comprimidos de atenolol, furosemida e hidroclorotiazida provenientes da Farmácia Solidária do município de Maringá (PR)’, relacionado com o controle de qualidade de medicamentos provenientes do Programa Farmácia Solidária (Maringá, PR), sob a orientação da Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo. Trabalha com revisões sistemáticas desde 2021, e em março de 2022 teve o artigo ‘*The naturally-derived alkaloids as a potential treatment for COVID-19: a scoping review*’ publicado na revista *Phytotherapy Research*. Em 2022 iniciou mestrado acadêmico no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, na Universidade Estadual de Maringá, realizando suas atividades no Laboratório de Biologia Farmacêutica, PALAFITO-UEM, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Ao longo dos dois anos colaborou com trabalhos de conclusão de curso e iniciação científica de discentes da UNINGÁ, dos quais foram escritos cinco artigos. Participou do ‘3rd Conference on Natural Products and Human Health - ICNPHH 2023’, no qual obteve em segundo lugar o prêmio de melhor apresentação oral na categoria de pesquisas em andamento, assim como foi uma das anfitriãs que acompanharam palestrantes internacionais durante sua estadia em Catanduva-SP.

GONZALEZ, B. 2024. **Análise do perfil fitoquímico da casca caulinar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e avaliação da atividade cicatrizante em células L-929.** Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 108p.

O *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville é uma espécie de Barbatimão presente no Cerrado brasileiro, frequentemente utilizada por comunidades locais devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e cicatrizantes. Estudos indicam que a atividade biológica dessa espécie está associada ao elevado teor de compostos fenólicos, predominantemente taninos, e diversos deles evidenciaram ação cicatrizante e anti-inflamatória. Para investigações sobre cicatrização *in vitro*, destaca-se a importância dos fibroblastos, fundamentais para manter a homeostase tecidual e cuja proliferação pode contribuir para a redução do tempo de cicatrização. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração adequada de extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) de *S. adstringens* para avaliar sua atividade proliferativa e cicatrizante. Para identificar qualitativamente os taninos presentes na droga vegetal foram realizados testes com gelatina, cloreto férrico e reagente de Stiasny. O teor de polifenóis foi determinado por meio do reagente de Folin-Ciocalteu, com pirogalol como padrão. A quantificação de ácido gálico e galocatequina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme estabelecido pela sexta edição da Farmacopeia Brasileira. O EB foi obtido por turbo-extração a partir do pó da casca caulinar de *S. adstringens*, enquanto as frações foram obtidas por meio de partição líquido-líquido com acetato de etila e água. A caracterização e análise fitoquímica foi conduzida por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em células fibroblásticas L-929. O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o reagente brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio. A migração celular foi observada ao longo de 72 h e os registros fotográficos foram realizados a cada 24 h. Os rendimentos de extração foram de 32,54%, 31,50% e 71,65% para EB, FAE e FAQ, respectivamente. Foram obtidos para EB e FAE $375,845 \pm 0,5503$ e $340,306 \pm 1,981$ mg/g de EB/FAE \pm DP equivalentes de pirogalol, respectivamente. As concentrações de ácido gálico e galocatequina quantificadas por CLAE foram de $0,363 \pm 0,0565$ e $1,069 \pm 0,1563$ (mg/g de droga vegetal), respectivamente. Dados espectrométricos sugerem a presença dos metabólitos fenólicos ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina, 4'-O-metil-epigalocatequina e epigalocatequina-3-O-galato, além disso foi constatada a presença de dímeros de prodeldinidina-prodelfinidina e prorobinetinidina-prodelfinidina. Nos ensaios *in vitro*, os tratamentos com EB e FAQ demonstram CC_{50} superior a 125 μ g/mL, enquanto a FAE exibiu uma CC_{50} superior a 250 μ g/mL. Observou-se uma maior taxa de proliferação celular em concentrações de 7,81 μ g/mL para EB e FAQ, e de 15,62 μ g/mL para FAE. Concentrações iguais ou inferiores a 15,62 μ g/mL garantiram uma viabilidade celular acima de 100%, e a concentração de 7,81 μ g/mL resultou em mais de 40% de fechamento de feridas *in vitro* em todos os tratamentos. Em suma, os três tratamentos desempenharam um papel significativo na indução de proliferação e cicatrização celular. No entanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre EB, FAE e FAQ na concentração e 7,81 μ g/mL.

Palavras-chave: Cultura de células, Ferida, Fibroblasto, Proantocianidinas, Taninos.

GONZALEZ, B. 2024. **Analysis of the phytochemical profile of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville and evaluation of wound healing activity on L-929 cells.** Master's Thesis – Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 108p.

The *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville is a species of Barbatimão found in the Brazilian Cerrado, often utilized by local communities due to its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and wound healing properties. Studies indicate that the biological activity of this species is associated with its high content of phenolic compounds, predominantly tannins, several of which have demonstrated wound healing and anti-inflammatory action. For *in vitro* wound healing investigations, the significance of fibroblasts is highlighted, as they are essential for maintaining tissue homeostasis and their proliferation may contribute to reducing wound healing time. The aim of this study was to determine the appropriate concentration of crude extract (CE), ethyl acetate fraction (EAF), and aqueous fraction (AQF) of *S. adstringens* to evaluate their proliferative and wound healing activity. Qualitative tests with gelatin, ferric chloride, and Stiasny reagent were conducted to identify the tannins present in the plant material. The content of polyphenols was determined using the Folin-Ciocalteu reagent, with pyrogallol as the standard. Quantification of gallic acid and galocatechin was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC), as established by the sixth edition of the Brazilian Pharmacopoeia. The EB was obtained by turbo-extraction from the stem bark powder of *S. adstringens*, while the fractions were obtained by liquid-liquid partitioning with ethyl acetate and water. Phytochemical characterization and analysis were conducted by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *In vitro* assays were performed on L-929 fibroblastic cells. Cell viability assays were conducted using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reagent. Cell migration was observed over 72 h, with photographic records taken every 24 h. Extraction yields were 32.54%, 31.50%, and 71.65% for CE, EAF, and AQF, respectively. CE and EAF were found to contain 375.845 ± 0.5503 and 340.306 ± 1.981 mg/g of CE/EAF \pm SD equivalents of pyrogallol, respectively. The concentrations of gallic acid and galocatechin quantified by HPLC were 0.363 ± 0.0565 and 1.069 ± 0.1563 mg/g of plant material, respectively. Spectrometric data suggest the presence of phenolic metabolites such as gallic acid, galocatechin, epigallocatechin, 4'-*O*-methylgalocatechin, 4'-*O*-methyl-epigallocatechin, and epigallocatechin-3-*O*-gallate, in addition to the presence of dimers of prodeldinidin-prodelfinidin and prorobinetinidin-prodelfinidin. In the *in vitro* assays, treatments with EB and FAQ demonstrated a CC_{50} greater than 125 μ g/mL, while FAE exhibited a CC_{50} greater than 250 μ g/mL. A higher rate of cell proliferation was observed at concentrations of 7.81 μ g/mL for EB and FAQ, and 15.62 μ g/mL for FAE. Concentrations equal to or lower than 15.62 μ g/mL ensured cell viability above 100%, with 7.81 μ g/mL resulting in over 40% closure of *in vitro* wounds in all treatments. In summary, all three treatments performed a significant role in inducing cell proliferation and wound healing. However, there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) observed between EB, FAE, and FAQ at a concentration of 7.81 μ g/mL.

Keywords: Cell culture, Fibroblast, Proanthocyanidins, Tannins, Wound.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição das espécies *Stryphnodendron* Mart. ao longo do território brasileiro.26
- Figura 2.** Exemplar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.....29
- Figura 3.** Cascas de espécime de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville.....32
- Figura 4.** Células L-929 em cultura aderente. A: aumento de 100x; B: aumento de 400x..... 36
- Figura 5.** Fases do reparo tecidual natural. A primeira etapa é representada pela hemostasia com vasoconstrição, ativação de plaquetas e agregação plaquetária. A segunda etapa consiste na etapa de inflamação que se inicia em 24 horas após a lesão e com duração variável. Na terceira etapa ocorre a proliferação celular, produção de matriz extracelular (MEC). Na fase final, a remodelação se inicia e a duração depende de atividade das citocinas, tamanho da lesão, grau de nutrição do paciente e eventuais comorbidades. PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; EGF: fator de crescimento epidérmico; TGF- β : fator de crescimento transformador; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IGF: fator de crescimento semelhante à insulina; VEGF: fator de crescimento endotelial. HGF: fator de crescimento de hepatócitos. CX3CL: ligante de quimiocina; CCL2: ligante de quimiocina 2.....38
- Figura 6.** Representação da distribuição das amostras realizada em placa de 96 poços. Entre 1-4, 5-8, 9 e 12 foram adicionadas as amostras de extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ), respectivamente. Nas linhas A, B, C, D, E e F foram colocados os tratamentos com concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. C: controle negativo (DMEM sem SFB); B: branco (poço com tratamento e DMSO apenas).52
- Figura 7.** Ilustração do processo de diluição seriada realizada para o ensaio de viabilidade celular.52
- Figura 8.** Representação da distribuição das amostras realizada em placa de 24 poços. Entre 1-3 e 4-6 foram adicionadas as amostras de cada réplica de cada tratamento. Nas linhas A, B, C e D, foram adicionados os tratamentos com concentrações de 31,25, 15,62 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. C: controle negativo (DMEM sem SFB).....54
- Figura 9.** Reação colorimétrica com cloreto férrico. Tubo A: controle negativo, apenas a solução extrativa. Tubo B: solução extrativa com o reagente cloreto férrico.....55
- Figura 10.** Reação de precipitação com gelatina. Tubo A, representando o controle negativo contendo apenas solução extrativa. Tubo B, representando a amostra teste contendo a solução extrativa e a solução de gelatina.56
- Figura 11.** Reação de Stiasny. Em (A) tem-se a formação de precipitado avermelhado, os flobafenos que indicam a presença de taninos condensados. Em (B) observa-se a formação de coloração azulada indicando a presença de taninos hidrolisáveis.57

Figura 13. Regressão linear para determinação de polifenóis totais obtida por meio da reação de Folin-Ciocalteu empregando o padrão pirogalol.	58
Figura 12. Reação colorimétrica do padrão pirogalol, em concentração crescente, para determinação de polifenóis totais pela reação de Folin-Ciocalteu.	58
Figura 14. Reação colorimétrica em concentração decrescente de extrato bruto de <i>S. adstringens</i> pelo reagente de Folin-Ciocalteu.....	60
Figura 16. Cromatograma de FAE de <i>Stryphnodendron adstringens</i> . A – Ácido gálico; B – Galocatequina; C – Epigalocatequina; D – 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina; E –Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato; F– 4'- <i>O</i> -metil-epigalocatequina	62
Figura 17. Cromatograma de FAE de <i>S. adstringens</i> obtido por CLAE-EM/EM. (1) – Ácido gálico; (4) – Galocatequina; (6) – Epigalocatequina; (14) - 4'- <i>O</i> -metil galocatequina; (16) – 4'- <i>O</i> -metil epigalocatequina; (18) – Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato.	64
Figura 18. Sugestão de esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massa em modo negativo $[M - H]^-$ do pico 2 de m/z 609,1231. Nesta proposta foi realizado a fissão de metídio-quinona (MQ) com perda de 304 u. Um exemplo de tanino encontrado na literatura de <i>S. adstringens</i> com a massa molecular e fragmentação apresentadas pelo pico 2 é o dímero de epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina.....	66
Figura 19. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M - H]^-$ do pico 7 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 761 constituído por unidades monoméricas de prodelfinidina e prodelfinidina-galoil. MQ: reação de metídio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel. FG: fissão de éster gálico.....	68
Figura 20. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 761,1341 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho).	69
Figura 21. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M - H]^-$ do pico 9 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 593 constituído de unidades monoméricas de prorobinetinidina e prodelfinidina. MQ: reação de metídio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel	70
Figura 22. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 593,1294 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho)	71
Figura 23. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M - H]^-$ do pico 17 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 915 constituído duas unidades monoméricas de prodelfinidina-galoil (epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato). MQ: reação de metídio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel	72
Figura 24. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 915,1636 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho)	73
Figura 25. Efeito dos tratamentos na proliferação de células L-929. Todas as barras representam a média \pm DP de três réplicas experimentais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$	

foram considerados significantes quando comparados os tratamentos entre si em cada concentração através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. 74

Figura 26. Efeito dos tratamentos na proliferação de células L-929. Todas as barras representam a média±DP de três réplicas experimentais. As barras representam a média ± DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados ao controle negativo (sem tratamento) através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. 75

Figura 27. Efeito na migração celular *in vitro* de células L-929 dos tratamentos comparados entre si ao longo dos três dias. Todas as barras representam a média±DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados as concentrações entre cada tratamento em um mesmo tempo através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. A: tratamentos com concentração de 31,50 µg /mL; B: tratamentos com concentração de 15,62 µg /mL; C: tratamentos com concentração de 7,81 µg /mL. 78

Figura 28. Efeito na migração celular *in vitro* de células L-929 dos tratamentos comparados com o controle. Todas as barras representam a média±DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados as concentrações entre cada tratamento em um mesmo tempo através do post hoc de teste de Tukey. 79

Figura 29. Efeito de distintas concentrações obtidas do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) de *Stryphnodendron adstringens*. Resultados obtidos no ensaio de migração celular *in vitro*, sendo as colunas referentes às concentrações de cada amostra e as linhas referentes ao tempo em que foram adquiridas as imagens (0, 24, 48 e 72 h) após a ranhadura realizada com pipeta estéril e administração de tratamento. As imagens foram obtidas por meio do software ZEN Core 9.1 (Carl Zeiss) através de uma câmera Axiocam 105 acoplada o microscópio invertido (Carl Zeiss). Para a análise e mensuração da ferida foi utilizado o software Image J. 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Compostos isolados da espécie <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	30
Tabela 2 Eluição dos solventes da metodologia aplicada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência.....	47
Tabela 3. Diluições para os padrões de galocatequina e ácido gálico em tubo eppendorf em 1 mL.....	48
Tabela 4. Eluição dos solventes da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas	49
Tabela 5. Valores obtidos no preparo do extrato e frações de <i>Stryphnodendron adstringens</i> .	55
Tabela 6. Teor de polifenóis totais expressos em equivalentes de pirogalol do extrato bruto e fração acetato de tila de <i>Stryphnodendron adstringens</i> e suas respectivas absorvâncias.....	59
Tabela 7. Resultados do ensaio de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação dos polifenóis galocatequina e ácido gálico.....	61
Tabela 8 Constituintes fitoquímicos identificados da fração acetato de etila de <i>Stryphnodendron adstringens</i> por CLAE-IES-QtoF-EM/EM em modo negativo $[M - H]^-$	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Diferentes monômeros de taninos condensados de acordo com o número, posição e estereoquímica na estrutura básica acima. R ¹ = radical 1; R ² = radical 2; R ³ = radical 3; A = anel A; B = anel B; e C = anel C.....	28
Quadro 2 Etapas da cicatrização..	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Computação gráfica tridimensional
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Antimicrobiano
BFF	Reação de fissão de formação de benzofurano
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% da população em estudo
CL-DAD-EM	Cromatografia líquida acoplada a detector por arranjo de diodos e espectrometria de massas em Tandem
CLAE-IES- QToF-EM/EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas Tandem com analisador do tipo quadrupolo (Q) acoplado com tempo de voo (ToF) equipado com uma fonte de ionização por <i>electrospray</i> (IES)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMF	Migração de carga do fragmento
CO₂	Dióxido de carbono
<i>Colla1</i>	Cadeia alfa I de colágeno
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DMEM	<i>Dulbeccos' Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DV	Droga vegetal
EB	Extrato bruto
EGCG	Epigallocatequina-3- <i>O</i> -galato
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EMAR	Espectrometria de massas da alta resolução
ESI	Eletrospray
FAE	Fração acetato de etila
FG	Fissão de éster gálico
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FSP-1/S1004A	Proteína específica de fibroblasto - 1
HIFs	Fatores Induzíveis de Hipóxia

HRF	Reação de fissão do anel heterocíclico
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
iNOS	NO-sintase induzível
M-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MQ	Reação de metídio-quinona
MS	Íon precursor
MS/MS	Íon fragmento
MTT	(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio
NO	Óxido nítrico
NOS	NO-sintase
PBS	Tampão fosfato alcalino
PDE	Prodelfinidina
PDEG	Prodelfinidina-prodelfinidina-galoil
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFR-α	Receptor alfa de fator de crescimento derivado de plaquetas
PNPIC	Política de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPMP	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PRD	Prorobinetinidina
RDA	Reação de Retro-Diels-Alder
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
SFB	Soro fetal bovino
SM1	Solução-estoque 1
SM2	Solução-estoque 2
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF-α	Fator de crescimento transformante alfa
TGF-β	Fator de crescimento transformante beta
TNF	Fator de crescimento tumoral
TPC	Teor de polifenóis totais
Tr	Tempo de retenção
VEGF	Fator crescimento endotelial celular

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g/L}$	Micrograma por litro
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μm	Micrometros
mg/g	Miligrama por grama
mg/mL	Miligrama por mililitro
nm	Nanometros
p/p	Peso por peso
p/v	Peso por volume
u	Unidade unificada de massa atômica
UI/mL	Uma unidade internacional por mililitro
v/v	Volume por volume
μL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	ASPECTOS GERAIS DE <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	24
2.1.1	Fabaceae Lindl.....	24
2.1.2	<i>Stryphnodendron</i> Mart.....	25
2.1.2.1	Distribuição geográfica	25
2.1.2.2	Tanino: principal classe de metabólito secundário de <i>Stryphnodendron</i> Mart.....	26
2.1.3	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville.....	28
2.1.3.1	Composição química de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	29
2.2	ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE <i>Stryphnodendron adstringens</i>	32
2.3	CULTURA DE CÉLULAS	34
2.3.1	A linhagem celular clone L-929	35
2.4	CICATRIZAÇÃO	37
3	OBJETIVOS	40
2.5	OBJETIVO GERAL	40
2.6	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	MATERIAL	41
4.1.1	Matéria-prima vegetal.....	41
4.1.2	Solventes, reagentes e soluções	41
4.1.3	Equipamentos	42
4.2	MÉTODOS	43
4.2.1	Preparo e caracterização da matéria-prima vegetal	43
4.2.1.1	Preparo do extrato bruto	43
4.2.1.2	Preparo da fração acetato de etila e aquosa.....	44
4.2.2	Análise qualitativa	44
4.2.2.1	Reação para taninos com o reagente cloreto férrico (FeCl ₃).....	44
4.2.2.2	Reação para taninos com gelatina	44
4.2.2.3	Reação de Stiasny – taninos hidrolisáveis - condensados.....	45
4.2.3	Análise quantitativa	45
4.2.3.1	Análise do teor de polifenóis totais	45
4.2.3.1.1	Preparação da solução padrão para curva de calibração	45
4.2.3.1.2	Preparação da solução amostra de EB e FAE.....	46

4.2.3.2	Determinação de teor de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	46
4.2.3.2.1	Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal.....	47
4.2.3.2.2	Preparo das soluções padrões para a curva de calibração.....	48
4.2.3.2.3	Diluição das soluções padrão para curva analítica.....	48
4.2.3.2.4	Cálculo para determinação do teor de galocatequina e ácido gálico.....	48
4.2.4	Análise do conteúdo fitoquímico por meio de cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-IES-QToF-EM/EM).....	49
4.2.5	Ensaio de viabilidade celular.....	50
4.2.5.1	Reativação das células congeladas.....	50
4.2.5.2	Passagem das células.....	50
4.2.5.3	Plaqueamento das células.....	51
4.2.5.4	Tratamento das células.....	51
4.2.5.5	Incubação com MTT e leitura.....	52
4.2.6	Ensaio de migração celular.....	53
4.2.6.1	Plaqueamento das células.....	53
4.2.6.2	Tratamento das células.....	53
4.2.6.3	Leitura dos resultados.....	54
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5.1	RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO (EB) E FRAÇÕES OBTIDAS (FAE E FAQ) DAS CASCAS DO CAULE DE <i>S. adstringens</i>.....	55
5.2	ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA.....	55
5.2.1	Análise qualitativa.....	55
5.2.1.1	Reação para taninos com o reagente cloreto férrico (FeCl ₃).....	55
5.2.1.2	Reação para taninos com gelatina.....	56
5.2.1.3	Reação de Stiasny para taninos hidrolisáveis - condensados.....	56
5.2.2	Análise quantitativa.....	57
5.2.2.1	Análise do teor de polifenóis totais.....	57
5.2.2.1.1	Determinação da curva de calibração do pirogalo.....	58
5.2.2.1.2	Determinação do teor de polifenóis totais das amostras de extrato bruto e fração acetato de etila.....	59
5.2.2.2	Determinação de teor de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	60
5.3	ANÁLISE DO CONTEÚDO FITOQUÍMICO POR MEIO DE CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO AO	

ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-IES-QToF-EM/EM).....	63
5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	74
5.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR.....	77
6 CONCLUSÕES.....	83
REFERÊNCIAS.....	84
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE <i>Stryphnodendron adstringens</i>	96
Pico 1. Íon precursor <i>m/z</i> 169,0137 [M – H] ⁻ : ácido gálico;.....	96
Pico 2. Íon precursor <i>m/z</i> 609,1231 [M – H] ⁻ : dímero de PDE-PDE;.....	96
Pico 3. Íon precursor <i>m/z</i> 623,1399 [M – H] ⁻ ;.....	97
Pico 4. Íon precursor <i>m/z</i> 305,0663 [M – H] ⁻ : galocatequina;.....	97
Pico 5. Íon precursor de <i>m/z</i> 611,1386 [M – H] ⁻ : dímero de PDE-PDE;.....	98
Pico 6. Íon precursor de <i>m/z</i> 305,0660 [M – H] ⁻ : epigalocatequina;.....	98
Pico 8. Íon precursor de <i>m/z</i> 775,1500 [M – H] ⁻ : dímero de PDE-PDE;.....	99
Pico 9. Íon precursor <i>m/z</i> 593,1294 [M – H] ⁻ : dímero de PRD-PDE;.....	100
Pico 11. Íon precursor <i>m/z</i> 957,2432 [M – H] ⁻ : trímero de PDE-PDE-PDE;.....	101
Pico 12. Íon precursor de <i>m/z</i> 959,2595 [M – H] ⁻ : trímero de PDE-PDE;.....	102
Pico 13. Íon precursor de <i>m/z</i> 639,1710 [M – H] ⁻ : dímero de PDE-PDE;.....	102
Pico 14. Íon precursor de <i>m/z</i> 319,0823	102
Pico 15. Íon precursor de <i>m/z</i> 607,1456 [M – H] ⁻ ;.....	103
Pico 16. Íon precursor de <i>m/z</i> 319,0827 [M – H] ⁻ : 4'- <i>O</i> -metil-epigalocatequina;.....	103
Pico 17. Íon precursor de <i>m/z</i> 915,1636 [M – H] ⁻ : dímero de EGCG;.....	104
Pico 18. Íon precursor de <i>m/z</i> 457,0788 [M – H] ⁻ : epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato;.....	104
Pico 19. Íon precursor de <i>m/z</i> 607,1464 [M – H] ⁻ ;.....	105
Pico 20. Íon precursor de <i>m/z</i> 621,1617 [M – H] ⁻ ;.....	105
Pico 21. Íon precursor de <i>m/z</i> 471,0931 [M – H] ⁻ ;.....	106
Pico 22. Íon precursor de <i>m/z</i> 943,1930 [M – H] ⁻ ;.....	106
Pico 23. Íon precursor de <i>m/z</i> 621,1609 [M – H] ⁻ ;.....	107
Pico 24. Íon precursor de <i>m/z</i> 621,1611 [M – H] ⁻ ;.....	108

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, a população brasileira utiliza as cascas do Barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, como agente antibacteriano, anti-inflamatório, antisséptico, adstringente e cicatrizante (Pellenz et al., 2019). Devido ao amplo uso popular e às atividades farmacológicas observadas, a espécie foi incluída na lista de Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Além disso, o uso do Barbatimão levou às autoridades estabelecer regras para o controle de qualidade da planta, incluindo-a na Farmacopeia Brasileira (Farmacopeia Brasileira, 2019; RENISUS, 2009).

Os taninos são os principais constituintes fitoquímicos dessa espécie, formados por um conjunto complexo de metabólitos secundários com características fenólicas, apresentando hidroxilas capazes de se complexar com proteínas, metais e alcaloides (Das et al., 2020). De acordo com a monografia, a droga vegetal é constituída das cascas caulinares secas de *S. adstringens* e deve conter, no mínimo, 8% de taninos totais. Estudos químicos realizados identificaram compostos majoritários de diferentes classes nos órgãos da planta, sendo os flavonoides encontrados nas folhas, principalmente, e os ácidos fenólicos e taninos, presentes em alta concentração nas cascas (Ribeiro et al., 2022).

Conhecidos como proantocianidinas, os taninos condensados são os encontrados nas cascas do *S. adstringens*, cuja estrutura consiste em unidades monoméricas de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol. Como exemplo, têm-se os monômeros de catequina, galocatequina, epicatequina e epigalocatequina (Bruyne et al., 1999). Esse tipo de tanino possui distintas aplicações na área da saúde em razão das suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antioxidantes e antifúngicas (Bruyne et al., 1999). Além disso, também são aplicados na indústria alimentícia, de curtume de couro, pesca, entre outras (Das et al., 2020; Mello & Santos, 2016).

Esses metabólitos secundários são os responsáveis pela ação farmacológica exercida pela espécie e explicam os usos populares para diversos fins, como úlcera gástrica, cicatrização de feridas, tratamento ginecológico e hemorroida (Lima et al., 2022). Diversos estudos demonstraram atividade antibacteriana, uma vez que os taninos presentes na planta têm a capacidade de inibir enzimas extracelulares e ativar a fosforilação oxidativa (Toledo, 2002; Audi et al., 1999; Santos et al., 2009; Trevisan et al., 2020).

Além da atividade antibacteriana, há pesquisas relacionadas à ação antifúngica, em que os taninos foram capazes de afetar a integridade da parede celular ao modificar a permeabilidade da membrana, assim como inibir a formação do tubo germinativo prejudicando

o processo de brotamento (Ishida et al., 2006; Ishida, Rozental, Mello, & Nakamura, 2009; Pinto, 2011; Luiz et al., 2015).

Entre as distintas atividades do *S. adstringens*, destaca-se notoriamente a ação cicatrizante, em que exercem ação anti-inflamatória e antioxidante (Vieira, Leite-Mello & Mello, 1998; Sanches et al., 2007; Hernandez et al., 2010).

Assim, sabe-se que o extrato bruto (EB) e frações do Barbatimão, ricos em polifenóis, apresentam atividade cicatrizante sobre diferentes tipos de feridas. A investigação dos possíveis mecanismos de ação da espécie *S. adstringens* é de grande relevância, dado o crescente número de pessoas portadoras de patologias que influenciam no processo cicatricial, além daquelas que estão enfrentando tratamentos agressivos para o câncer, cujas feridas são dolorosas e de difícil cicatrização (Pittito, Bahia, & Melo, 2023).

Para a avaliação do processo de cicatrização, as células fibroblásticas são um importante aliado, sendo que os fibroblastos, células mesenquimais estromais, desempenham um papel significativo no reparo de tecidos, expressando genes específicos (Wei, Nguyen & Brenner, 2021). Pesquisas recentes evidenciam a complexidade desse tipo celular, cujas características variam segundo a sua origem, além do papel diversificado que possuem na homeostase, modulação de processos inflamatórios e cicatriciais através de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (Davidson et al, 2021).

Em suma, visando a investigação do potencial cicatrizante da espécie e pensando na melhoria da qualidade de vida das pessoas com feridas crônicas, o objetivo deste trabalho foi investigar a viabilidade celular em células fibroblásticas tratadas com extrato bruto hidroacetônico, fração acetato de etila e fração aquosa de *S. adstringens*, a fim de avaliar a atividade cicatrizante *in vitro* da espécie.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui legislação de registro para uso de fitoterápicos desde 1967, no entanto quando comparado à China ele é considerado um país emergente no tratamento envolvendo Plantas e Fitoterápicos (Brasil, 1967). Em 2006, a preocupação em registrar, implementar e regular o uso de plantas fez com que houvesse a criação para Sistema Único de Saúde (SUS) da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMP), a Política de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (Brasil, 2006 a, b) e a aprovação do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (Brasil, 2008).

Em 2009, foi criada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), cuja listagem compreende em 71 espécies vegetais brasileiras com potencial terapêutico. O intuito da criação da lista foi promover a orientação de pesquisas e estudos na área de medicamentos e insumos estratégicos para o SUS, e dentre as espécies de interesse está o Barbatimão, listado como '*Stryphnodendron adstringens* = *Stryphnodendron barbatimam*' (Brasil, 2009).

2.1 ASPECTOS GERAIS DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

2.1.1 Fabaceae Lindl.

Atualmente, o gênero *Stryphnodendron* Mart. está inserido na família Fabaceae Lindl., e segundo o '*Plants of the World Online*' (Powo, 2024), o termo 'Leguminosae Juss' é sinônimo do nome aceito oficialmente, Fabaceae Lindl. (Powo, 2024; WFO Plant list, 2023). As leguminosas, como são tradicionalmente denominadas as espécies da família Fabaceae (LEWIS et al. 2005) eram divididas em três subfamílias: Caesalpinioideae DC., Mimosoideae DC. e Papilionoideae DC. (LPWG, 2013).

Considerando o caráter filogenético padrão de estudos recentes, em 2017, um grupo que estuda a filogenia de leguminosas expôs uma nova proposta de classificação para a família Fabaceae/Leguminosae em seis subfamílias, sendo nomeadas: Caesalpinioideae; Cercidoideae; Detarioideae; Dialioideae; Duparquetioideae e Papilionoideae (LPWG, 2017).

Posto isto, a nova classificação de Leguminosae configura um consenso da comunidade internacional de sistemática de leguminosas, logo, o gênero *Stryphnodendron* Mart. foi anexado à subfamília Caesalpinioideae, a qual englobou os gêneros do antigo clado mimosoide, compreendendo agora em 148 gêneros com 4400 espécies catalogadas (LPWG, 2017; WFO Plant List, 2023). No mais, enfatiza-se que as espécies advindas desta família são uma fonte

rica de componentes fitoquímicos, em especial os flavonoides, lectinas, alcaloides, carotenoides, saponinas, terpenoides e ácidos fenólicos (Usman et al., 2022).

2.1.2 *Stryphnodendron* Mart.

As palavras gregas “*stryphnós*” e “*déndron*” significam “lenho duro” e “árvore”, respectivamente, e a combinação de ambas originou o gênero *Stryphnodendron* Mart. (Penna, 1946). O gênero *Stryphnodendron* pertence à família Fabaceae (subfamília Caesalpinioideae, clado Mimosoide), designada comumente de leguminosas (LPWG, 2017; Scalon et al. 2022) e recentemente houve a inclusão de novas espécies ao gênero *Stryphnodendron* Mart. totalizando 35 espécies aceitas, sendo nove de espécies novas e duas variações encontradas (Lima et al., 2022).

De acordo com Scalon et al. (2022), as espécies deste gênero são frequentes do Cerrado brasileiro e da floresta amazônica, sendo que 89% do táxon é encontrado no Brasil e aproximadamente metade dele é endêmico do país. Podem encontrar-se espécies do gênero em forma de arbustos, subarbustos ou árvores (Sanches et al. 2007; Ribeiro et al., 2022). Externamente, no geral, são caracterizadas por ramos inermes recobertos por indumento ferruginoso no ápice, folhas duplamente pinadas, sendo cada folíolo subdividido em foliólulos (Souza; Flores & Lorenzi, 2013).

Há presença de nectários extraflorais, flores dispostas em espigas, pentâmeras com sépalas e pétalas conadas, dez estames livres ou pouco conatos perto da base, ovário curto estipitado, frutos septados dos tipos de leguminosas ou folículos nucoides e sementes endospermas com pleurograma do tipo apical-basal (Scalon; Paula-Souza & Lima, 2022). Portanto, as espécies são diferenciadas morfológicamente por meio das singularidades apresentadas por suas folhas (número de pinas e tamanho dos folíolos), inflorescências dos frutos e tipos de grão de pólen (Occhioni, 1990; Lima et al., 2022).

Ainda, as espécies do gênero são denominadas popularmente como Barbatimão, contudo apenas a espécie *S. adstringens*, ou seu sinônimo, *S. barbatimam* (Vell.) Mart., é considerada o verdadeiro Barbatimão (Farmacopeia Brasileira, 2019; Ribeiro et al., 2022). O nome popular citado provém do termo de origem indígena *ybatimó* ou *uabatimó*, que significa adstringente devido ao alto teor de taninos em seus órgãos (Machado, 2005).

2.1.2.1 Distribuição geográfica

As espécies pertencentes ao gênero *Stryphnodendron* são específicas de clima tropical ou subtropical, e podem estar distribuídas entre o limite norte da Nicarágua e o limite sul no

norte do estado do Paraná (Brasil), sendo o Brasil o país que concentra o maior número de espécies deste gênero (Occhioni, 1990; Lima et al., 2022).

S. adstringens é uma espécie endêmica do território brasileiro e nativa do Cerrado brasileiro presente no Sudeste e Centro Oeste do país, porém é possível encontrá-la em vários Estados (Figura 1), como Pará, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Tocantins (Lima et al., 2022).



Figura 1. Distribuição das espécies *Stryphnodendron* Mart. ao longo do território brasileiro. **Fonte:** Adaptado de Lima et al. (2022).

2.1.2.2 Tanino: principal classe de metabólito secundário de *Stryphnodendron* Mart.

Tanino é um termo aplicado ao conjunto complexo de metabólitos de característica fenólica com hidroxilas e grupos carboxilas capazes de se complexarem com diversas macromoléculas. Sua presença está associada aos tecidos lenhosos de Angiospermas, mas também pode ser encontrado em Gimnospermas (Das et al., 2020).

Oriundos do metabolismo secundário, esses compostos fenólicos podem ser originados pela via do ácido chiquímico (taninos hidrolisáveis) ou pela via mista ácido chiquímico/acetil-CoA (taninos condensados). São classificados como polifenóis, de peso molecular variado entre 500 e 3000 u (Vital et al., 2004). Em geral são capazes de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, cujas metoxilas ligadas ao nitrogênio se ligam aos hidrogênios aromáticos dos taninos (Haslam, 1998).

Essas moléculas são produzidas em plastídios para então serem armazenados em vacúolos ou na superfície cerosa de órgãos vegetais, desta forma ficam ativos e atuam

protegendo a planta contra predadores, e em alguns casos auxiliam na manutenção do metabolismo da mesma (Das et al., 2020). Em geral, essa classe de metabólito pode ser encontrada em tecidos vasculares (xilema e floema) de árvores, em que a casca quando comparada com outras partes, como folhas e raízes, possui maior concentração de taninos (Antiwi-Boasiako & Animapauh, 2012).

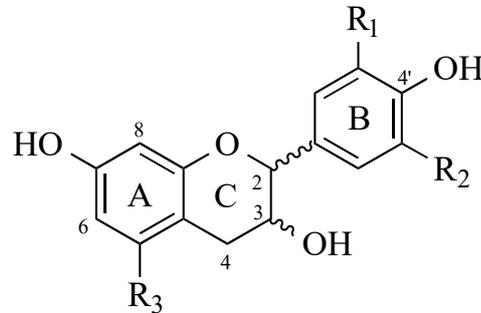
Além disso, os taninos também podem associar-se com proteínas. Um exemplo típico dessa complexação é o sabor adstringente de frutos ricos em taninos, os quais interagem com as proteínas salivares (Buelga & Scarlbert, 2000). Complexos tanino-proteicos podem ser classificados como reversíveis ou irreversíveis. Quando as pontes de hidrogênio são formadas têm-se uma complexação reversível, já quando há ligações entre os núcleos aromáticos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos peptídeos elas se tornam irreversíveis (Luck et al., 1994).

Estruturalmente, essa classe possui de 12 a 16 grupos fenólicos e 5 a 7 anéis aromáticos com 1000 unidades relativas de massa molecular, sendo divididos em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (Mello & Santos, 2016). Os taninos hidrolisáveis são subdivididos conforme a esterificação que sofrem. Quando há um poliol central, normalmente, uma β -D-glicose, cujas hidroxilas sofrem esterificação com o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico), tem-se os galotaninos (Hillis, 1997). Quando a esterificação ocorre com o ácido hexahidroxidifênico são formados os elagitaninos (Das et al., 2022).

Os taninos condensados (proantocianidinas) são compostos por oligômeros ou polímeros complexos de flavan-3-ol (catequinas) e/ou flavan-3,4-diol, cujo peso molecular pode variar de 500 a mais de 20000 Daltons, sendo relativamente instáveis (Hillis, 1997; Das et al., 2020). Quando submetidos a hidrólise ácida com mineral, eles produzem pigmentos da classe das antocianidinas (cianidina, delphinidina), o que confere a eles a denominação de proantocianidinas (Mello & Santos, 2016).

A complexidade estrutural existente nas proantocianidinas ocorre não apenas em razão do grau de polimerização, mas também de acordo com o grau de hidroxilação do anel B, da estereoquímica dos carbonos assimétricos (C2 e C3) (Quadro 1), as ligações interflavonas, a estereoquímica dos pontos de pontes interflavonas e o padrão de substituição (Symma & Hensel, 2022). As ligações interflavonas são divididas em tipo A e B, em que B são as ligações carbono-carbono 4 \rightarrow 6 ou 4 \rightarrow 8, e o tipo A são as ligações 4 \rightarrow 8 e 2 \rightarrow O \rightarrow 7, possuindo uma ligação do tipo éter (Mello & Santos, 2016; Symma & Hensel, 2022).

Além dos monômeros de catequina, epicatequina, galocatequina e epigalocatequina, outros como o robinetinidol e fisetinidol podem ser encontrados nas moléculas de taninos condensados (Bruyne et al., 1999).



Quadro 1 Diferentes monômeros de taninos condensados de acordo com o número, posição e estereoquímica na estrutura básica acima. R¹ = radical 1; R² = radical 2; R³ = radical 3; A = anel A; B = anel B; e C = anel C. **Fonte:** Symma & Hensel (2022).

Configuração dos diastereoisômeros		R1	R2	R3
2R,2S e 2S,3R (trans)	2R, 3R e 2S, 3S (cis)			
Afzelequina	Epiafzelequina	H	H	OH
Catequina	Epicatequina	H	OH	OH
Galocatequina	Epigalocatequina	OH	OH	OH
Fisetinidol	Epifisetinidol	H	OH	H
Robinetinidol	Epirobinetinidol	OH	OH	H

Dentre as aplicações de taninos condensados têm-se o emprego para: o curtimento de couro; preservação de rede de pesca; produção de resinas para adesivos de plástico e madeira; indústria de óleo e cerâmica; proteção de metais e madeira; tratamento de águas residuais; produção de embalagens; indústria de alimentos para animais; e impressões 3D. Já os taninos hidrolisáveis têm demonstrado atividade biológica antimutagênica, anticancerígena, anti-inflamatória e antioxidante, o que tem aumentado a pesquisa sobre essa classe (Das et al., 2020).

2.1.3 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

A espécie *S. adstringens* (Figura 2) pode receber diferentes nomes vernaculares como: Barbatimão, Barba-de-timão, Casca-da-virgindade, Faveira e Barbatimão-Branco (Brasil). Ela está distribuída e tem seu habitat localizado no Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Tocantins e Bahia (Scalon et al. 2022).

Essa espécie está presente na floresta amazônica e cerrado brasileiro e pode ser encontrada em formas de árvores com tamanhos que variam de 1,5 a 12 m de altura (Scalon et al., 2022). Suas cascas ricas em compostos tânicos são empregadas popularmente em diversos

casos, destacando-se o seu uso para o tratamento de feridas, problemas ginecológicos e úlceras gástricas (Rebecca et al., 2002).



Figura 2. Exemplar de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Fonte:** João Carlos Palazzo de Mello, 2014.

2.1.3.1 Composição química de *Stryphnodendron adstringens*

A Farmacopeia Brasileira consiste em um compendio farmacêutico oficial do Brasil, em que estão representados os requisitos mínimos de qualidade para insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos para a saúde (Farmacopeia Brasileira, 2019). O uso popular e medicinal do Barbatimão fez com que as autoridades se preocupassem em impor regras para o controle de qualidade dessa planta.

Logo, de acordo com a monografia, a droga vegetal produzida com as cascas caulinares secas de *S. adstringens* deve conter, no mínimo, 8% de taninos totais, expressos em pirogalol ($C_6H_6O_3$; 126,11), dos quais, no mínimo, 0,2 mg/g de droga vegetal equivalem a ácido gálico ($C_7H_6O_5$; 170,12) e 0,3 mg/g correspondem a galocatequina ($C_{15}H_{14}O_7$; 306,27) (Farmacopeia Brasileira, 2019).

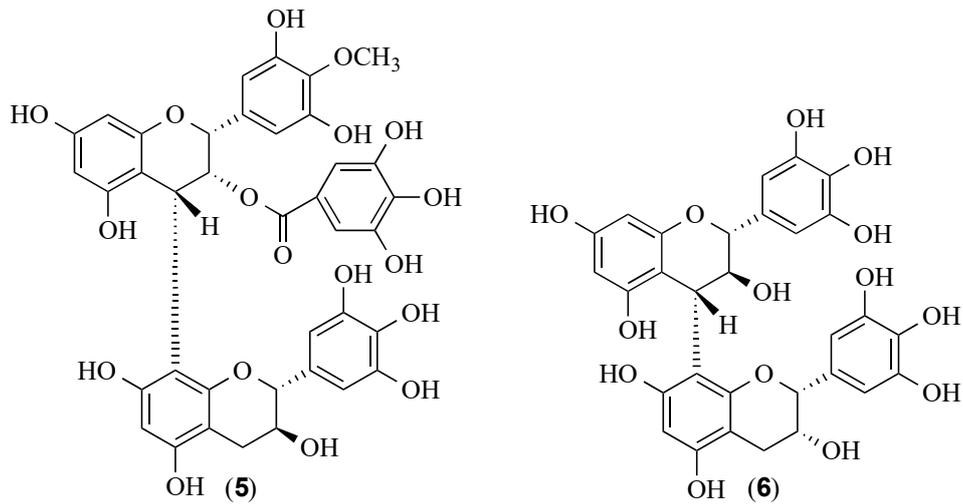
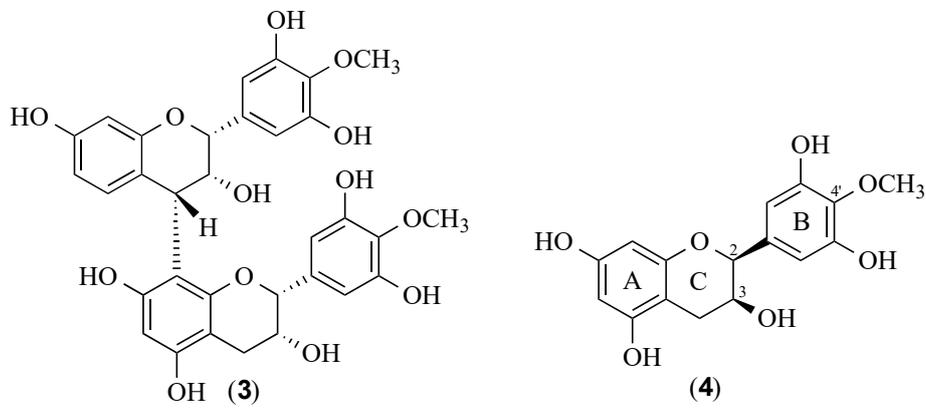
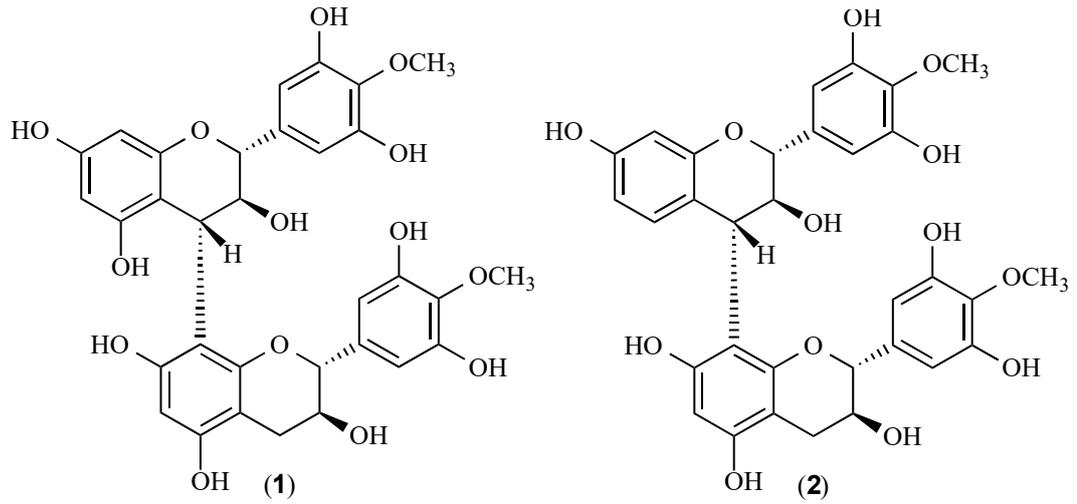
Mello, Petereit e Nahrstedt (1996a e 199b) isolaram, a partir de extrato acetônico: água (7:3, v/v) liofilizado das cascas de *S. adstringens*, flavan-3-óis, prodelfinidinas e prorobinetidinas tendo suas estruturas elucidadas por análise espectroscópica de ressonância magnética nuclear em consonância com espectrometria de massas, polarimetria e dicroísmo circular (Tabela 1).

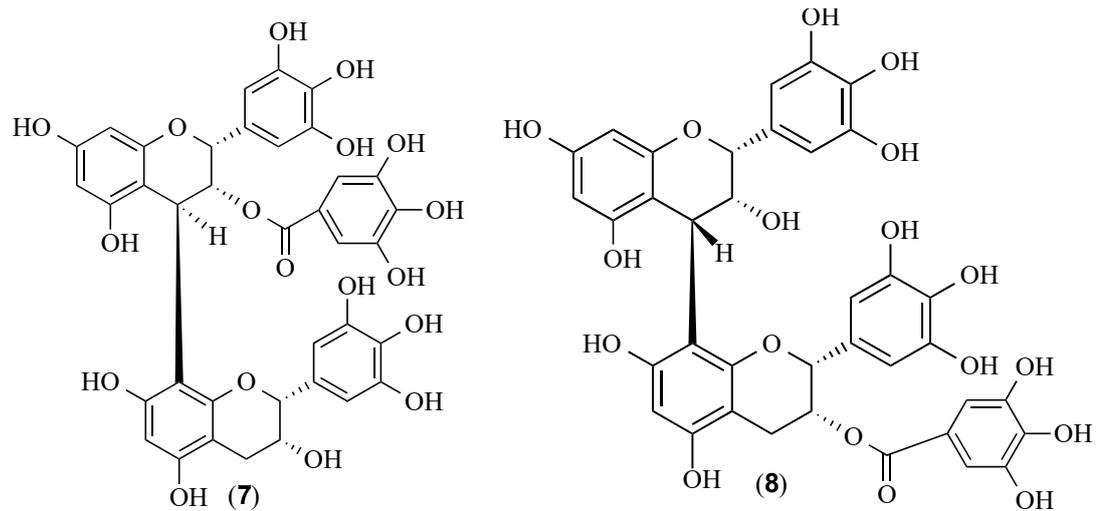
Além disso, a partir da fração acetato de etila do extrato de *S. adstringens*, uma nova prodelfinidina foi identificada e denominada de 4'-*O*-metil-galocatequina-(4 α →8)-4'-*O*-metil-galocatequina (**1**) (Mello, Petereit & Nahrstedt, 1999). Em estudos posteriores, Toledo (2002) isolou e identificou mais duas novas substâncias inéditas, também por análise espectroscópica, sendo elas o 4'-*O*-metil-robinetidinol-(4 α →8)-4'-*O*-metil-galocatequina (**2**) e 4'-*O*-metil-

robinetinidol-(4 α →8)-4'-*O*-metil-epigalocatequina (3). Leite e Mello (2023) isolaram metilados flavan-3-ol inéditos tanto na espécie como na natureza, sendo eles 4'-*O*-metil-*ent*-epigalocatequina (4) e 4'-*O*-metil-epigalocatequina-3-*O*-galato-(4 α →8)-galocatequina (5), bem como dímeros de prodelfinidinas galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina (6) e epigalocatequina-3-*O*-galato-(4 β →8)-epigalocatequina (7). epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato (8).

Tabela 1 Compostos isolados da espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Metabólito	Autor
Galocatequina Epigalocatequina Epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato 4'- <i>O</i> -metil-galocatequina	Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996a Leite e Mello, 2023
4'- <i>O</i> -metil- <i>ent</i> -epigalocatequina	Leite e Mello, 2023
epigalocatequina-3- <i>O</i> -(3,5-dimetil)-galato epigalocatequina-(4 β →8)-galocatequina epigalocatequina-(4 β →6)-epigalocatequina epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> - <i>p</i> -hidroxibenzoato epigalocatequina-3- <i>O</i> - <i>p</i> -hidroxibenzoato galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> - <i>p</i> -hidroxibenzoato	Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996a
epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato-(4 β →8)-epigalocatequina galocatequina-(4 α →8)-epigalocatequina	Leite e Mello, 2023
robinetinidol-(4 β →8)-epigalocatequina robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina robinetinidol-(4 α →6)-epigalocatequina robinetinidol-(4 α →8)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato robinetinidol-(4 α →6)-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato robinetinidol-(4 α →6)-galocatequina robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina robinetinidol-(4 α →8)-galocatequina	Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996b
4'- <i>O</i> -metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'- <i>O</i> -metil-epigalocatequina	Toledo, 2002
4'- <i>O</i> -metil-robinetinidol-(4 α →8)-4'- <i>O</i> -metil-galocatequina	Leite e Mello, 2023; Toledo, 2002
4'- <i>O</i> -metil-galocatequina-(4 α →8)-4'- <i>O</i> -metil-galocatequina	Mello et al., 1999; Leite e Mello, 2023
4'- <i>O</i> -metil-epigalocatequina-3- <i>O</i> -galato-(4 α →8)-galocatequina	Leite e Mello, 2023





2.2 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DE *Stryphnodendron adstringens*

Às espécies do gênero *Stryphnodendron* são atribuídos distintos empregos para diversos fins como úlceras gástricas, cicatrização de feridas, anti-inflamatório, banhos de assento como tratamento ginecológicos alternativo e hemorroida (Lima et al., 2022). O chá preparado a partir de espécies desse gênero é consumido na medicina popular para tratar alterações gastrointestinais e cicatrizar de feridas (Martins; Lima & Rao, 2002).

Estudos demonstraram que as cascas de *S. adstringens* (Figura 3) foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (Trevisan et al., 2020), *Streptococcus mutans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Providencia* spp. (Bersani-Amado et al., 1996; Lima et al., 1998; Toledo, 2002; Audi et al., 1999; Santos, et al., 2009).



Figura 3. Cascas de espécime de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. **Fonte:** a Autora.

A atividade antibacteriana é atribuída aos polifenóis da classe dos taninos presentes na planta, visto que os mesmos possuem a propriedade de inibir enzimas extracelulares e a fosforilação oxidativa. Em virtude do seu poder de complexação com metais, os taninos também estão envolvidos na privação de substratos e ferro, os quais são necessários para a sobrevivência de inúmeros microrganismos patógenos (Scalbert, 1991; Lima et al., 2016).

Outra ação comprovada por estudos *in vitro* foi a atividade antifúngica do gênero, em especial da espécie *S. adstringens*, contra *Cryptococcus neoformans* (Ishida et al., 2009), *Candida albicans* (Ishida et al., 2006; Luiz et al., 2015) e *Candida tropicalis* (Morey et al., 2016). As pesquisas indicam que os taninos condensados podem inibir o crescimento fúngico ao afetar a integridade da parede celular modificando a hidrofobicidade celular, inibir a formação do tubo germinativo e prejudicar o processo de brotamento (Pinto, 2011). A atividade fungicida ou fungistática do *S. adstringens* explica seu uso na lavagem das genitálias femininas, auxiliando em crises de candidíase ao atuar como antisséptico, anti-inflamatório e antifúngico (Toledo, 2002).

Entre as atividades exercidas pelo *S. adstringens*, a mais reconhecida e estudada é a cicatrizante, atuando como anti-inflamatório e antifibrótico (Hernandes et al., 2010; Vieira, Leite-Mello & Mello, 1998). Rós et al. (2020) apresentaram um estudo com ratos Wistar submetidos a fistulotomia seguida de esfínteroplastia primária com ponto em 'U' com poliglactina 911. Os autores empregaram extrato de *S. adstringens* para avaliar o fechamento da fistula, área de afastamento dos cabos musculares, o processo inflamatório e o grau de fibrose. Concluíram que o extrato permitiu menor afastamento entre os cabos musculares, além de proporcionar menor fibrose local, no entanto não encontraram diferença significativa quanto ao processo inflamatório e à fibrose.

De acordo com uma recente revisão, os polifenóis do tipo flavanóis possuem inúmeras atividades, entre elas a anti-inflamatória. Os flavan-3-óis ou flavan-4-óis, como os presentes, na espécie *S. adstringens*, são capazes de afetar a produção de óxido nítrico, fator nuclear kappa-B (NF-κB) e fator de crescimento transformante alfa (TGF-α) (Luo et al., 2022). Em um estudo *in vivo* com camundongos, a (-)-galocatequina-3-galato, (-)-galocatequina e ácido gálico foram capazes de inibir a indução de NO por macrófagos peritoneais ativados pela endotoxina bacteriana LPS. As hidroxilas desses compostos inibiram a ação de NF-κB, cuja ativação se dá pela transcrição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (Lin et al., 1999).

Carvalho e colaboradores (2020) estudaram a atuação do extrato hidroetanólico de *S. adstringens* no papel imunorregulador de macrófagos. Eles utilizaram células da medula óssea de camundongos C57BL6 machos nos ensaios e concluíram que o extrato é capaz de modular

a polarização funcional de macrófagos no perfil M2 e suprimir moléculas coestimuladoras em macrófagos M1. Além disso, foi observado redução nos níveis de óxido nítrico (NO) e interleucina-6 (IL-6), assim como diminuição da expressão intracelular de NO-sintase induzível (iNOS) e aumento da expressão de interleucina-10 (IL-10).

O NO desempenha um papel regulador no processo inflamatório, em que atua regulando o tônus vascular e/ou muscular, além de possuir propriedade pró-inflamatória no endotélio e ativar migração de células para o sítio inflamatório. Apesar do seu papel regulador, quando produzido em excesso essa molécula leva à vasodilatação local, inibição da mitogênese e possíveis danos a tecidos vizinhos da lesão (Guzik; Korbut & Adamek-Guzik, 2003; Carvalho et al., 2020).

Ademais, salienta-se que os macrófagos M2 atuam no processo anti-inflamatório e no reparo tecidual ao aumentarem a produção de fatores como IL-10 e Fator de Crescimento Transformante beta (TGF- β), os quais aumentam a angiogênese e incrementam a produção de colágeno pelos fibroblastos (Röszer, 2015; Zhu et al., 2017).

2.3 CULTURA DE CÉLULAS

A cultura de células *in vitro* refere-se ao cultivo de células fora de seu ambiente natural, como um organismo vivo, em condições controladas dentro de um ambiente laboratorial. Esse cultivo é realizado em recipientes especializados, como frascos de cultura, placas de Petri ou biorreatores, onde as células podem ser mantidas e proliferar em um meio de cultura específico, sob condições controladas, incluindo temperatura, umidade e concentração de CO₂. O propósito desse tipo de cultivo é estudar o comportamento, a fisiologia e as respostas celulares, permitindo a realização de experimentos para compreender diversos aspectos biológicos, como a influência de fatores externos, resposta a estímulos específicos, diferenciação celular, e reações a agentes patogênicos, fármacos ou substâncias químicas (Sereia, 2019; Melo et al., 2021).

A cultura de células primária é um modelo pré-clínico no qual são utilizadas células derivadas de pacientes. Nesse contexto, destaca-se a vantagem da heterogeneidade das linhagens celulares primárias, que proporcionam uma maior similaridade com os processos fisiológicos humanos e resultados mais representativos, mimetizando condições observadas *in vivo*, como diferenciação celular, resposta a estímulos e interações celulares (Neves, Wilgus, & Bayat, 2023).

Outra vantagem é a menor propensão à mutação ou transformação, que são mais comuns em linhagens imortalizadas, embora apresentem senescência. Esse fenômeno limita a capacidade proliferativa fora do corpo, assim como a variação entre os doadores (idade,

patologias e gênero), resultando em experimentos com resultados distintos. Para este tipo de cultura o pesquisador deve submeter-se a comitês de ética para a coleta de tecidos, sejam de seres humanos ou animais de laboratório (Sato, Shay, & Minna, 2020).

Já as linhagens celulares imortalizadas são empregadas como um instrumento científico importante para as pesquisas, sobretudo na área da saúde, cuja finalidade principal é testar novas drogas, além de pesquisar alvos terapêuticos ao estudar possíveis mecanismos moleculares e celulares (Sereia, 2019). Ao serem imortalizadas, sua capacidade proliferativa é estendida, requerendo meios de cultura menos específicos. A variabilidade entre os experimentos é mínima, uma vez que são geneticamente homogêneas, proporcionando resultados mais semelhantes entre si. No entanto, são mais suscetíveis a alterações genéticas ao longo do tempo, devido ao grande número de repiques (Sato, Shay, & Minna, 2020). Dentre os tipos celulares imortalizados disponíveis, a linhagem de fibroblastos L-929 destaca-se como a mais utilizada em estudos para cicatrização.

2.3.1 A linhagem celular clone L-929

As células L-929 (Figura 4) são subclones 929 da cepa L (ATCC® CCL1™), derivadas em 1948 do tecido aureolar subcutâneo e adiposo de camundongo macho C3H/Na de 100 dias. Essa linhagem imortalizada (comercial) é amplamente empregada em pesquisas biomédicas, notadamente em estudos relacionados à citotoxicidade, proliferação celular, inflamação e avaliação dos efeitos de substâncias em células do tecido conjuntivo. Sua capacidade de adesão, rápida proliferação e formação de monocamada tornam-na valiosa para experimentos *in vitro*, oferecendo uma resposta consistente a diversos estímulos (<https://www.atcc.org/products/ccl-1>, acesso em 11/12/2023).

Logo, é fisiologicamente representativa, o que permite o estudo de efeitos fisiológicos e patológicos que respondam a distintos estímulos, tanto de maneira isolada quanto em cocultivo com outros tipos celulares, como macrófagos e células musculares lisas (Al Kayal et al., 2021; Marciag et al., 1981; Sivaraman et al., 2022; Yousefi et al., 2017). No século XIX acreditava-se que os fibroblastos eram um tipo celular definido e com características únicas, contudo pesquisas têm demonstrado que de acordo com a origem de desenvolvimento, localização anatômica e função eles apresentarão diferenças, exercendo um papel multifacetado na manutenção da homeostase corporal e em processos patológicos (Davidson et al., 2021).

Após a evolução temporal da definição do termo ‘fibroblasto’, tem-se atualmente que essa linhagem são células mesenquimais estromais, as quais desempenham um papel crucial na manutenção e reparo dos tecidos, que expressam genes que codificam a cadeia alfa I do

colágeno I (*Colla1*) e alguns marcadores como, o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) o PDGFR- α , CD90 (Thy-1) (Wei, Nguyen, & Brenner, 2021), proteína específica de fibroblasto – 1 (FSP-1/S100A4) (Li et al., 2020).

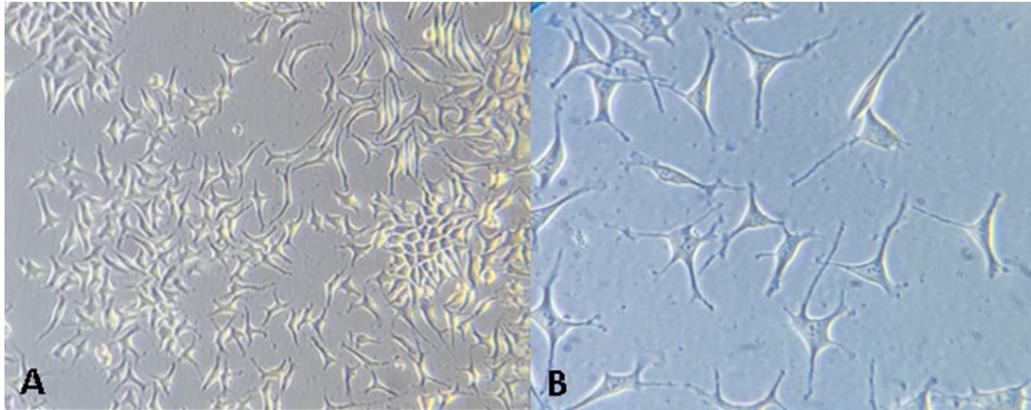


Figura 4. Células L-929 em cultura aderente. A: aumento de 100x; B: aumento de 400x. **Fonte:** a Autora.

Por ser a principal célula constitutiva da camada da derme, essas células desempenham funções importantes como produção de matriz extracelular (MEC), em que auxilia na homeostase e integridade dos tecidos, manutenção da integridade estrutural dos tecidos conjuntivos ao produzirem elastina e colágeno, auxiliando no processo de reparação tecidual (Zhao, et al., 2017). Além disso, também são células produtoras de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas que modulam os processos inflamatórios e cicatriciais, sendo estes capazes de transformar os mesmos em miofibroblastos ou fibroblastos/pericitos perivasculars, por exemplo (Davidson et al., 2021; Roulis & Flavell, 2016).

Driskell et al. (2013) explicam que o processo de reparo tecidual em um adulto não se limita à uma linhagem apenas, mas há mais linhagens celulares, e os fibroblastos podem ser fibroblastos dérmico papilar, fibroblasto reticular, fibroblasto hipodérmico, os quais são recrutados na fase de remodelação do processo de cicatrização. Outrossim, as disparidades entre os fibroblastos não ocorrem somente entre tecidos diferentes, mas também em um mesmo tecido de um único órgão, como exemplo tem-se o tecido epitelial intestinal, no qual os fibroblastos expressam distintos genes de sinalização celular. Os resultados publicados foram de fibroblastos obtidos de cultura de células primária, ou seja, uma cultura de tecidos retirado de um adulto humano do gênero masculino, o que contribuiu para a observação das distintas linhagens.

Em resumo, a escolha entre células primárias e linhagens celulares imortalizadas depende dos objetivos específicos de cada experimento, considerando as características únicas e as limitações associadas a cada sistema de cultura celular.

2.4 CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de feridas está dividida em quatro fases: hemostasia; fase inflamatória; fase proliferativa e remodelação (Figura 5 e Quadro 2). Na primeira etapa tem-se o organismo acionando os mecanismos de hemostasia primária e secundária - vasoconstrição, segregação plaquetária, migração leucocitária e de agentes hemostáticos (Bowers & Franco, 2020).

Quando o sistema se encontra hemostático, inicia-se a atração quimiotática de neutrófilos e macrófagos em conjunto com o processo de fagocitose para remoção de corpos estranhos (secreções, patógenos). Além das células recrutadas, há também diversas enzimas e fatores de crescimento atuando. Na penúltima etapa o reparo tecidual é iniciado com a ativação e proliferação de fibroblastos, reorganização das fibras de colágeno, reações de neovascularização, formação de tecido de granulação e re-epitelização (Zubair & Ahmad, 2019).

Quadro 2 Etapas da cicatrização. Adaptado de: Bowers e Franco (2020).

Dia	Estágio	Fisiopatologia	Desfechos
Dia	Hemostasia/ coagulação	Coagulação e vasoconstrição	Estancamento do sangramento
0 – 3	Inflamação	Liberção de citocinas e fatores de crescimento; vasodilatação; fagocitose; neutrofilia com liberação de ROS e proteases	Eritema, edema, calor e dor.
1 – 25	Proliferação	Síntese de colágeno (tipo III), formação de granulação, epitelização, angiogênese, contração	Angiogênese, fechamento da ferida
20 - 365	Maturação/ remodelamento	Remodelação da cicatriz (colágeno do tipo III para tipo I).	Resistência da cicatriz aumenta em aprox. 80% do tecido original.

Na fase de proliferação o plasma rico em plaquetas (PDGF, TGF- β , Fator de Crescimento epidérmico (EGF), Fator de Crescimento semelhante à insulina (IGF)) fornece o ambiente ideal para o crescimento e expansão de células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células-tronco epidérmicas, as quais irão originar o tecido de granulação imaturo (Reinke & Sorg, 2012). A quarta fase envolve o aumento da resistência à tensão da ferida e remodelagem da matriz extracelular (Zubair & Ahamad, 2019).

No início da cicatrização os Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) são produzidos e liberados para recrutar células ao local da injúria tecidual, sendo elas as primeiras moléculas sinalizadoras para prevenir infecção no tecido afetado. A necrose e apoptose celular liberam fatores e moléculas quimiotáticas que também auxiliam na ativação do sistema imunológico. Estudos indicam que um prolongamento da fase inflamatória com maior tempo de atuação dessas células, citocinas e fatores de crescimento, dá origem a tecidos fibróticos, os

quais podem acarretar neoplasias (órgãos) e cicatrizes hipertróficas (pele) (Ayadi, Jay, & Prasai, 2020).

As feridas podem ser classificadas em agudas ou crônicas. Cicatrizações de até três meses são características de feridas agudas, já os tecidos cuja cicatrização perdura além desse período tem seus ferimentos classificados como crônicos. Patologias que causam isquemia, condições de imunossupressão ou casos de neoplasias retardam o processo de cicatrização (Lai et al., 2004). Em fraturas ósseas o aporte de oxigênio é de suma importância, assim como nutrientes e minerais, sendo assim a angiogênese é prejudicada, por exemplo, em pacientes diabéticos pela redução da expressão de fatores de crescimento como o VEGF, PDGF e TGF- β (Zubair & Ahamad, 2019).

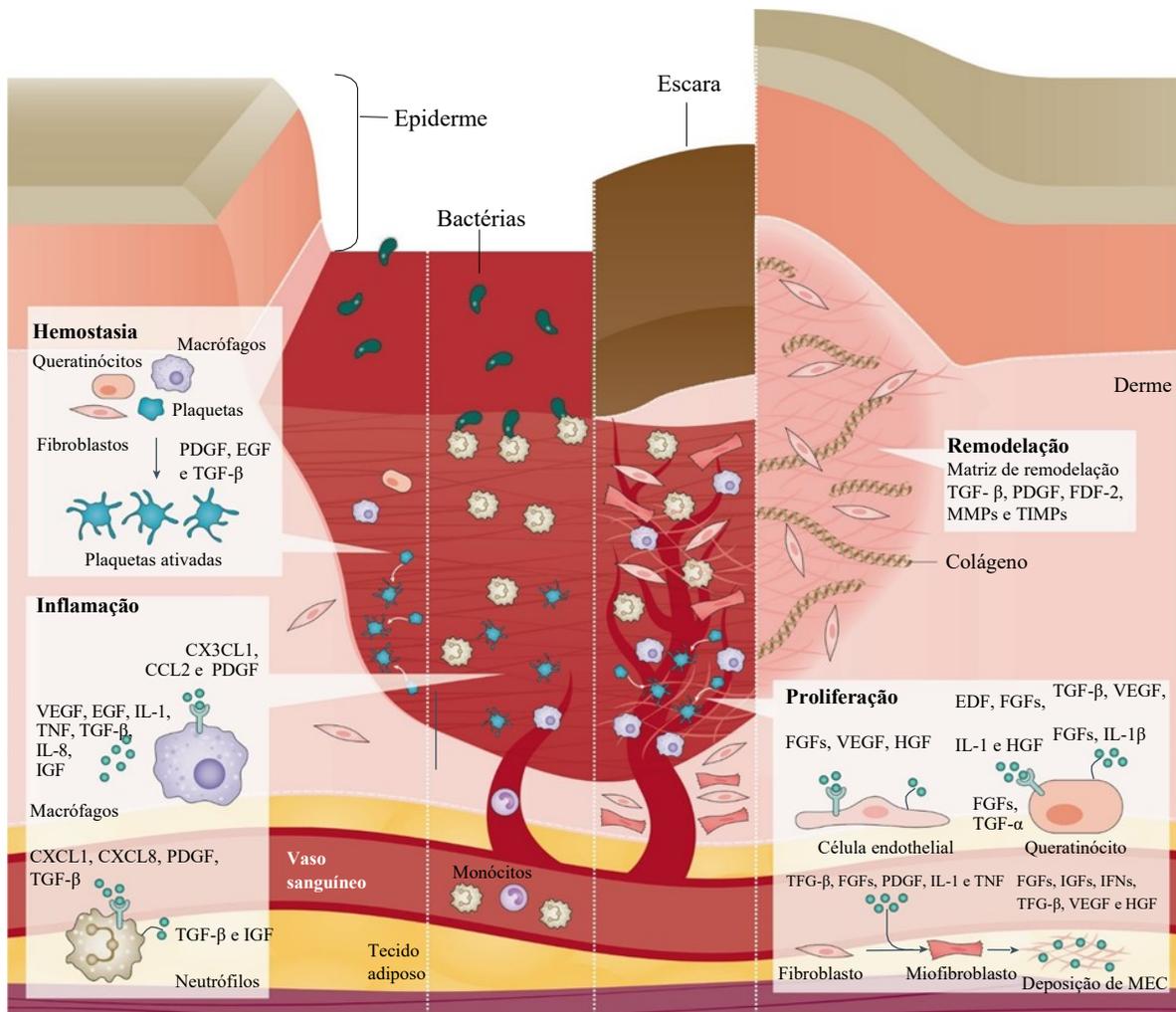


Figura 5. Fases do reparo tecidual natural. A primeira etapa é representada pela hemostasia com vasoconstrição, ativação de plaquetas e agregação plaquetária. A segunda etapa consiste na etapa de inflamação que se inicia em 24 horas após a lesão e com duração variável. Na terceira etapa ocorre a proliferação celular, produção de matriz extracelular (MEC). Na fase final, a remodelação se inicia e a duração depende de atividade das citocinas, tamanho da lesão, grau de nutrição do paciente e eventuais comorbidades. PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas; EGF: fator de crescimento epidérmico; TGF- β : fator de crescimento transformador; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IGF: fator de crescimento semelhante à insulina; VEGF: fator de crescimento endotelial. HGF: fator de crescimento de hepatócitos. CX3CL: ligante de quimiocina; CCL2: ligante de quimiocina 2. **Fonte:** Jeschke et al. 2022.

O processo de cicatrização está intrinsicamente ligado à qualquer patologia que o indivíduo possa manifestar ou adquirir, sendo que as principais são: diabetes *mellitus*, insuficiência vascular, infecções locais ou sistêmicas, obesidade (resistência à insulina), desnutrição, doenças do tecido conjuntivo (como síndrome de Ehlers-Danlos e esclerodermia), doenças autoimunes (inflamação crônica), câncer (a radioterapia e a quimioterapia podem inibir a divisão celular consequentemente a regeneração do tecido lesionado), tabagismo (interferente na oxigenação dos tecidos), além do próprio processo de envelhecimento celular (Falanga et al. 2022).

3 OBJETIVOS

2.5 OBJETIVO GERAL

Investigar a viabilidade celular em células L-929 tratadas com extrato bruto hidroacetônico, fração acetato de etila e fração aquosa de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, a fim de obter a concentração adequada para avaliar a atividade cicatrizante *in vitro* da espécie.

2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir do extrato bruto (EB) e frações semipurificadas de *S. adstringens*, sendo elas fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ);

Realizar o controle de qualidade da droga vegetal, extrato e fração acetato de etila;

Analisar o perfil fitoquímico da espécie *S. adstringens* através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-IES-QToF-EM/EM) e comparar com os dados disponíveis na literatura.

Avaliar a capacidade proliferativa celular de EB, FAE e FAQ em células fibroblásticas (linhagem L-929) por meio de ensaio de viabilidade celular *in vitro* com o reagente MTT;

Avaliar a capacidade de cicatrização e fechamento de ferida por meio do ensaio de migração celular *in vitro* com células L-929 empregando distintas concentrações de EB, FAE e FAQ.

3 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria-prima vegetal

As cascas de *S. adstringens* foram coletadas na cidade de São Jerônimo da Serra, no estado do Paraná, Brasil (S23° 43' 7,8"; W50° 45' 23,5"; 926 m de altitude) em março de 2008. A excisata do material vegetal coletado foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá, sob o número HUEM-14321, e identificada pela Dra. Cássia Mônica Sakuragui da Universidade Federal do Rio de Janeiro. O material vegetal foi seco a temperatura ambiente e posteriormente cominuído em moinho de martelos (Tigre ASN-6) (COSTA, et al. 2018). O acesso ao material vegetal está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen sob número A06ADCB.

4.1.2 Solventes, reagentes e soluções

Todos os reagentes, exceto quando especificado, possuíam grau de pureza pró análise (PA).

Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (Invitrogen - Thermo Fisher Scientific);

4'-*O*-metil-galocatequina (padrão interno);

4'-*O*-metil-epigalocatequina (padrão interno);

Acetato de etila (Synth[®], 100%);

Acetona (Synth[®], 100%);

Acetonitrila (PanReac AppliChem, ≥ 99,9% UHPLC);

Ácido Fórmico (J.T. Baker Neutrasorb[®], 89,8%);

Ácido gálico (padrão interno);

Água destilada;

Água ultra-pura;

Álcool etílico (Synth[®], 100%);

Álcool metílico (Synth[®], 100%);

Antimicrobiano liofilizado (Gibco[®] - penicilina 10,000 UI/mL, estreptomicina 10,000 µg/mL, e Anfotericina B - 25 µg/mL);

Azul de Tripán (Gibco[®] Trypan blue stain 0,4%);

Bicarbonato de sódio (Synth[®]);

Carbonato de sódio anidro (Fmaia, 99,5%);
Coluna Phenomenex® Gemini C-18 de 250 mm x 4,5 mm empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (5 µm);
Dimetilsulfóxido (Synth®);
Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco™ - DMEM);
Filtro para seringa Chromafil EM Ester de celulose (CHROMAFIL®Xtra, MV-20/25 0,20 µm, diam. 25 mm);
Frascos de cultivo T-25 (*Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks* – Thermo Fisher®);
Frascos de cultivo T-75 (*Nunc™ EasYFlask™ Cell Culture Flasks* – Thermo Fisher®);
Fibroblastos da linhagem celular clone L-929 (ATCC® CCL1™);
Galocatequina (padrão interno);
Epigalocatequina (padrão interno);
Epigalocatequina-3-*O*-galato (padrão interno);
Pipeta sorológica graduada com filtro estéril 5 mL;
Pipeta sorológica graduada com filtro estéril 10 mL;
Pipeta sorológica graduada com filtro estéril 25 mL;
Pirogalol (Sigma-Aldrich®, ≥ 98% HPLC);
Pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano;
Reagente Folin Ciocalteu 2N (Dinâmica ®);
Solução de cloreto férrico 1,0% (p/v);
Solução de gelatina 2,5% (p/v; gelatina em pó, Synth®);
Solução de hipoclorito de sódio 5% (p/v);
Solução salina de tampão fosfato (PBS) (tampão produzido em laboratório);
Soro Fetal Bovino (Gibco®);
Sulfato de sódio anidro (Synth®)

4.1.3 Equipamentos

Autoclave vertical (Primatec, linha CSA sem pedal);
Axiocam 105 color (ZEISS);
Balança analítica (Shimadzu AUW220D);
Balança determinadora de umidade por infravermelho (OHAUS MB35);
Banho-maria;
Capela de Biossegurança nível II (Airstream® Class II Biological Safety Cabinet);
Centrífuga (Daiki DT-4500);

Cromatógrafo (UHPLC, Ultimate 3000 Thermo Scientific);
Cromatógrafo (UHPLC, Shimadzu, modelo Nexera X2);
Dessecador;
Destilador de água (Milli-Q®);
Espectrômetro de massas (Bruker Daltonics®, modelo Impact II™);
Estufa de secagem com circulação para convecção natural (Ethik technology, 220V);
Estufa incubadora de CO₂ (Panasonic CO₂ incubator, COM-18ACL-PA);
Evaporador rotatório (Büchi R-114 capacidade 2 L);
Freezer -20 °C (Consul);
Freezer -80 °C (Panasonic®, MDF-U56VC-PA);
Leitora de microplacas (Agilent BioTek®, Epoch | 2);
Liofilizador (CHRIST, alpha 1-2 LCSbasic);
Microscópio invertido (Carl Zeiss microscopy Primo Vert);
Moinho de martelos (TIGRE ASN-6);
pHmetro (BEL Engineering, PHSW3B);
Sistema de água ultrapura (Milli-Q Milipore);
Ultra-som (Transsonic T460, 35 kHz);
Ultra-turrax (UTC115KT ou T-25);
Vortex (Phoenix, AP56).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo e caracterização da matéria-prima vegetal

4.2.1.1 Preparo do extrato bruto

De acordo com Costa et al. (2010), um extrato hidroacetônico foi preparado empregando a técnica de turbólise. As cascas, cominuídas, foram misturadas com acetona e água na proporção 7:3 (v/v) e submetidas à turbólise usando Ultra-turrax® (UTC115KT). O tempo total de extração foi de 20 min, com agitação intermitente (5 min de agitação e 5 min de intervalo - até completar os 20 min totais de agitação). A pausa durante a agitação é realizada para que o sistema não aqueça e não haja degradação da amostra.

Após a agitação, o extrato foi filtrado com auxílio de um sistema à pressão reduzida, sendo realizadas trocas do sistema de filtração com papel filtro e algodão (filtração de superfície e profundidade, respectivamente). O extrato filtrado foi colocado no evaporador rotatório a 45 °C sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico. Por último, o extrato sem

solvente foi congelado em nitrogênio líquido e liofilizado durante 24 h. Após a liofilização o extrato bruto foi armazenado em freezer a -20 °C.

4.2.1.2 Preparo da fração acetato de etila e aquosa

De acordo com Costa et al. (2010), foram pesados 50,0152 g do EB liofilizado, solubilizando-o em 500 mL de água destilada. Em seguida, foi realizado uma partição líquido/líquido com 500 mL de acetato de etila, por 12 vezes, em funil de separação. As fases de acetato de etila foram reunidas e colocadas no evaporador rotatório a 45 °C sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico. As fases aquosas também foram reunidas e submetidas à rotaevaporação sob pressão reduzida para eliminação do solvente orgânico. As frações foram congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas durante 24 h. Após a liofilização as frações foram pesadas e armazenadas em freezer (- 20 °C).

4.2.2 Análise qualitativa

As análises qualitativas seguiram as recomendações da Farmacopeia Brasileira (2019), para isso, uma solução extrativa a 2,5% (p/v) foi preparada sob refluxo. Foram pesados 1,25 g de droga vegetal e colocada em 50 mL de água, já previamente acondicionada em balão de fundo redondo de boca esmerilhada. O balão então foi colocado em uma manta térmica sob refluxo durante 15 min, contados a partir do momento de início de fervura. Após, esperou-se a solução esfriar e a mesma foi filtrada empregando-se algodão e papel filtro e o volume final foi ajustado.

4.2.2.1 Reação para taninos com o reagente cloreto férrico (FeCl₃)

Em um tubo de ensaio, foi adicionado 1,0 mL da solução extrativa, seguido pela adição de 2 gotas de solução FeCl₃ a 1,0% (p/v). Foi observada a formação de coloração verde (indicando taninos condensados) ou azul (indicando taninos hidrolisáveis). Para a preparação da solução de FeCl₃ a 1% (p/v), 156,63 mg de FeCl₃ foram pesados e dissolvidos em 15,63 mL de metanol.

4.2.2.2 Reação para taninos com gelatina

Em um tubo de ensaio foi adicionado 1,0 mL da solução extrativa, seguido da adição de 5 gotas da solução de gelatina preparada a 2,5% (p/v). A formação de precipitado esbranquiçado indica positivo para a presença de taninos.

4.2.2.3 Reação de Stiasny – taninos hidrolisáveis - condensados

A reação de Stiasny consiste em duas etapas, a primeira para verificar a presença de taninos condensados e a segunda para taninos hidrolisáveis. Primeiramente, 50,0 mL da solução extrativa e 15 mL do reativo de Stiasny (5 mL de HCl concentrado e 10 mL de formaldeído sob refluxo durante 20 min) foram submetidos à extração por refluxo durante 30 min. Os taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafenos). Na segunda parte da técnica, foi necessário filtrar a solução que foi submetida à refluxo com o reativo de Stiasny. Após a filtração, foram adicionados ao líquido filtrado, transparente, 5 g de acetato de sódio e homogeneizado até dissolver completamente. Depois de homogeneizado foram adicionadas 4 gotas de cloreto férrico a 1,0% (p/v). A formação de um anel de coloração azulada indica positivo para a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.3 Análise quantitativa

4.2.3.1 Análise do teor de polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais foi realizada com o reagente de Folin-Ciocalteu, seguindo os procedimentos de Blainski, Lopes e Mello (2013) com algumas modificações.

4.2.3.1.1 Preparação da solução padrão para curva de calibração

Para obter uma solução estoque de 0,5 mg/mL, foi adicionado 1,0 mg do padrão pirogalol e 2,0 mL de água destilada a um balão volumétrico de 5 mL. Alíquotas de 100,0; 75,0; 50,0; 35,0; 20,0 e 15,0 μ L foram transferidas da solução estoque para balões de 1,0 mL e completados com água destilada. Após a primeira diluição, foram alíquotados 200 μ L de cada concentração e adicionados a um balão de 1,0 mL, ao qual foram adicionados 400 μ L de água previamente. Em seguida, foram adicionados 40 μ L do reagente de Folin-Ciocalteu 2N e ajustou-se o menisco do balão com a solução de carbonato de sódio anidro (Na_2CO_3) a 10,15% (p/v).

Após a última diluição, 200 μ L de cada concentração foram transferidos para cada poço da microplaca em triplicata, aguardado os 30 min após a adição da solução de Na_2CO_3 para a determinação da absorvância à 760 nm no leitor de microplacas ELISA. O intervalo de 1,5-10 μ g/mL foi usado para obter a curva de calibração do pirogalol e todas as etapas foram conduzidas ao abrigo da luz direta.

4.2.3.1.2 Preparação da solução amostra de EB e FAE

Para obter uma solução estoque (1) de 0,4 mg/mL, foram adicionados 2,5 mg de extrato bruto a um balão volumétrico e 5,0 mL de água destilada. Uma alíquota de 75,0 µL foi transferida da solução estoque (1) para um balão de 1,0 mL e completado com água destilada (solução estoque 2). Após a primeira diluição, 200 µL foram aliquoteados e adicionados a um balão de 1,0 mL, ao qual foram adicionados 400 µL de água previamente. Em seguida, adicionaram-se 40 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 2 N e 360 µL de solução de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃) a 10,15% (p/v).

Após a última diluição, 200 µL de cada solução estoque foram transferidos para cada poço da microplaca, aguardando 30 min, a partir da adição da solução de Na₂CO₃, para a determinação da absorvância à 760 nm no leitor de microplacas ELISA. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz direta, e o ensaio foi realizado em triplicata. O TP do EB, FAE e FAQ foram expressos em miligramas equivalentes de pirogalol por grama de EB e FAE (mg pirogalol/g EB/FAE).

4.2.3.2 Determinação de teor de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi aplicada a metodologia descrita no Volume II da sexta edição da Farmacopeia Brasileira (2019), com adaptação no uso de ácido fórmico como acidificante das fases móveis. O método emprega a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando ácido gálico e galocatequina como padrões. Uma pré-coluna empacotada com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano foi conectada à coluna cromatográfica principal (Phenomenex® Gemini C-18; 250x4,6 mm; 5 µm) no cromatógrafo (Ultimate 3000 Thermo Scientific HPLC e UHPLC).

A vazão da fase móvel foi estabelecida em 0,8 mL/min. A eluição foi majoritariamente por gradiente linear (Tabela 2) e, dois eluentes foram preparados, sendo denominados de eluentes A (água) e B (acetonitrila) acidificados com ácido fórmico a 0,05% (v/v). Eluições foram realizadas antes da injeção das amostras para condicionar a coluna, a fim de equilibrar a fase móvel e a fase estacionária. Após o término das eluições amostrais a coluna cromatográfica foi limpa realizando uma eluição com acetonitrila e água (95:5, v/v) para ser armazenada.

Alíquotas de 20 µL da solução padrão e da solução amostra foram injetadas separadamente. Os cromatogramas foram registrados e as áreas sob os picos mensuradas à 210 nm. Os tempos de retenção relativos para o ácido gálico e a galocatequina foram de 10,375 min e 12,7915 min, respectivamente.

Tabela 2 Eluição dos solventes da metodologia aplicada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência.

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

De acordo com a monografia da espécie *S. adstringens*, disposta na Farmacopeia Brasileira (2019), a droga vegetal deve conter no mínimo 8,0% de taninos totais, expressos em pirogalol ($C_6H_6O_3$; 126,11u), dos quais, no mínimo, 0,2 mg/g equivalem a ácido gálico ($C_7H_6O_5$; 170,12 u) e 0,3 mg/g correspondem à galocatequina ($C_{15}H_{14}O_7$; 306,27 u), em relação à droga seca.

4.2.3.2.1 Preparo da solução amostra a partir da droga vegetal

A solução foi preparada utilizando o método de extração por turbólise. Para isso, foram pesados 10,017 g de droga vegetal, a qual foi colocada em 90 mL de mistura acetona e água (7:3, v/v) e levada ao Ultra-turrax (UTC115KT ou T-25) por 15 min, com intervalos de 5 min para que a temperatura não ultrapassasse 40 °C.

O extrato resultante foi filtrado com auxílio de algodão e sistema sob pressão reduzida. Para remover a acetona, o filtrado foi rotaevaporado sob pressão reduzida a 45 °C. A fração acetato de etila foi obtida a partir desse extrato líquido, utilizando três porções de 20 mL de acetato de etila em funil de separação (125,0 mL). O sistema foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 15 min para completa separação das fases.

As fases orgânicas foram combinadas e filtradas em papel de filtro com 5,0 g de sulfato de sódio anidro sob pressão reduzida. O filtrado resultante foi rotaevaporado sob pressão reduzida até obter um resíduo, o qual foi ressuspensão em 5,0 mL da mistura álcool metílico e água (2:8, v/v) e submetido a uma extração em um cartucho de extração em fase sólida, empacotado com sílica quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (55 mm, 70 Å).

O cartucho foi previamente condicionado com 10,0 mL da mistura de álcool metílico e água (2:8, v/v). Em seguida, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100,0 mL e completado com a mistura álcool metílico e água (2:8, v/v). Volumetricamente, 5,0 mL do balão de 100,0 mL foram transferidos para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando o

volume com a mistura álcool metílico e água (1:1, v/v). Essa última solução foi filtrada através de uma membrana filtrante de 0,45 µm.

4.2.3.2.2 Preparo das soluções padrões para a curva de calibração

Foi pesado 1,0 mg de galocatequina e dissolvido em mistura de álcool metílico e água (1:1), para obter uma solução estoque (SM1) com concentração de 0,152 mg/mL. Para o segundo padrão exigido pela Farmacopeia Brasileira, foi pesado a 1,0 mg de ácido gálico e dissolvido em mistura de álcool metílico e água (1:1, v/v), para obter uma solução estoque (SM1) com concentração de 0,100 mg/mL. Foram pesadas três amostras de ambos padrões para o preparo de cinco concentrações diluídas em série.

4.2.3.2.3 Diluição das soluções padrão para curva analítica

Para o padrão galocatequina foram estabelecidas as concentrações de 1,14, 2,28, 4,56, 9,12 e 18,24 µg/mL, e a fim de obtê-las, uma alíquota de 600 µL da SM1 foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL completando-o com a mistura álcool metílico e água (1:1, v/v) e obtendo-se a SM2. Para o padrão ácido gálico foram estabelecidas as concentrações 2,00, 4,00, 8,00, 14,00 e 16,00 µg/mL, e a fim de obtê-las, uma alíquota de 800 µL da SM1 foi transferida em balão volumétrico de 5 mL, com a mistura álcool metílico e água (1:1, v/v) e obtendo-se a SM2. Os valores para as diluições de cada padrão para cada concentração estão expostos na Tabela 3.

Tabela 3. Diluições para os padrões de galocatequina e ácido gálico em tubo eppendorf em 1 mL.

Concentração (µg/mL)	Galocatequina		Concentração (µg/ mL)	Ácido Gálico	
	SM2 (µL)	MeOH:H ₂ O (1:1) (µL)		SM2 (µL)	MeOH:H ₂ O (1:1) (µL)
1,14	62,5	937,5	2,00	125	875
2,28	125	875	4,00	250	750
4,56	250	750	8,00	500	500
9,12	500	500	14,00	875	125
18,24	1000	-	16,00	1000	-

4.2.3.2.4 Cálculo para determinação do teor de galocatequina e ácido gálico

Foi utilizado a seguinte fórmula para calcular o teor em mg/g:

$$T = \frac{C \times 500}{m_a \times 1000}$$

em que,

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

C = concentração de ácido gálico ou de galocatequina em $\mu\text{g/mL}$ em SM2, determinada a partir das equações das retas obtidas, considerando a pureza da substância de referência;

500 = fator de diluição;

1000 = valor de conversão de μg para mg;

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

4.2.4 Análise do conteúdo fitoquímico por meio de cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado ao espectrômetro de massas (CLAE-IES-QToF-EM/EM)

A metodologia disposta no volume II da sexta edição da Farmacopeia Brasileira (2019) foi aplicada, com adaptação no uso de ácido fórmico como acidificante das fases móveis, fluxo e volume de injeção. Foi empregado para a análise um sistema de separação cromatográfica do tipo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (UHPLC, Shimadzu, modelo Nexera X2) com injetor automático, uma coluna cromatográfica (Phenomenex® Gemini C-18; 250x4,6 mm; 5 μm), e acoplada ao espectrômetro de massas de alta resolução (Bruker, modelo Impact II) de alta resolução (AR) com analisador do tipo quadrupolo (Q) acoplado com tempo de voo (ToF) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (IES). As amostras foram analisadas em uma faixa de m/z 100 a 1000 u .

Os padrões foram analisados por injeção direta apenas no espectrômetro de massas para confirmação e, a amostra da FAE foi injetada no cromatógrafo para ser analisada no espectrômetro de massas. O fluxo da fase móvel foi estabelecido em 0,3 mL/min. A eluição foi majoritariamente por gradiente linear (Tabela 4) e foram preparados dois eluentes.

Tabela 4. Eluição dos solventes da metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas

Tempo (minutos)	Eluente (A) (%)	Eluente (B) (%)	Eluição
0 – 10	95 → 80,7	5 → 19,3	Gradiente linear
10 – 13,5	80,7 → 75	19,3 → 25	Gradiente linear
13,5 – 25	75 → 62	25 → 38	Gradiente linear
25 – 32	62 → 25	38 → 75	Gradiente linear
32 – 40	25 → 90	75 → 10	Gradiente linear
40 – 45	90	10	Isocrática

O eluente A consistiu de água acidificada com ácido fórmico a 0,05% (v/v) e o eluente B de acetonitrila, também acidificada com ácido fórmico a 0,05% (v/v). Antes da injeção das amostras e após o término foram feitas corridas para limpeza da coluna cromatográfica com acetonitrila e água (90:10, v/v), assim como um condicionamento da coluna com as fases móveis antes do início da sequência de corridas. Foram injetados, separadamente, 3 µL da amostra FAE, a qual foi preparada de acordo com o item 4.2.3.2.1.

4.2.5 Ensaio de viabilidade celular

4.2.5.1 Reativação das células congeladas

Os fibroblastos foram descongelados e colocados em meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos estreptomicina (10.000 µg/mL), anfotericina B (25 µg/mL) e penicilina (10.000 UI/mL).

O meio de cultivo foi preparado com 20% de SFB e 80% de DMEM. Para adição dos antibióticos foi retirado 1% do meio e adicionado 1% da mistura de antimicrobianos (ATM) previamente preparada com estreptomicina, penicilina e anfotericina B. Para o preparo da garrafa foram adicionados 9,0 mL do meio de cultivo, 1,0 mL de SFB e 1,0 mL do concentrado de células congeladas.

O conteúdo da garrafa foi homogeneizado com movimentos sutis. A garrafa foi incubada a 37,5 °C em estufa úmida com 5,0% de CO₂. As células foram mantidas nessas condições por tempo suficiente até sua ativação, sendo a troca de meio e lavagem com PBS (tampão fosfato-salino) para retirada de *debris* e células mortas a cada dois dias até o preenchimento da monocamada.

4.2.5.2 Passagem das células

O meio de cultivo foi retirado e adicionado 4 mL de PBS, agitando levemente o mesmo de forma a lavar quaisquer *debris* celulares. Com o auxílio de uma pipeta pasteur de vidro o PBS com os restos celulares foi retirado da garrafa. Então foram adicionados 2 mL de tripsina, homogeneizada de forma a cobrir toda a monocamada e esperado o tempo suficiente para descolamento das células do fundo da garrafa (não deixando ultrapassar 15 min). Após esse tempo a tripsina foi inativada adicionando-se 6 mL de meio de cultivo com SFB e ATM. Na garrafa nova foram colocados 10 mL de meio e então adicionado a quantidade desejada do pool de células.

4.2.5.3 Plaqueamento das células

Para o plaqueamento em placa de 96 poços foi utilizado a garrafa com a monocamada confluenta de células, retirou-se o meio de cultura contido na garrafa, lavou-se a monocamada com 4 mL de PBS uma única vez. Após a lavagem foram adicionados 2 mL de tripsina e deixado agir para então inativá-la com 6 mL de meio de cultura preparado com SFB e sem ATM. O conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo falcon para a realização da contagem de células.

Para a obtenção de monocamada confluenta nos poços da microplaca (96 poços), foi realizado a contagem no microscópio empregando a câmara de Neubauer (fator de diluição 10^4). Para a leitura utilizou-se azul de triptano, que permite a visualização de células vivas e células mortas, em uma proporção 1:1 (v/v) de reagente e suspensão de células.

Em um tubo eppendorf colocaram-se 50 μ L de azul de triptano puro e 50 μ L da suspensão celular contida no tubo falcon. A partir do cálculo realizado verificou-se a concentração de células (C_1) que havia na garrafa e, adicionaram-se em cada poço o equivalente a $2,5 \times 10^5$ células/ mL (C_2).

Exemplificação dos cálculos:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$8,25 \times 10^5 \times V_1 = 2,5 \times 10^5 \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 3,030 \text{ mL de suspensão celular}$$

Logo, colocou-se em um tubo falcon de 10 mL, 3,030 mL de suspensão celular com 6,970 mL de meio de cultivo com SFB. Após, o tubo foi homogeneizado e distribuídos 100 μ L em cada poço da placa. A placa foi incubada por 24 h em estufa a 37,5 °C com 5,0% de CO₂.

4.2.5.4 Tratamento das células

Após as 24 h, foram preparados os tratamentos realizando as diluições do EB, FAE e FAQ do Barbatimão (Figura 6). Pesou-se 1,0 mg de cada tratamento em balança semi-analítica, o qual foi colocado em tubo eppendorf e levado à capela de fluxo laminar (ambiente estéril) e realizadas as diluições.

Foram adicionados 5 μ L de DMSO em cada amostra e em seguida adicionados 995 μ L de meio de cultura puro (DMEM), sem SFB e ATM. A amostra foi homogeneizada com a micropipeta 15 vezes e filtrada em membrana de 0,20 μ m para dar prosseguimento na diluição seriada e preparo de cada concentração. Após a diluição retirou-se o meio contido em cada poço, realizada a lavagem com 100 μ L de PBS para retirar *debris* celulares e o meio de cultura.

Após a lavagem foram adicionados 100 μL de cada tratamento em seu respectivo poço na placa (Figura 7), a qual foi incubada a 37,0 $^{\circ}\text{C}$ em estufa úmida com 5,0% de CO_2 . Verificou-se que o tratamento também era captado no comprimento de onda utilizado, sendo assim o branco empregado não foram poços vazios da microplaca, mas sim poços nos quais foram adicionados apenas os tratamentos.

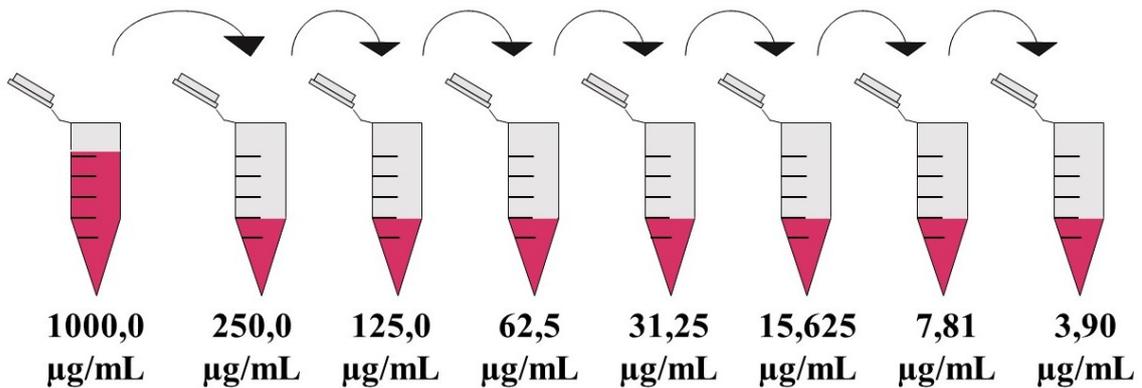


Figura 7. Ilustração do processo de diluição seriada realizada para o ensaio de viabilidade celular. **Fonte:** a Autora.

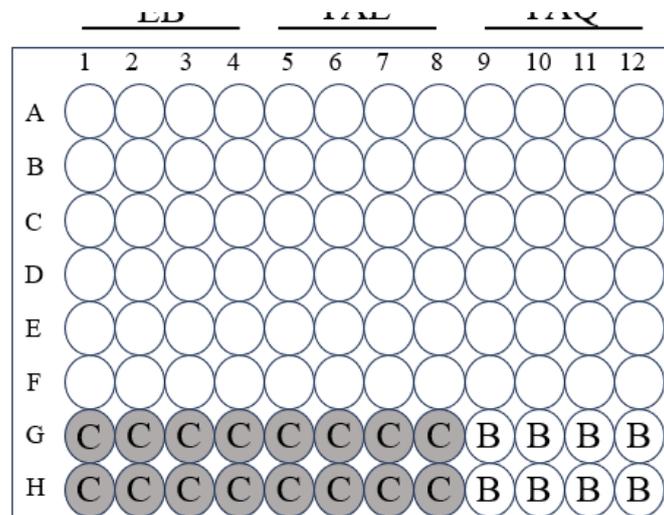


Figura 6. Representação da distribuição das amostras realizada em placa de 96 poços. Entre 1-4, 5-8, 9 e 12 foram adicionadas as amostras de extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ), respectivamente. Nas linhas A, B, C, D, E e F foram colocados os tratamentos com concentrações de 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81 e 3,90 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. C: controle negativo (DMEM sem SFB); B: branco (poço com tratamento e DMSO apenas). **Fonte:** a Autora.

4.2.5.5 Incubação com MTT e leitura

Para a revelação das placas e leitura no leitor de microplacas, foi preparado uma solução de MTT (0,5 mg/ mL) pesando-se 15,0 mg de MTT, adicionando-se 30 mL de meio de cultivo (DMEM) e homogeneizado. Antes da adição do reagente, os tratamentos foram retirados dos poços, as células foram lavadas com 100 μL PBS. Após a lavagem foram adicionados em cada

poço 100 µL da solução de MTT e a placa foi incubada por 4 h em estufa úmida com 5,0% de CO₂, a 37,0 °C. Depois da incubação foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço, agitado de maneira homogênea e realizado a leitura no leitor de ELISA à 570 nm.

4.2.6 Ensaio de migração celular

Este ensaio permite a visualização da migração celular através de uma placa de cultura de 24 poços com fibroblastos da linhagem L-929 que, após formada a monocamada, receberam um arranhão feito com ponta de pipeta estéril. As células foram então tratadas com as concentrações de 31,25, 15,625 e 7,8125 µg/mL do EB, FAE e FAQ de *S. adstringens* e a mensuração foi realizada em 24, 48 e 72 h. Repetido em triplicata.

4.2.6.1 Plaqueamento das células

Para o plaqueamento foi realizado o método disposto no item 4.2.5.3 com algumas alterações. A placa utilizada foi de 24 poços e foram adicionados em cada poço 1000 µL da suspensão celular preparada com concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL. A placa foi incubada também durante 24 h em estufa a 37,5 °C com 5,0% de CO₂.

4.2.6.2 Tratamento das células

Após 24 h, foram preparados os tratamentos realizando as diluições do EB, FAE e FAQ do Barbatimão (Figura 6). Pesou-se 1 mg de cada tratamento em balança semi-analítica, o qual foi colocado em tubo eppendorf e levado à capela de fluxo laminar (ambiente estéril) e realizadas as diluições conforme o ilustrado na Figura 6. Foram adicionados 5 µL de DMSO em cada amostra e em seguida adicionados 995 µL de meio de cultura puro (DMEM), sem SFB e antibióticos.

A amostra foi homogeneizada com a micropipeta 15 vezes e filtrada em membrana de 0,25 µm para dar prosseguimento na diluição seriada e preparo de cada concentração. Após a diluição retirou-se o meio contido em cada poço, foi realizada a lavagem com 1000 µL de PBS para retirar *debris* celulares e o meio de cultura. Após a lavagem, foram adicionados 1000 µL de cada tratamento em seu respectivo poço na placa (Figura 8), a qual foi incubada a 37,0 °C em estufa úmida com 5,0% de CO₂.

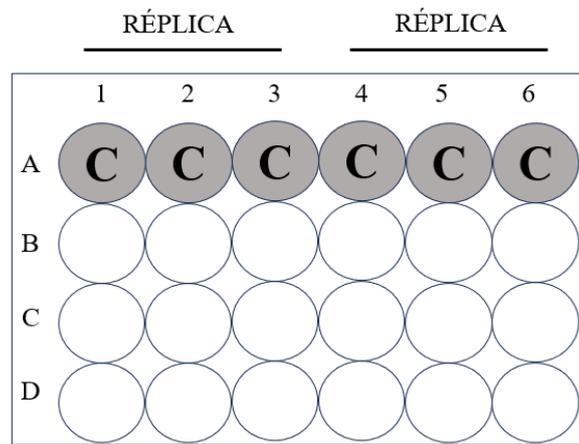


Figura 8. Representação da distribuição das amostras realizada em placa de 24 poços. Entre 1-3 e 4-6 foram adicionadas as amostras de cada réplica de cada tratamento. Nas linhas A, B, C e D, foram adicionados os tratamentos com concentrações de 31,25, 15,62 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. C: controle negativo (DMEM sem SFB).

4.2.6.3 Leitura dos resultados

Para captar as imagens do processo de cicatrização *in vitro* foi utilizado o microscópio óptico invertido (Primo Vert – Carl Zeiss) acoplado à câmera Axiocam 105 (Carl Zeiss), captando as fotografias que foram analisadas utilizando o software Zen Core 3.9.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e migração celular foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de *post hoc*, teste de aditividade de Tukey em nível de 95% de confiança ($p < 0,05$). Para plotar os gráficos e construir a curva de calibração dos padrões do ensaio cromatográfico foi realizado a regressão linear dos valores obtidos. As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism versão 10.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO EXTRATO BRUTO (EB) E FRAÇÕES OBTIDAS (FAE E FAQ) DAS CASCAS DO CAULE DE *S. adstringens*

Foram utilizados 20 g de droga vegetal coletada em 2008 (Costa et al., 2010) obtendo-se 5,6519 g de EB, logo o rendimento para produção de extrato bruto foi de 32,74%. Já para a realização da partição líquido-líquido e obtenção das frações com acetato de etila: água (1:1, v/v), foram utilizados 50,0152 g de extrato bruto, obtendo-se 14,943 g de FAE e 33,9918 g de FAQ (Tabela 5).

Tabela 5. Valores obtidos no preparo do extrato e frações de *Stryphnodendron adstringens*.

	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
Extrato bruto	5,6519	32,74
Fração acetato de etila	14,943	31,50
Fração aquosa	33,9918	71,65

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA

5.2.1 Análise qualitativa

5.2.1.1 Reação para taninos com o reagente cloreto férrico (FeCl₃)

A reação colorimétrica qualitativa para presença de taninos foi positiva, pois ocorreu a formação da coloração azul-esverdeada com a adição de cloreto férrico à solução extrativa (Figura 9).

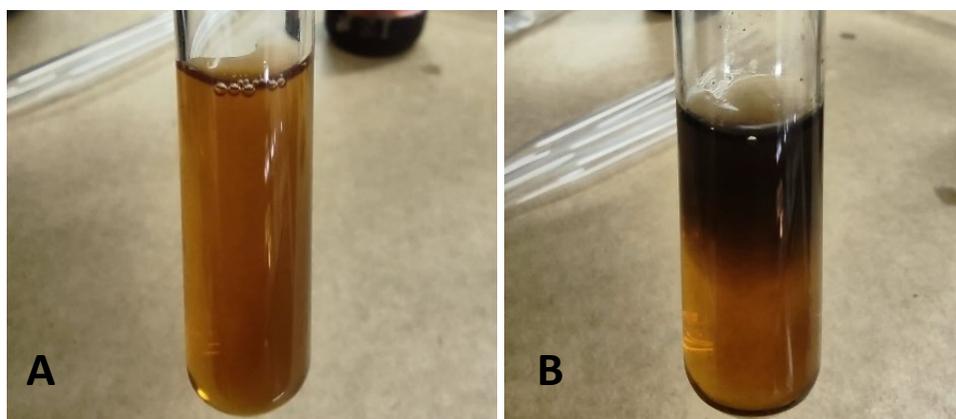


Figura 9. Reação colorimétrica com cloreto férrico. Tubo A: controle negativo, apenas a solução extrativa. Tubo B: solução extrativa com o reagente cloreto férrico. **Fonte:** a Autora.

Os taninos presentes no extrato aquoso de Barbatimão são metabólitos fenólicos, isto é, possuem hidroxilas fenólicas, as quais quando em contato com o íon Fe^{+3} formam complexos coloridos. As hidroxilas dos compostos fenólicos agem como agentes redutores do íon férrico desempenhando papel de agentes quelantes. Lerf e Wagner (2015) descrevem a existência da formação desses complexos como um composto galato ferroso (Fe(II)-AG) ou (Fe(III)-tanino) que culminou na formação de uma coloração verde-azulada. As hidroxilas e os íons metálicos formam um sistema de ácidos de Lewis, em que o pH decai ao longo da formação da cor.

5.2.1.2 Reação para taninos com gelatina

A reação de precipitação qualitativa para presença de taninos foi positiva, pois ocorreu a formação de precipitado esbranquiçado ao adicionar gelatina (Figura 10).

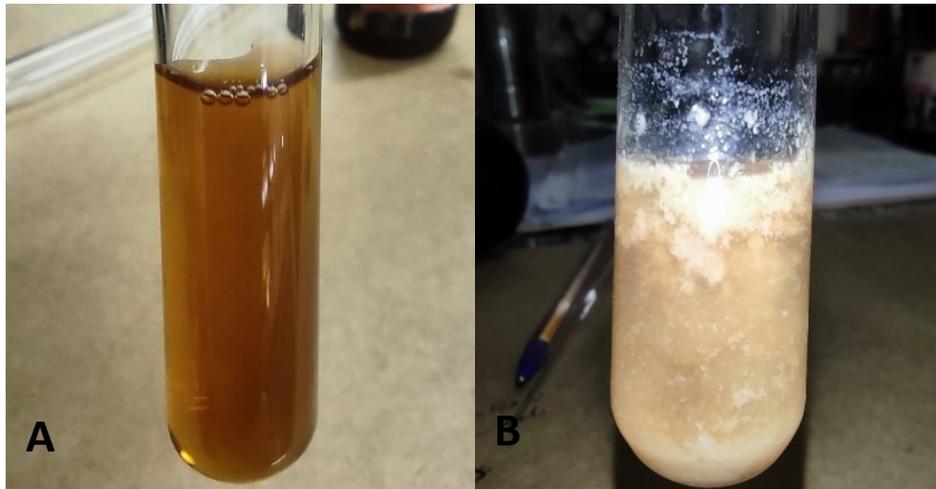


Figura 10. Reação de precipitação com gelatina. Tubo A, representando o controle negativo contendo apenas solução extrativa. Tubo B, representando a amostra teste contendo a solução extrativa e a solução de gelatina. **Fonte:** a Autora.

De mesmo modo que com metais, os taninos possuem capacidade de se complexar com proteínas, de maneira irreversível (ligações covalentes entre os núcleos aromáticos e cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos peptídeos) ou reversível (pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas entre os núcleos aromáticos e as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos peptídeos) (Mello; Santos, 2016).

5.2.1.3 Reação de Stiasny para taninos hidrolisáveis - condensados

O método de Stiasny ou reação de Stiasny é uma das metodologias empregadas para quantificar taninos condensados e hidrolisáveis em uma amostra, no entanto foi realizado neste estudo apenas como reação qualitativa. Os resultados obtidos ao realizar a reação de Stiasny estão dispostos na Figura 11.

Os flobafenos, substâncias fenólicas insolúveis em água, se formam naturalmente a partir da polimerização e oxidação de taninos. Nessa reação, formados por unidades de flavan-3-ol, os taninos condensados são tratados com ácido e liberam os monômeros de flavan-3-ol, cuja condensação com o formaldeído gera os flobafenos (Hemingway e Karchesy, 1889). De acordo com a literatura o Barbatimão da espécie *S. adstringens* possui tanto a presença de taninos condensados, quanto taninos hidrolisáveis (Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996^a), sendo assim foi confirmado que a droga vegetal analisada possui ambos tipos de taninos.

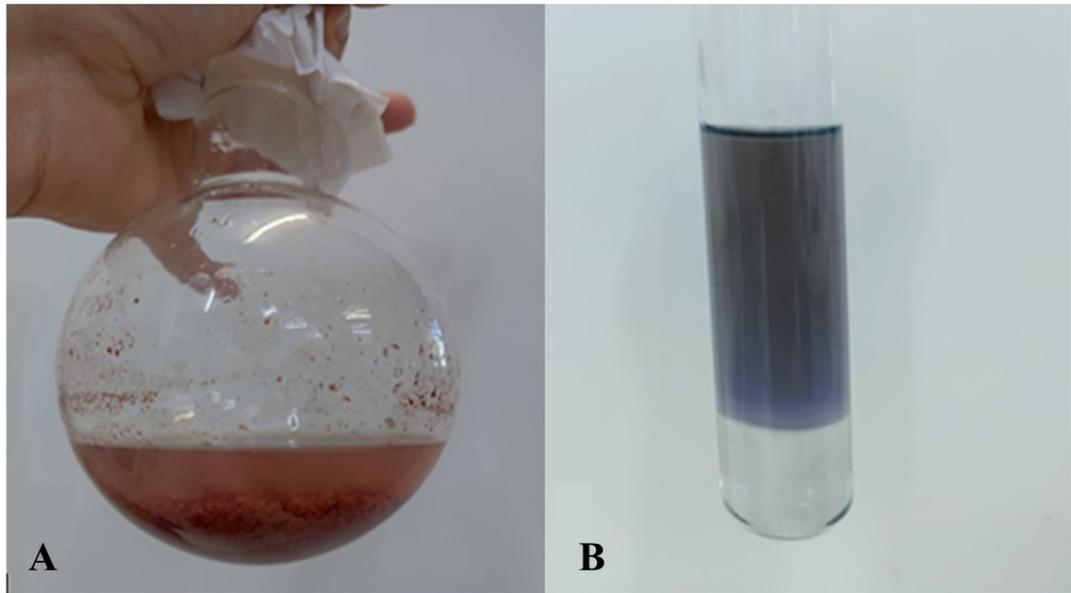


Figura 11. Reação de Stiasny. Em (A) tem-se a formação de precipitado avermelhado, os flobafenos que indicam a presença de taninos condensados. Em (B) observa-se a formação de coloração azulada indicando a presença de taninos hidrolisáveis. **Fonte:** a Autora.

5.2.2 Análise quantitativa

5.2.2.1 Análise do teor de polifenóis totais

O método de Folin-Ciocalteu não é apenas referência para quantificar polifenóis na indústria farmacêutica, mas também muito utilizado na indústria alimentícia, em especial a mediterrânea, a qual lida com uma gama de produtos ricos em polifenóis, como vinhos e azeites. Substâncias fenólicas são conhecidas por seu potencial antioxidante e para mensurar sua quantidade em amostras, sejam alimentícias ou de drogas vegetais, existem diversos testes como a capacidade antioxidante do ferro (FRAP) e capacidade antioxidante do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), por exemplo (Pérez, Dominguez-López e Lamuela-Raventós, 2023).

Os valores resultantes ao aplicar essas metodologias podem divergir em razão do uso de padrões de referência diferentes (pirogalol, ácido gálico, Trolox, entre outros), variação da

composição das amostras testadas, natureza fitoquímica complexa que influencia no efeito matriz e precisão analítica, por exemplo. Contudo, um estudo comparativo demonstrou que as discrepâncias entre valores de distintos testes ocorreram devido a quantidade de compostos fenólicos presentes em cada extrato analisado (Duddoné et al., 2009).

5.2.2.1.1 Determinação da curva de calibração do pirogalol

Seis soluções-estoque foram preparadas (Figura 12) com três réplicas de cada, contudo para os cálculos finais foram escolhidas cinco concentrações para a realização da regressão linear e construção da equação da reta (Figura 13). A preparação da curva de calibração seguiu o estipulado pela RDC N° 166, de 24 de julho de 2017 (Brasil, 2017), a qual estabelece como critério de avaliação de método analítico no mínimo cinco concentrações distintas e ao menos três replicatas de cada amostra.



Figura 13. Reação colorimétrica do padrão pirogalol, em concentração crescente, para determinação de polifenóis totais pela reação de Folin-Ciocalteu. **Fonte:** a Autora

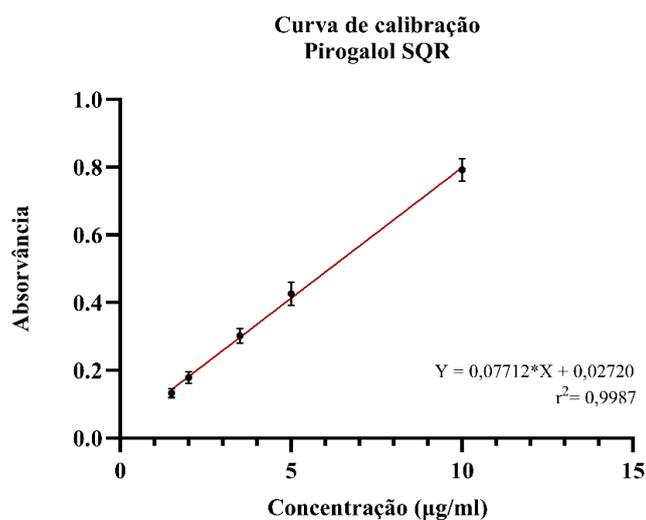


Figura 12. Regressão linear para determinação de polifenóis totais obtida por meio da reação de Folin-Ciocalteu empregando o padrão pirogalol.

5.2.2.1.2 Determinação do teor de polifenóis totais das amostras de extrato bruto e fração acetato de etila

Aplicando-se o método de Folin-Ciocalteu, o EB e FAE apresentaram concentrações de $375,85 \pm 0,550\%$ e $340,31 \pm 1,981$ mg/g de polifenóis equivalentes de pirogalol, respectivamente (Tabela 6 e Figura 14).

Tabela 6. Teor de polifenóis totais expressos em equivalentes de pirogalol do extrato bruto e fração acetato de etila de *Stryphnodendron adstringens* e suas respectivas absorvâncias.

	Massa (mg)	Abs.	Teor pirogalol pela eq. da reta	PT equiv. de pirogalol (mg/g, p/p de EB ou FAE)	PT equiv. de pirogalol (% p/p de EB ou FAE)
Extrato bruto					
1	2,025	0,198	2,219	369,842	36,984
2	2,103	0,202	2,262	377,045	37,705
3	2,093	0,203	2,283	380,647	38,065
Média	2,0742	0,201	2,2551	375,845	37,585 ± 0,550 (CV: 1,463)
Fração acetato de etila					
1	1,947	0,183	2,016	335,984	33,598
2	2,042	0,195	2,171	361,917	36,192
3	1,956	0,177	1,938	323,0175	32,302
Média	2,0742	0,201	2,042	340,3066	34,03 ± 1,981 (CV: 5,82)

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato de coloração amarelada. Essa solução age como agente oxidante, ou seja, as hidroxilas presentes no tanino reduzem o nox do molibdênio (Mo) e tungstênio (W) de +6 para +5, formando assim um complexo solúvel azul, cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de complexos formados (Pérez, Dominguez-López e Lamuela-Raventós, 2023). Logo, quanto mais metabólitos fenólicos houver em uma amostra mais intenso será a coloração azul (Figura 9).

Sereia (2019) realizou a determinação de polifenóis totais da espécie *S. adstringens* por meio do ensaio de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão (GAE) e encontrando os valores de 488,06 mg GAE/g de EB e 436,17 mg GAE/g de FAE, contudo não foi possível comparar os resultados em razão da diferença de padrões utilizados para construção da curva de calibração.

O teor de polifenóis totais disposto na Farmacopeia Brasileira (2019) é realizado a partir da droga vegetal, logo não são quantificados a quantidade presente em extratos e frações. No

entanto, foram observados valores semelhantes de extrato acetônico das cascas de *S. adstringens* por Ribeiro (2018), 34,80% de polifenóis totais equivalentes de pirogalol, e por Nascimento (2008) em extrato etanólico de 32,60%.

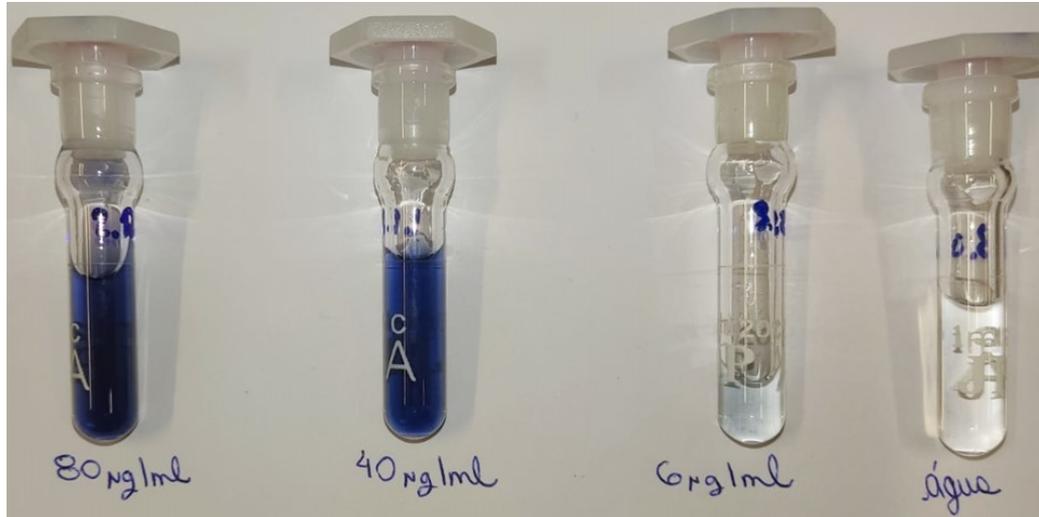


Figura 14. Reação colorimétrica em concentração decrescente de extrato bruto de *S. adstringens* pelo reagente de Folin-Ciocalteu. **Fonte:** a Autora.

Os compostos fenólicos são fitoquímicos, amplamente distribuídos e que estão presentes diariamente na alimentação, seja em frutas ou vegetais, caracterizados como metabólitos secundários formados através da via do ácido chiquímico ou pela via do acetato-polimalato iniciando com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (Mello & Santos, 2016). Entre as principais classes de compostos fenólicos tem-se os taninos, uma classe de metabólitos secundários presentes nas espécies de Barbatimão (Fabbrini et al., 2022).

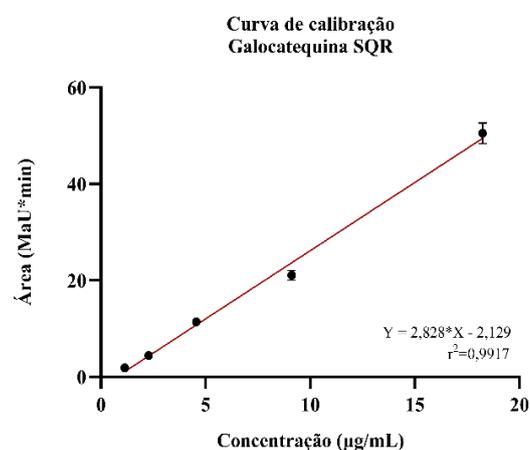
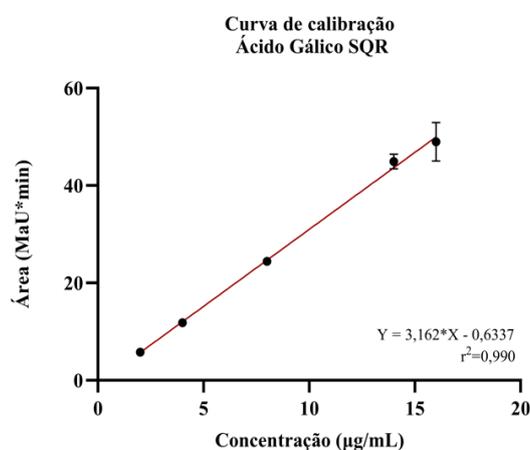
5.2.2.2 Determinação de teor de ácido gálico e galocatequina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para quantificação de substâncias é necessário realizar o teor de umidade no dia do preparo do extrato ou frações, visto que mesmo após a secagem da droga vegetal ainda há certa quantidade de água residual. Logo, o teor de umidade encontrado foi de 13,95% em 10,017 g de droga vegetal cominuída. A partir das equações da reta calculadas por meio do *software* GraphPad Prism 10.01 foram encontradas as concentrações de 0,363 e 1,068 mg/g de droga vegetal para ácido gálico e galocatequina, respectivamente.

Os resultados das curvas de calibração (Figura 15) estabelecidas para as substâncias exigidas pela Farmacopeia Brasileira (ácido gálico e galocatequina), estão demonstrados na Tabela 7, cujos coeficientes de determinação estão de acordo com a RDC nº166 (Brasil, 2017), visto estarem igual ou acima de 0,990.

Tabela 7. Resultados do ensaio de doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação dos polifenóis galocatequina e ácido gálico.

Padrão	Galocatequina	Ácido gálico
Equação da reta	$y = 2,8283x - 2,1289$	$y = 3,1615x - 0,6337$
Área MaU*min	50,0079	19,13645
Coefficiente de determinação	0,9917	0,9900
Tempo de retenção médio (min)	12,791	10,375
Concentração do padrão na amostra ($\mu\text{g/mL}$)	18,41	6,25
Teor do padrão na droga vegetal (mg/g)	1,068	0,363



O perfil de FAE de Barbatimão obtido por CLAE (Figura 16) foi semelhante ao desenvolvido por Toledo (2008) e Pereria Junior e colaboradores (2020). A confirmação da presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, 4'-O-metil-galocatequina, epigalocatequina-3-O-galato e 4'-O-metil-epigalocatequina foi realizada através da análise qualitativa de co-eluição adicionando padrões das substâncias isoladas à FAE (Collins, Braga & Bonato, 2006).

Segundo os resultados observados, foi possível realizar a caracterização fitoquímica da

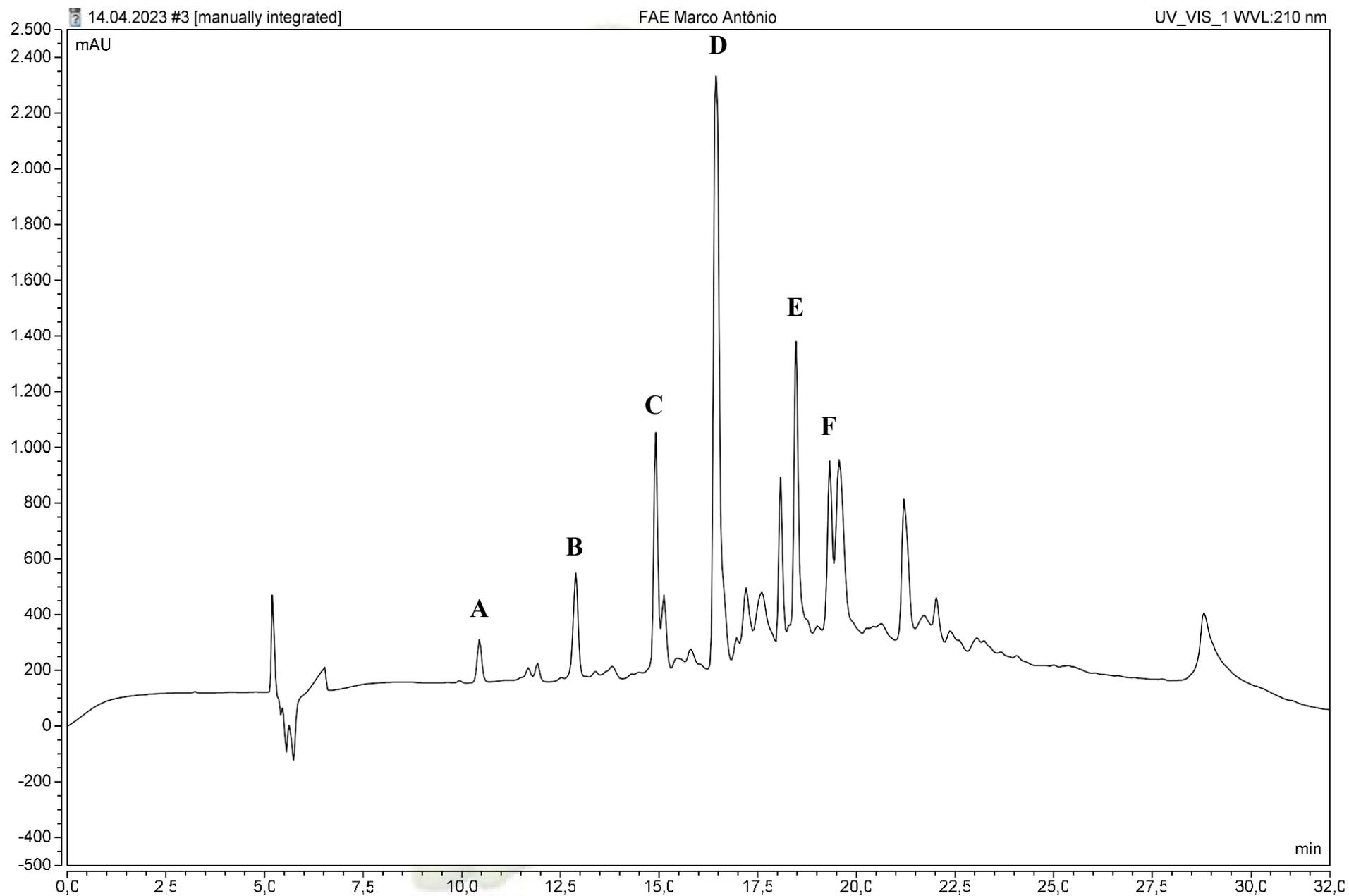


Figura 15. Cromatograma de FAE de *Stryphnodendron adstringens*. A – Ácido gálico; B – Galocatequina; C – Epigalocatequina; D – 4'-O-metil-galocatequina; E – Epigalocatequina-3-O-galato; F – 4'-O-metil-epigalocatequina

FAE de Barbatimão por CLAE e determinar que a droga vegetal atende aos requisitos exigidos pela Farmacopeia Brasileira (2009) quanto à quantificação dos marcadores fitoquímicos.

5.3 ANÁLISE DO CONTEÚDO FITOQUÍMICO POR MEIO DE CROMATÓGRAFO LÍQUIDO DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADO AO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE-IES-QToF-EM/EM)

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas Tandem (EM/EM) auxiliou a constatar a presença de compostos fenólicos por meio da correlação da razão de massa-carga (m/z) obtida para cada pico. Os resultados da análise estão dispostos na Tabela 8 e Figura 17. Vale destacar que alguns ajustes no tempo de eluição foram necessários em razão da limitação de vazão do espectrômetro de massas, sendo assim o fluxo do solvente passou de 0,8 para 0,3 mL/min. Apesar da modificação, o perfil fitoquímico obtido foi considerado muito similar ao representado no cromatograma desenvolvido segundo a monografia farmacopeica do Barbatimão (Farmacopeia Brasileira, 2019).

Os monômeros de m/z 169,0137; 305,0663; 305,0663; 319,0823; 319,9827 e 457,0788 detectados (Tabela 8) correspondem aos monômeros de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, 4'-*O*-metil-galocatequina, 4'-*O*-metil-epigalocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato, respectivamente. Suas razões massa-carga são compatíveis com a massa molecular dos padrões internos utilizados para confirmação na metodologia disposta no Item 5.2.2.2. Além disso, os espectros de fragmentação dos íons fragmento são semelhantes aos reportados na literatura para a espécie *S. adstringens* (Baldívia et al., 2018; Isler et al., 2010; Mello, Petereit, Nahrstedt, 1999).

O método espectroscópico de ionização por *electrospray* (IES) com analisador QToF permite obter a massa monoisotópica do íon precursor (MS) e realizar a fragmentação do mesmo, obtendo assim os fragmentos do íon precursor (MS/MS). Os íons MS/MS que auxiliam na identificação e distinção dos taninos de outras classes de metabólitos secundários são formados a partir de reações físico-químicas características para proantocianidinas. (Gomes et al. 2021).

Entre as principais reações de fragmentação para esse tipo de taninos destacam-se: fissão de Retro-Diels-Alder (RDA; perda de 168 u); metídio-quinona ou fissão interflavan [MQ; perda de 304, 288 ou 290 u]; fissão de formação de benzofurano (BFF, perda de 122 u); fissão do anel heterocíclico ou anel C de um flavan-3-ol (HRF; perda de 126 u); e fissão de éster gálico (FG; perda de 170 u) (Demarque, Crotti, Vessicchi, Lopes, & Lopes, 2016; Hensel & Symma, 2022).

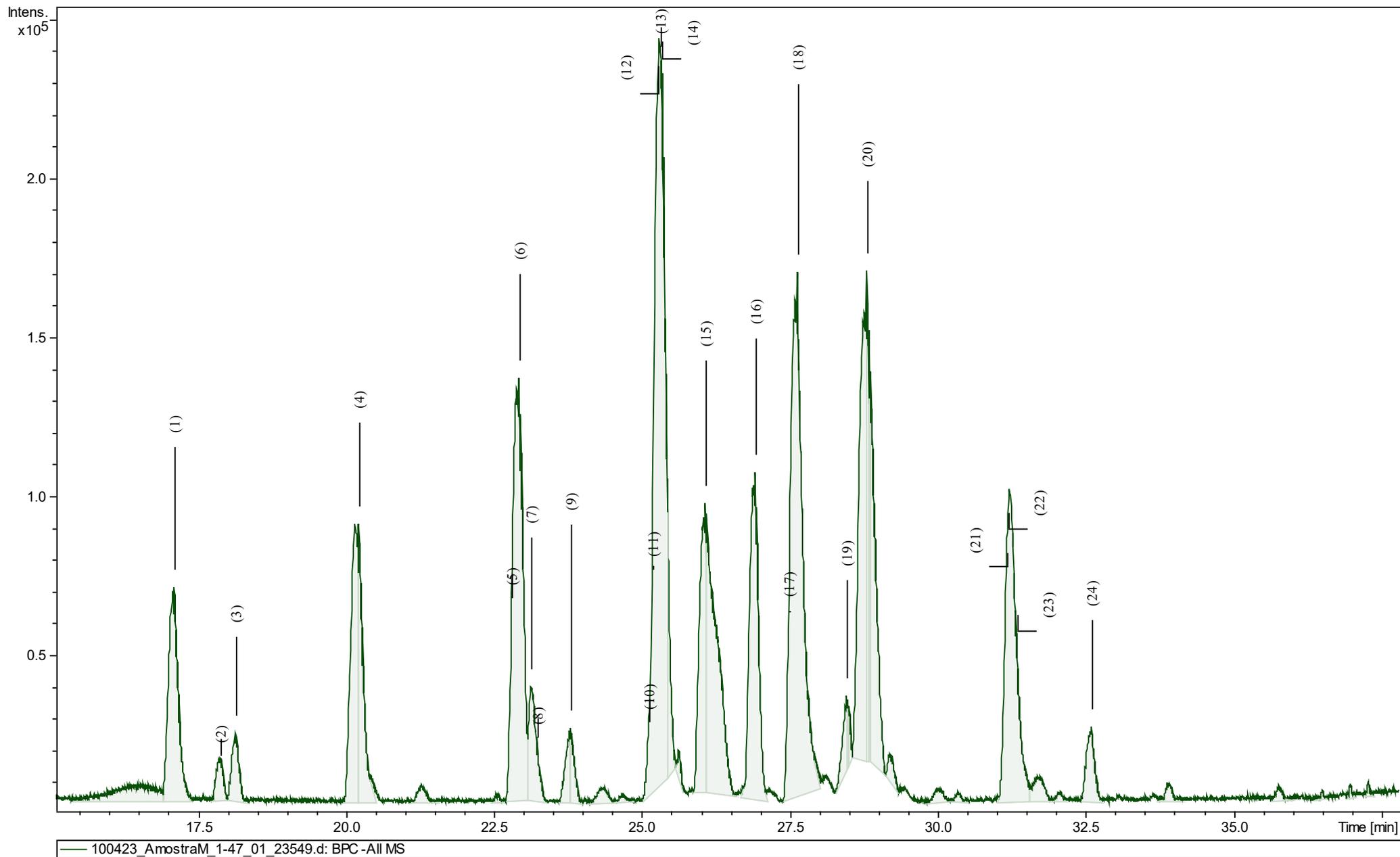


Figura 16. Cromatograma de FAE de *S. adstringens* obtido por CLAE-EM/EM. (1) – Ácido gálico; (4) – Galocatequina; (6) – Epigalocatequina; (14) - 4'-*O*-metil galocatequina; (16) – 4'-*O*-metil epigalocatequina; (18) – Epigalocatequina-3-*O*-galato.

Tabela 8 Constituintes fitoquímicos identificados da fração acetato de etila de *Stryphnodendron adstringes* por CLAE-IES-QtoF-EM/EM em modo negativo [M – H]⁻.

Pico	Tr (min)	Fórmula empírica	MS [M – H] ⁻ (m/z)	MS/MS – Modo negativo (m/z)	Metabólito secundário	Referência
1	17,12	C ₇ H ₆ O ₅	169,0137	169, 125	Ácido gálico st	Gomes et al. 2021; Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^a ; Zocoler et al. 2009
2	17,84	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₄	609,1231	423, 305, 303, 177,125	PDE-PDE (tipo B)	Mello, Petereit e Nahrstedt, 1996 ^a ; Zocoler et al. 2009
3	18,10	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₄	623,1399	497, 455, 319, 303, 177, 125	N. D	-
4	20,14	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0663	179, 125	Galocatequina st	Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^a
5	22,82	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₄	611,1386	305, 179	PDE-PDE (tipo B)	-
6	22,93	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	305,0660	179, 165, 125	Epigalocatequina st	Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^a
7	23,17	C ₃₇ H ₃₀ O ₁₈	761,1341	609, 423, 287, 177, 125	PDE-PDEG (tipo B)	Leite e Mello, 2023;
8	23,26	C ₃₈ H ₃₁ O ₁₈	775,1500	623, 605, 497, 467, 455, 437, 319, 303, 285, 261, 177 169, 125	N. D	-
9	23,83	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₃	593,1294	575, 483, 425, 407, 305, 177, 165, 125	PRD-PDE (tipo B)	Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^b ; Zocoler et al. 2009;
10	25,14	C ₃₂ H ₃₀ O ₁₄	637,1557	317, 191, 137, 125	PDE-PDE (tipo B)	Mello et al., 1999; Pinto, 2011
11	25,21	C ₄₈ H ₄₅ O ₂₁	957,2432	637, 319, 317,	PDE-PDE-PDE (tipo B)	-
12	25,30	C ₄₈ H ₄₇ O ₂₁	959,2589	637, 456, 319, 275, 260	PDE-PDE-PDE	-
13	25,32	C ₃₂ H ₃₂ O ₁₄	639,1713	319, 317, 301, 137	PDE-PDE (tipo B)	.
14	25,36	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	319,0823	304, 260, 218, 181, 166, 137, 125	4'-O-metil-galocatequina st	Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^a ; Leite e Mello, 2023
15	26,08	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃	607,1456	467, 439, 177, 319, 287, 177	N. D	-
16	26,94	C ₁₆ H ₁₆ O ₇	319,0827	304, 260, 180, 166, 137, 125	4'-O-metil-epigalocatequina st	Leite e Mello, 2023
17	27,50	C ₄₄ H ₃₅ O ₂₂	915,1636	457, 305, 287, 169, 125	Dímero de epigalocatequina-3-O-galato st	Hashimoto, Nonaka, & Nishioka, 1989
18	27,63	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	457,0788	331, 305, 287, 169, 125	Epigalocatequina-3-O-galato st	Mello, Petereit, & Nahrstedt, 1996 ^a
19	28,44	C ₃₁ H ₂₇ O ₁₃	607,1464	439, 357, 305, 177	N. D	-
20	28,79	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₃	621,1617	603, 439, 421, 319, 301, 191, 137, 125, 109	N. D	-
21	31,16	C ₂₃ H ₁₉ O ₁₁	471,0931	333, 319, 169, 125	N. D	-
22	31,17	C ₄₆ H ₃₉ O ₂₂	943,1930	471, 333, 319, 305, 169	N. D	-
23	31,33	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₃	621,1609	603, 493, 439, 421, 319, 283, 301, 137, 109	N. D	-
24	32,59	C ₃₂ H ₂₉ O ₁₃	621,1611	603, 493, 439, 421, 319, 283, 301, 137, 109	N. D	-

MS: íon precursor; MS/MS: íon fragmento; N.D: não determinado; Tr: tempo de retenção; st confirmado com coeluição de padrão; PDE: prodelfinidina; PRD: prorobinetidina; PDEG: prodelfinidina-galoil. **Fonte:** a Autora

Foi proposto uma reação de clivagem do tipo MQ para o metabólito do pico 2 (Tabela 8), a fim de justificar os íons fragmentos de m/z 305 e 303 observados (Figura 18). Além dos citados, o íon de m/z 423 é formado através da reação de RDA $[M - H - 168]^-$ seguida de perda de uma molécula de água $[M - H - 18]^-$.

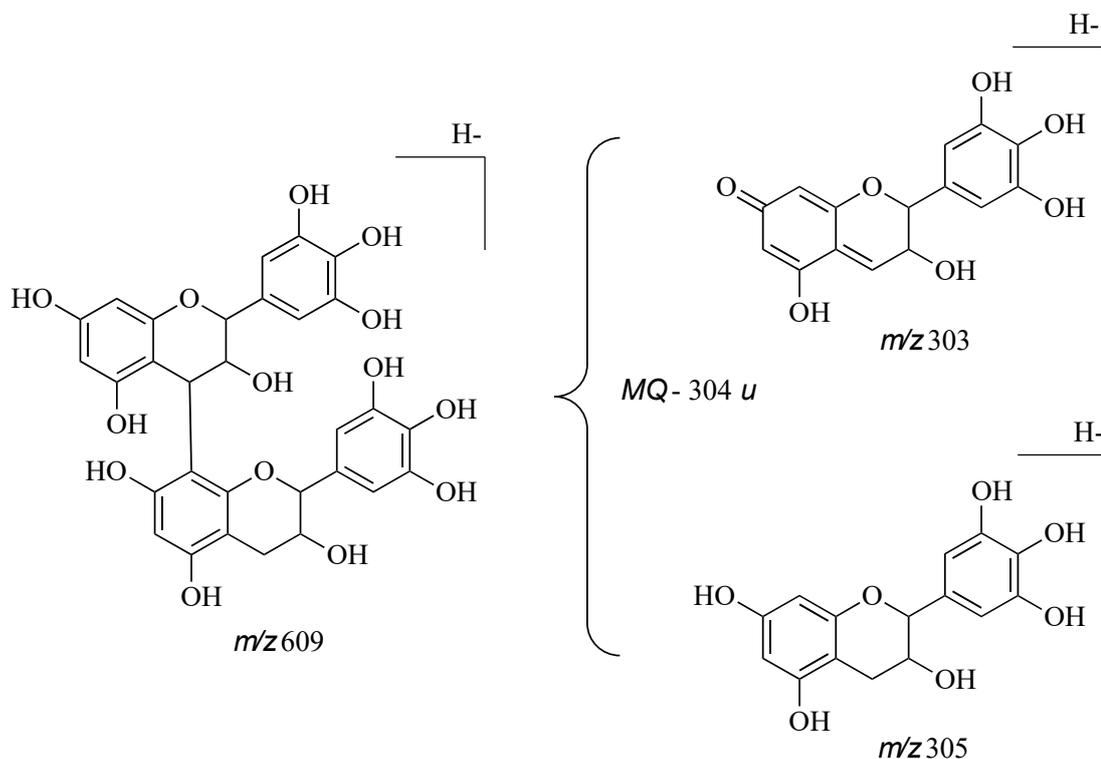


Figura 17. Sugestão de esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massa em modo negativo $[M - H]^-$ do pico 2 de m/z 609,1231. Nesta proposta foi realizado a fissão de metídio-quinona (MQ) com perda de 304 u. Um exemplo de tanino encontrado na literatura de *S. adstringens* com a massa molecular e fragmentação apresentadas pelo pico 2 é o dímero de epigallocatequina-(4β→8)-gallocatequina. **Fonte:** a Autora

Mello, Petereit e Nahrstedt (1996a) identificaram e isolaram dímeros de prodelphinidinas de *S. adstringens* denominados de epigallocatequina-(4β→8)-gallocatequina e epigallocatequina-(4β→8)-epigallocatequina, cuja massa molecular é semelhante (610 u) a dos íons precursores existentes no espectro de massas da FAE (Tabela 8, pico 2, m/z 609,1231). Foi observado também a presença de ditos dímeros na FAE de um extrato hidroacetônico preparado com as cascas de outra espécie de Barbatimão, *S. obovatum* Benth. (Zocoler et al., 2009).

Alguns estudos conduzidos com o *S. adstringens* também apontam a presença dos monômeros de flavan-3-ol observados na Tabela 8. Pereira Junior e colaboradores (2020) produziram a partir das cascas de *S. adstringens* um extrato hidroetanólico e sua fração semipurificada (FAE), a qual elucidaram o perfil fitoquímico com auxílio de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (CL-EMAR). Os autores

constatarem a presença de íons precursores $[M - H]^-$ identificados como: ácido protocatéquico (m/z 153,0186); ácido gálico (m/z 169,0133); (epi)-galocatequina (m/z 305,0668); 4'-*O*-metilgalocatequina (319,0819); (epi)-galocatequina-*O*-galato (m/z 457,0770); prodelfinidina B5 (m/z 609,1257); e (epi)-galocatequina-(epi)-galocatequina-*O*-galato (m/z 761,1397).

Carvalho e colaboradores (2020) também produziram um extrato a partir das cascas de *S. adstringens*, contudo utilizaram como líquido extrator o álcool etílico. Eles analisaram a composição fitoquímica do extrato por cromatografia líquida acoplada ao detector por arranjo de diodos e espectrometria de massas (CL-DAD-EM). Em seu estudo foram obtidos íons de razão massa-carga semelhante à dos presentes na FAE (Tabela 8), sendo eles: ácido gálico (m/z 169,0131); galocatequina (m/z 305,0665); epigalocatequina (m/z 305,0662); dímero de prodelfinidina (m/z 609,1247); dímero de prorobinetinidina-prodelfinidina (PRD-PDE) (m/z 593,129). À vista do exposto, os compostos descritos na Tabela 8 possuem m/z semelhante aos metabólitos reportados pelos autores Carvalho et al. (2020) e Pereira Junior et al. (2020).

Ainda sobre os dados encontrados por Pereira Junior et al. (2020), os mesmos expõem em seu material suplementar os espectros de massa dos íons fragmentos (MS/MS) do composto de m/z 761,1341, cujos valores de massa-carga correspondem aos do composto obtido na FAE do presente estudo (Tabela 8, pico 7, m/z 761,1341). Carvalho e colaboradores (2020), também apontam a presença de dito íon (m/z 761,1368 $[M - H]^-$) e o classificaram em seu estudo como um dímero de prodelfinidina-prodelfinidina-galoil (PDE-PDEG), além disso o perfil observado de íons MS/MS é semelhante ao do pico 7 (Tabela 8) do presente estudo.

Um estudo apontou a presença de PDE-PDEG em cascas de *S. adstringens*, sendo esse tanino a epigalocatequina-(4 β →8)-epigalocatequina-3-*O*-galato (PDE-PDEG) isolada por derivatização empregando a técnica de acetilação, e identificada por espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) por Mello, Petereit e Nahrstedt (1996^a).

De acordo com dados da literatura, foi proposto na Figura 19 uma sugestão de fragmentação para um dímero de PDE-PDEG (m/z 761, composto 7, Tabela 8) utilizando a conformação estrutural do tanino isolado e identificado por Mello, Petereit e Nahrstedt (1996a). Nesse esquema teórico são observados os íons MS/MS (Figura 20) do tanino condensado de m/z 761, os quais são compatíveis com os observados no espectro de massas para o composto contido na FAE (Carvalho et al. 2020; Gomes et al. 2021; Symma & Hensel, 2022).

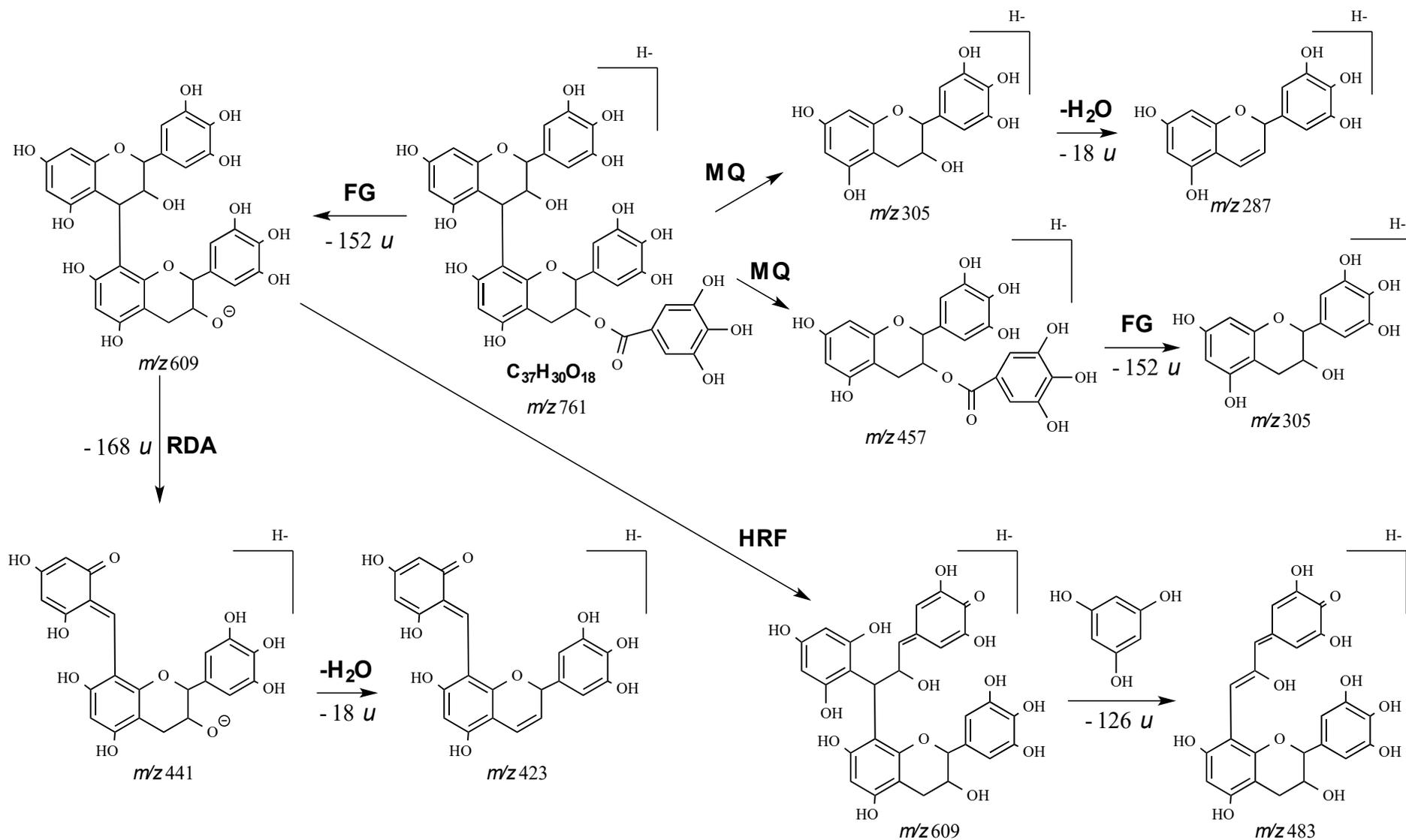


Figura 18. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M - H]^-$ do pico 7 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 761 constituído por unidades monoméricas de prodelfinidina e prodelfinidina-galoil. MQ: reação de metídio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel. FG: fissão de éster gálico. **Fonte:** a Autora

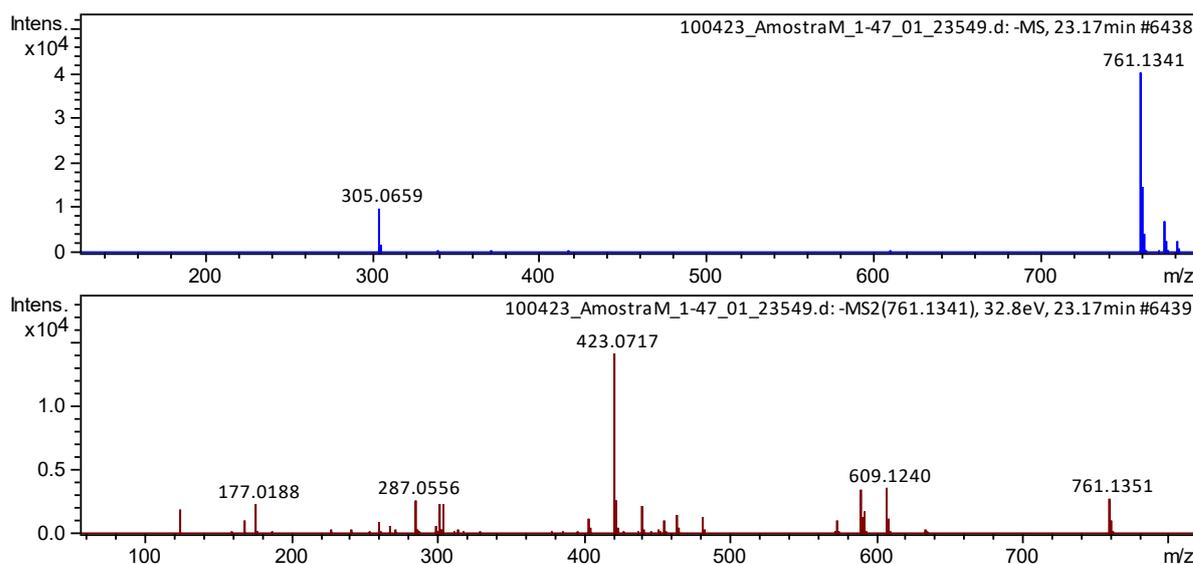


Figura 19. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 761,1341 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho). **Fonte:** a autora.

Sabe-se que as fragmentações podem se dar por retenção de carga, ‘*charge retention fragmentation*’ (CRF) ou migração de carga, ‘*charge migration fragmentation*’ (CMF). A CMF, como o próprio nome intitula, ocorre a migração da carga no composto em que ela se desloca do íon precursor. Já as CRF são reações que resultam em íons fragmentados com carga localizada no local idêntico ao seu íon precursor e são classificadas em nove mecanismos, dentre eles o mecanismo reverso da reação de Diels -Alder denominado de retro-Diels-Alder (RDA) (Demarque et al. 2016).

À vista das possíveis reações, foram sugeridas duas opções de formação para íon MS/MS de m/z 609. A primeira consiste na reação de HRF, em que ocorre a migração de carga do fragmento (CMF) via ϵ -eliminação, o que explica a formação do fragmento m/z 609, 125 produzido a partir do íon precursor m/z 761 $[M - H]^-$. A segunda opção seria a formação do íon m/z 609 por perda do grupo galoil $[M - H - 152]^-$ (Aquino, 2018). A partir da reação de RDA, o anel C do fragmento de m/z 609 sofre um mecanismo pericíclico e produz um dieno, o fragmento de m/z 441 $[M - H - 168]^-$. Já os fragmentos de m/z 441 e 305 perdem uma molécula de água $[M - H - 18]^-$ e produzem os fragmentos de m/z 423 e 287, respectivamente (Demarque et al., 2016).

Além das reações citadas observa-se a típica fissão entre os monômeros de flavan-3-ol (MQ) com a formação dos íons de m/z 305 [(epi)-galocatequina] e 457 [epigalocatequina-3-*O*-galato] (Hensel & Symma, 2022

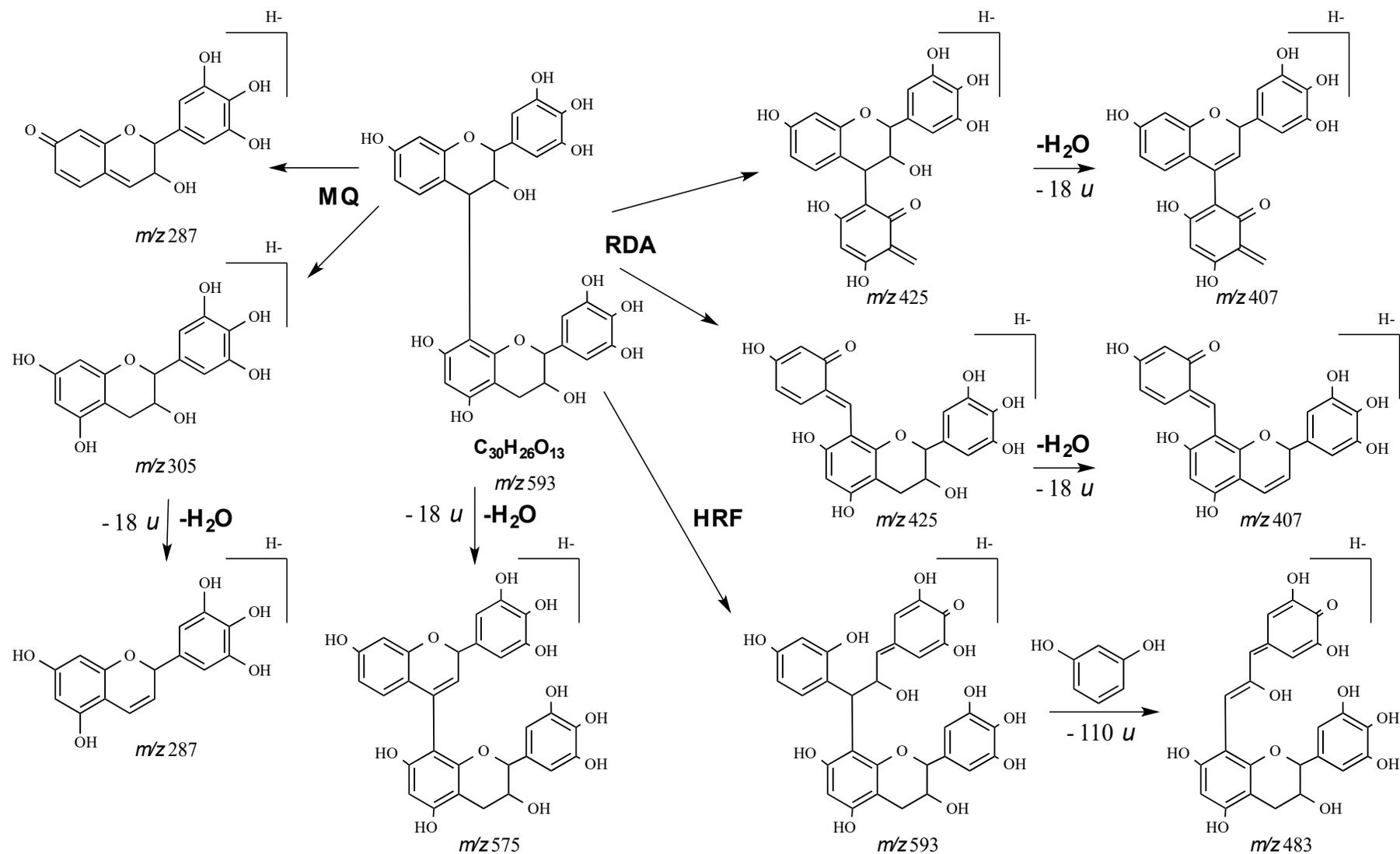


Figura 20. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M-H]^2+$ do pico 9 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 593 constituído de unidades monoméricas de prorobinetinidina e prodelfinidina. MQ: reação de metídio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel **Fonte:** a Autora.

Outrossim, conforme as possíveis reações de fragmentação e o espectro de massas Tandem (Figura 22) foi possível sugerir que o pico 9 (Tabela 8) m/z 593,1290 $[M - H]^-$ corresponde a um dímero de prorobinetinidina-prodelfinidina.

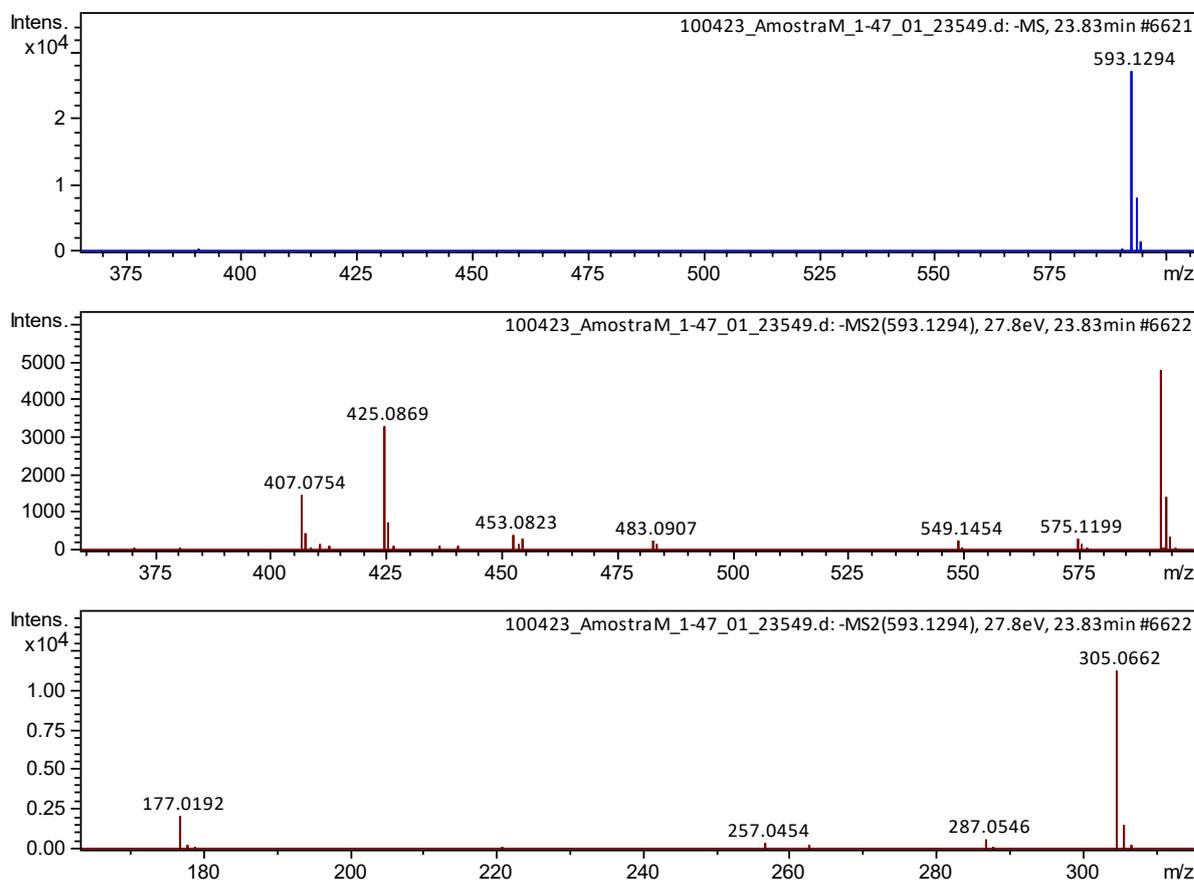


Figura 21. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 593,1294 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho). **Fonte:** a autora.

Na figura 21 foi esquematizado os íons fragmentos observados no espectro da Figura 22. A presença do fragmento iônico de m/z 425,0869, o qual é produzido através da reação de RDA $[M - H - 168]^-$, sugere a ausência de hidroxila ligada ao C5 do anel A do núcleo de flavan-3-ol. Além disso, a fissão interflavan dos monômeros produz os íons fragmentos de m/z 287 (monômero de PRD) e m/z 305 (monômero de PDE) (Nocchi et al., 2016). Além do *S. adstringens*, o monômero robinetidinol ou metabólitos formados por ele podem estar presentes em outras espécies, da família Fabaceae, como *A. cacia mearnsii* De Wild (Kashiwada et al. 2021; Ikarashi et al. 2011; Niu et al. 2015), *Stryphnodendron obovatum* Benth. (Zocoler et al. 2009), *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin & Barneby (Chedjou et al. 2023) e *Erythrophleum fordii* Oliv. (Yu, Li, & Yu, 2005).

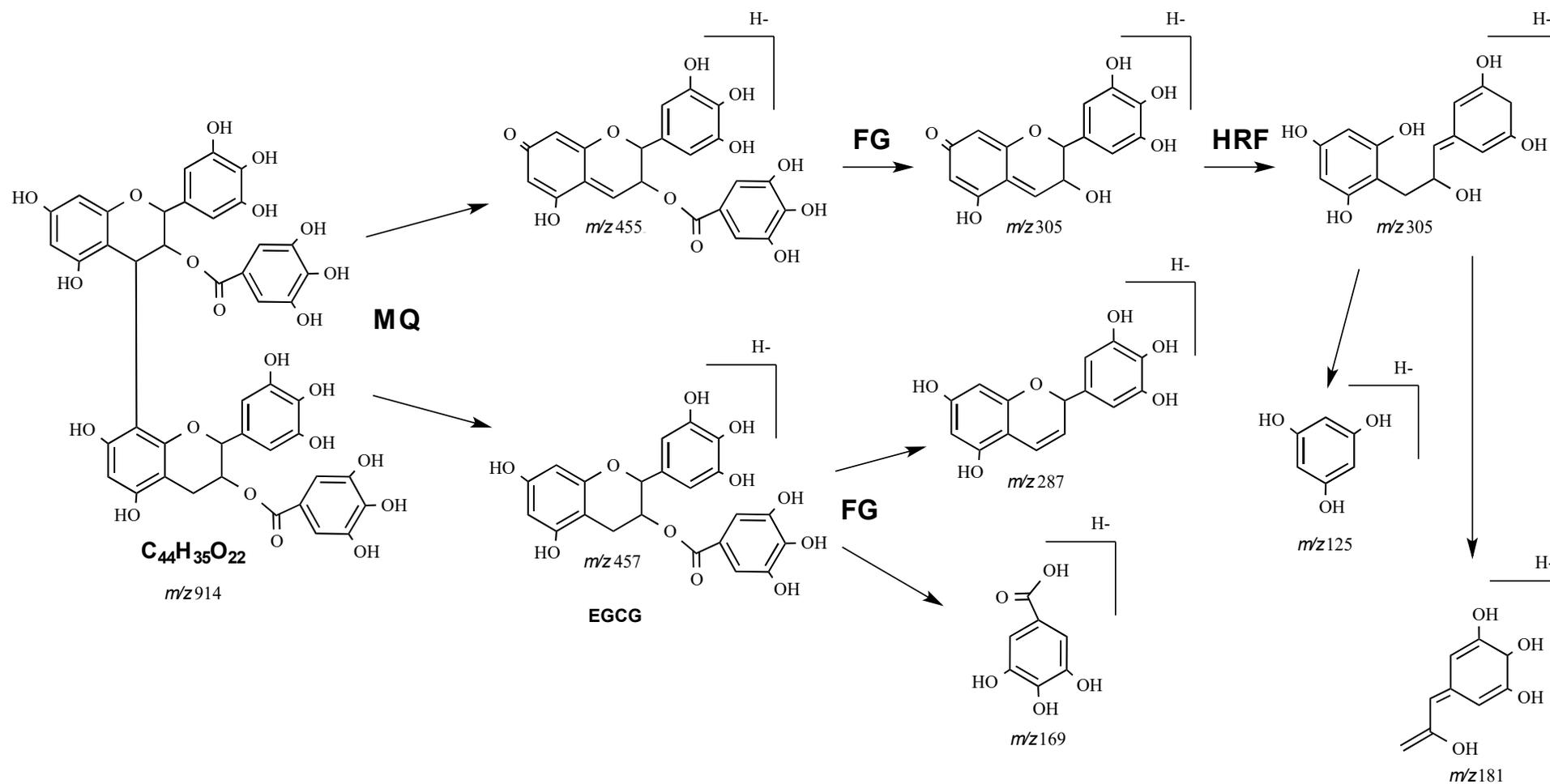


Figura 22. Esquema teórico de fragmentação por espectrometria de massas Tandem $[M - H]^-$ do pico 17 da Tabela 8. Foi estruturado um dímero de tanino de m/z 915 constituído duas unidades monoméricas de prodelfinidina-galoil (epigalocatequina-3-*O*-galato). MQ: reação de metálio-quinona; RDA: reação de retro-Diels Alder; HRF: fissão heterocíclica do anel. **Fonte:** a Autora

O último pico analisado foi o 17 (Tabela 8) de m/z 915,1636 $[M - H]^-$. Após comparação dos íons fragmentos MS/MS (Figura 24) com as possíveis reações em proantocianidinas, foi sugerido um dímero de PDEG-PDEG com sua fragmentação disposta na Figura 23.

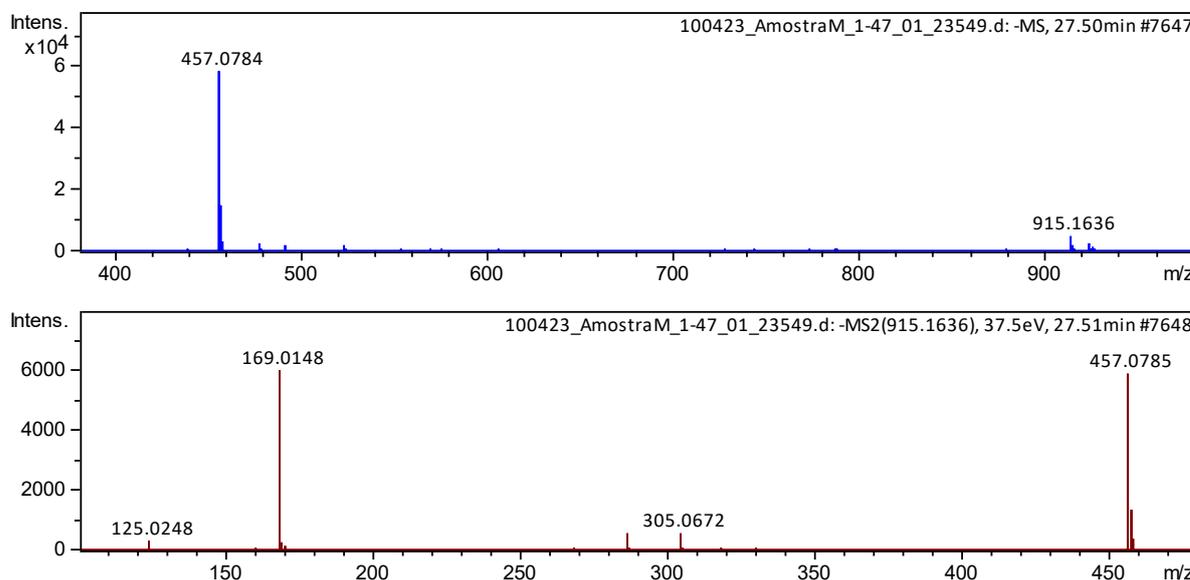


Figura 23. Espectro de massas no modo negativo do íon precursor de m/z 915,1636 (azul) e seus íons fragmentos MS/MS (vermelho). **Fonte:** a autora.

A presença do íon fragmento m/z 457 com intensidade de 100% indica a predominância de um dímero de epigallocatequina-3-*O*-galato (m/z 457,0784). Observa-se que o íon precursor m/z 915,1636 está presente no mesmo pico do íon precursor de m/z 457,0788 (Figura 24), o que corrobora com a sugestão de um dímero de EGCG. Após a reação de fissão de éster gálico o íon fragmento de m/z 305 é formado e o fragmento de m/z 169 com intensidade de 92,25% indica o íon galato perdido pela prodelfinidina (Hensel & Symma, 2022).

Na literatura são encontrados dímeros de flavan-3-ols isolados do chá Oolong (semi-fermentado) produzido a partir da espécie *Camellia sinensis* (L). Kuntze. Hashimoto e colaboradores (1989) isolaram os chamados oolonghomobisflavans (m/z 929), os quais são dímeros formados por monômeros de EGCG unidos por uma ponte de metileno nas posições 8,8' (oolonghomobisflavan A) e 8,6' (oolonghomobisflavan B). Outrossim, os autores isolaram oito novas proantocianidinas, entre elas dímeros de PDE-galoil: epigallocatequina-3-*O*-galato-(4 β →8)-epigallocatequina-3-*O*-galato e epigallocatequina-3-*O*-galato-(4 β →6)-epigallocatequina-3-*O*-galato.

No mais, sugere-se que os íons precursores $[M - H]^-$ correspondentes aos picos 2, 5, 7, 9, 10, 11, 12 e 13 da Tabela 8 sejam dímeros de PDE ou trímeros de PDE constituídos por pelo menos um monômero de PDE, em razão da presença de fragmentos m/z 423, 425, 319, 317 ou 305 (Baldívia et al., 2018; Demarque et al., 2016; Hensel & Symma, 2022). De maneira concisa,

ao analisar os perfis cromatográficos e espectros de massas, assim como os testes de controle de qualidade realizados, o exemplar analisado corresponde aos dados de *S. adstringens* recuperados da literatura recuperados, assim como encontra-se dentro dos parâmetros exigidos pela legislação (Farmacopeia Brasileira, 2019) para seu uso e realização das análises *in vitro*.

5.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para o controle negativo, as células foram tratadas somente com meio de cultura (DMEM), pois células cultivadas com SFB apresentam uma viabilidade maior por terem mais nutrientes disponíveis e que induzem a proliferação. O DMEM possui apenas os nutrientes necessários para manutenção das funções celulares fisiológicas, portanto não é capaz de induzir a proliferação celular. Também foi realizado o controle do diluente empregado (dimetilsulfóxido – DMSO) para os extrato e frações e não foi encontrada citotoxicidade do mesmo, cuja concentração não ultrapassou 0,5% (p/v). O branco foi preparado com os tratamentos EB, FAE e FAQ diluídos em DMEM, pois possuem coloração, a qual é captada pelo leitor de microplacas.

As concentrações testadas foram de 250,0 a 3,90 µg/mL. De acordo com a análise realizada, os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa entre si para a proliferação celular ($p=0,0006$), e quando combinados concentração vs amostra, também foi observada diferença ($p=0,0001$) (Figuras 25 e 26). Os tratamentos de 7,81 µg/mL (EB, 167,55%), 15,62 µg/mL (FAE, 192,58%) e 7,81 µg/mL (FAQ, 170,65%) foram os que apresentaram maior efeito proliferativo celular (Figura 26 - FAE).

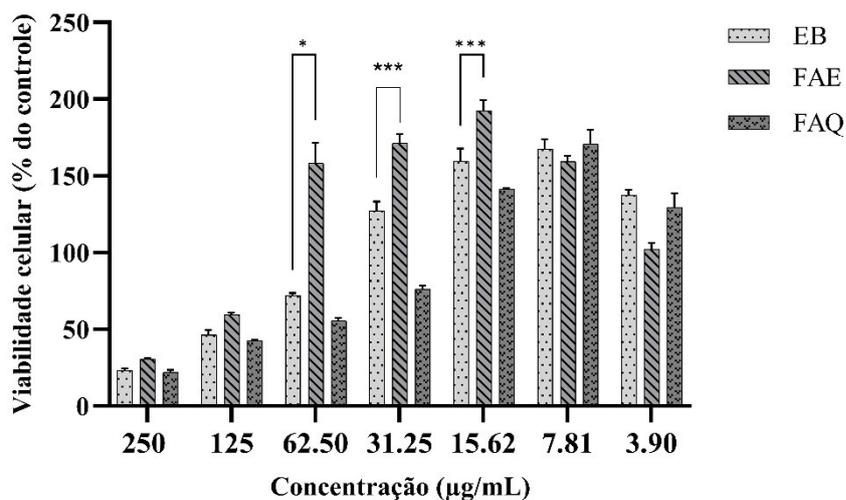


Figura 24. Efeito dos tratamentos na proliferação de células L-929. Todas as barras representam a média \pm DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados os tratamentos entre si em cada concentração através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa.

A FAE foi considerada mais efetiva para a proliferação de fibroblastos, visto manter a viabilidade acima de 100% em cinco das sete concentrações testadas e diferença estatística com relação ao controle em quatro das cinco concentrações com viabilidade maior que 100%. Essa fração semipurificada também apresentou uma viabilidade celular estável entre 62,50 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$, permanecendo acima de 150,0% entre 62,50 – 7,81 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 26 – FAE).

As concentrações efetivas 31,50 – 3,90 $\mu\text{g/mL}$ de EB, 62,50 – 7,81 $\mu\text{g/mL}$ de FAE e 15,62 – 7,81 $\mu\text{g/mL}$ de FAQ foram capazes de aumentar significativamente a proliferação de L-929 (Figura 26). Em concentrações de 3,90 $\mu\text{g/mL}$ também houve aumento da proliferação de fibroblastos, contudo foi menor do que as concentrações consideradas estatisticamente distintas ao controle ($p < 0,05$). As demais não demonstraram efeitos indutores de proliferação.

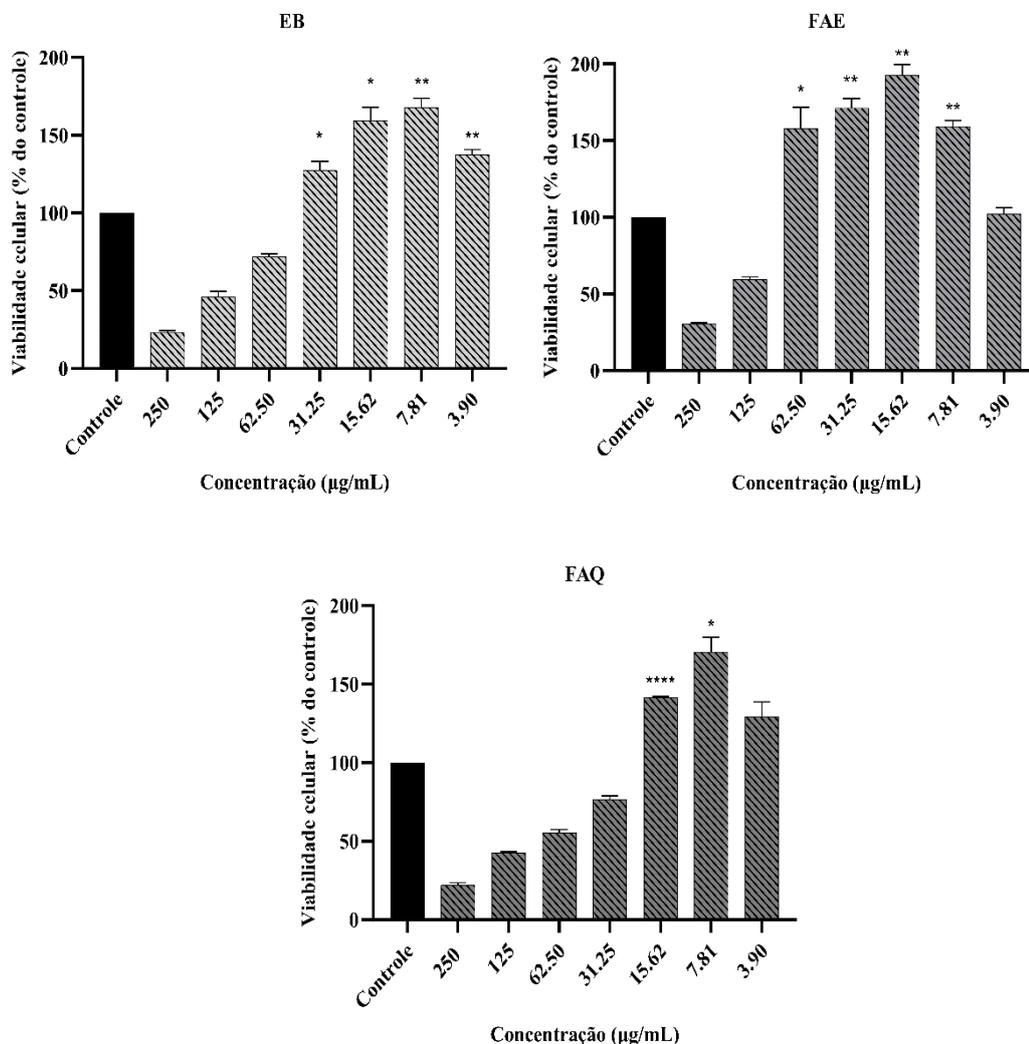


Figura 25. Efeito dos tratamentos na proliferação de células L-929. Todas as barras representam a média \pm DP de três réplicas experimentais. As barras representam a média \pm DP de três réplicas experimentais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$; **** $p < 0,0001$ foram considerados significantes quando comparados ao controle negativo (sem tratamento) através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa.

Para o EB, a partir de 31,25 µg/mL a viabilidade celular foi superior a 100%, já para a FAE foi de 62,50 µg/mL. Além disso, foi constatado que não houve diferença estatística entre as concentrações de 31,50 – 3,90 µg/mL para ambos tratamentos, logo não haverá interferência no tratamento se utilizarmos uma concentração menor ou maior. No entanto, as concentrações de 7,81 e 3,90 µg/mL apresentaram diferença estatística (EB, $p=0,0306$; FAE, $p=0,0008$), visto a queda na viabilidade celular de 167,54 para 137,57% (EB) e 159,25 para 102,12% (FAE) (Figura 22). Portanto, a escolha de dose ideal para futuros ensaios seria entre as concentrações de 31,50 – 7,81 µg/mL.

A concentração de 7,81 µg/mL não apresentou diferença estatística entre os diferentes tratamentos (Figura 25), sendo assim, teoricamente, deverá ser observado o mesmo resultado de proliferação celular ao utilizar o EB, FAE ou FAQ. Durante o uso do gel de *S. adstringens* em concentrações baixas são observados recuperação mais rápida, redução da inflamação local e área de re-epitelização intensa em concentrações menores do que as citotóxicas (Pinto et al., 2015). Os resultados observados *in vivo* corroboram com resultados observados *in vitro*, em que mesmo com a redução da concentração do EB a proliferação celular continua significativa (Figura 23-EB).

A espécie *S. adstringens* é rica em polifenóis (Mello et al., 1999), cujas classes de metabólitos são descritas na literatura como possíveis agentes ou indutores pró ou anti-inflamatórios, como: fator de crescimento fibroblástico (FGF), que atua no fechamento de feridas (Liu et al., 2021); citocinas que estimulam a angiogênese, linfagênese, a deposição de colágeno e re-epitelização (Boakye et al., 2018); fatores derivados de plaquetas (PDGF), que atuam como quimiotáticos na primeira fase de cicatrização de fibroblastos (migração e mitogênese), atração de neutrófilos e monócitos (Du et al., 2021), assim como em fases posteriores estimulando a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, auxiliando na fase de proliferativa (Zubair & Ahmad, 2019).

Quanto ao efeito citotóxico dos tratamentos em células L-929, foi observado concentração citotóxica para 50% da população (CC_{50}) superior a 125 µg/mL, exceto na FAE, com $CC_{50}>250$ µg/mL. Um estudo verificou que a CC_{50} para células Vero foi de 150, 125 e 160 µg/mL para EB, FAE e FAQ, respectivamente. O mesmo estudo também realizou o perfil citotóxico para células macrofágicas (J774G8), encontrando a CC_{50} de 70, 160 e 150 µg/mL para EB, FAE e FAQ (Ishida et al., 2006). Resultados semelhantes para a FAE de *S. adstringens* foram obtidos por Trevisan et al. (2020) para células Vero e HaCat, encontrando citotoxicidade em concentrações superiores a 250 µg/mL para ambas, contudo para a FAQ o resultado foi distinto, sendo de 250 µg/mL. Apesar das serem linhagens celulares dos estudos apresentados

serem diferentes à do presente estudo, é possível observar que os valores não são discrepantes e que tanto o extrato como as frações semipurificadas do Barbatimão possuem um valor de CC_{50} estável tanto para as células humanas (HaCat) quanto de camundongos (L-929) ou macacos (Vero).

5.5 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

As concentrações testadas foram de 31,50 a 7,81 $\mu\text{g/mL}$. De acordo com a análise realizada, os tratamentos apresentaram diferença estatística significativa entre si para a migração celular ($p=0,0011$) (Figura 27). Quando observado a combinação das variáveis tratamento vs tempo, também foi verificado diferença estatística ($p=0,0220$) (Figura 28). Somente as frações de concentração de 7,81 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram diferença estatística (FAE, $p=0,0435$; FAQ, $p=0,0101$) comparado ao controle negativo em 72 h de tratamento (Figura 28). O registro fotográfico do fechamento da ferida pode ser observado na Figura 29.

Constatou-se para os três tratamentos, que a concentração mais efetiva foi de 7,81 $\mu\text{g/mL}$, sendo 55,15% de fechamento da ferida para EB, 61,53% para FAE e 48,95% para FAQ. Não houve diferença estatística significativa entre os três tratamentos, assim como observado no ensaio de proliferação celular.

Ao comparar os resultados de um estudo *in vivo* de feridas causadas em ratos Wistar tratados com uma biomembrana contendo extrato de *S. adstringens* (Alves et al., 2022) notou-se que as porcentagens de fechamento de ferida *in vitro* obtida com os fibroblastos foram semelhantes às observadas *in vivo*. Nessa pesquisa, foi comprovado que aproximadamente 60% da ferida foi reepitelizada em 72 h, uma porcentagem significativamente superior à apresentada pelos controles negativos (ferida aberta ou com membrana de gelatina, $p<0,0001$).

Fibroblastos são células produtoras de colágeno; conseqüentemente, sua proliferação leva ao aumento do aparecimento de fibras colágenas. No mesmo estudo *in vivo*, foi constatada a existência de delicadas fibras de colágeno tipo III no terceiro dia. Além disso, os ratos tratados com o extrato apresentaram uma intensa resposta inflamatória aguda no terceiro dia, com a presença de edema intersticial moderado e infiltrado inflamatório subagudo composto por neutrófilos polimorfonucleares, em associação com linfócitos e macrófagos. No entanto, no grupo controle, não foi observada a presença desse infiltrado celular inflamatório (Alves, 2022).

Em um estudo realizado em ratos, aplicando a pomada FitoScar®, produzida com extrato de Barbatimão a 5,0%, foram observados nos primeiros dias de tratamento uma grande vascularização, presença de crosta fibrino-leucocitária, infiltrado inflamatório, formação de novos vasos e aparecimento de fibroblastos. Com dez dias de tratamento, havia tecido epitelial

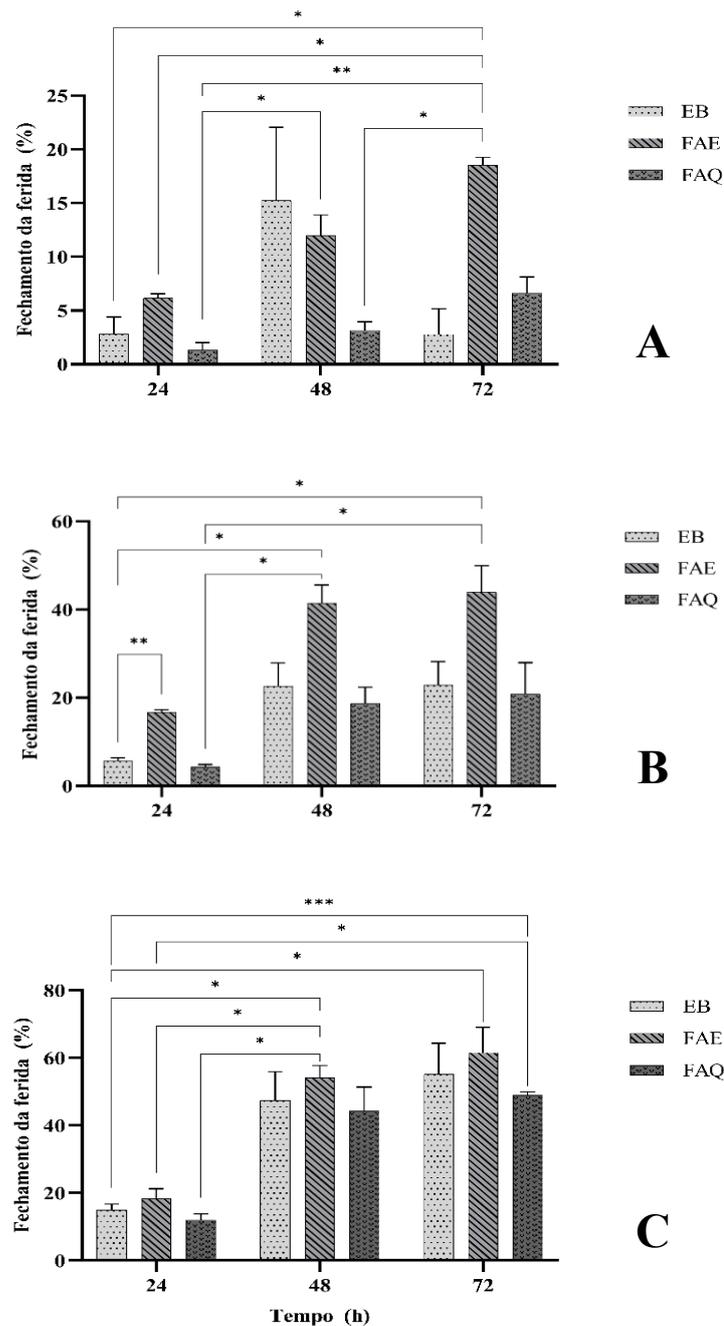


Figura 26. Efeito na migração celular *in vitro* de células L-929 dos tratamentos comparados entre si ao longo dos três dias. Todas as barras representam a média±DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados as concentrações entre cada tratamento em um mesmo tempo através do post hoc de teste de Tukey. EB: extrato bruto; FAE: fração acetato de etila; FAQ: fração aquosa. A: tratamentos com concentração de 31,50 µg/mL; B: tratamentos com concentração de 15,62 µg/mL; C: tratamentos com concentração de 7,81 µg/mL.

refeito e totalmente aderido à derme, com fibroblastos ainda presentes e disposição homogênea de fibras colágenas. Quando comparado ao grupo tratado com soro fisiológico foi observada uma re-epitelização tardia, mas com persistência de células fibroblásticas (Ballaben & Crisi, 2013).

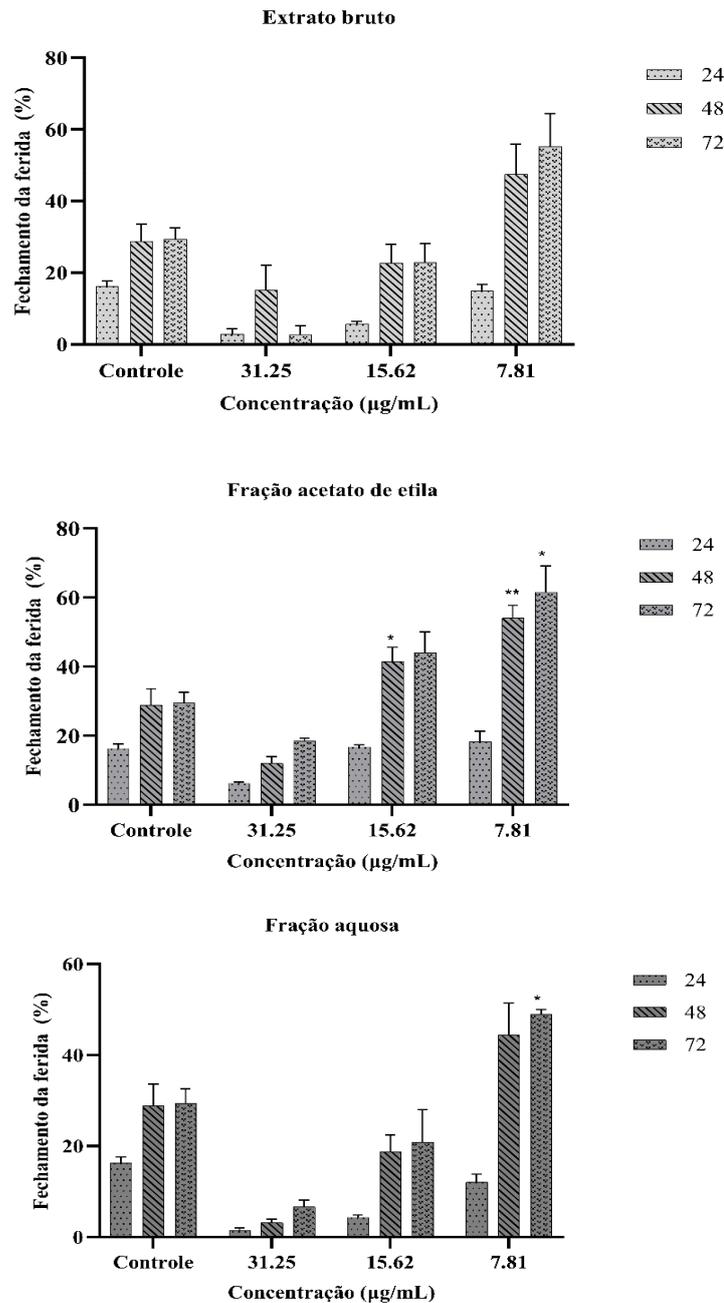


Figura 27. Efeito na migração celular *in vitro* de células L-929 dos tratamentos comparados com o controle. Todas as barras representam a média±DP de três réplicas experimentais. * $p<0,05$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$; **** $p<0,0001$ foram considerados significantes quando comparados as concentrações entre cada tratamento em um mesmo tempo através do post hoc de teste de Tukey.

A migração dos fibroblastos para uma área afetada geralmente ocorre em resposta a estímulos específicos, como lesões ou inflamações. Esse processo de migração é fundamental para o reparo e a cicatrização de tecidos (Nourshargh & Alon, 2014). Durante o processo de cicatrização, a polarização de macrófago tipo M2 influencia na regeneração tecidual, pois este é produtor de citocinas que aumentam a angiogênese e induzem a produção de colágeno por

fibroblastos (Zhu et al., 2017). A IL-6 e o TNF- α são citocinas inflamatórias produzidas por células macrófágicas M1, enquanto a IL-10 e TGF- β são produzidos por macrófagos M2 (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Carvalho et al. (2020) verificaram que o extrato hidroetanólico do Barbatimão possuiu um efeito modulador na polarização funcional de macrófagos M2 e suprimiu moléculas coestimuladores em macrófagos M1, como IL-6. Observou-se que a redução dos níveis de IL-6 e aumento da produção de IL-10 foram mais pronunciados em células tratadas com 25 $\mu\text{g/mL}$ de EB, isto é, em baixa dosagem o extrato hidroetanólico também exerceu efeito.

É descrita na literatura a redução de TNF- α por proantocianidinas (El-Shitany & Edi, 2017) e por taninos hidrolisáveis (Beretta et al., 2009). Logo, extratos ricos em taninos são capazes de atuar como cicatrizantes ao modular citocinas que auxiliam no processo de reepitelização, além de exercerem ação anti-inflamatória.

Um estudo sobre os tecidos de feridas em ratos diabéticos tratadas com gel de *S. adstringens* revelou uma produção significativamente maior de fibras colágenas do tipo III nas feridas tratadas com o gel de EB (1,0%, p/v), em comparação com o controle ($p < 0,05$) (Pinto, 2011). Este resultado pode ser explicado pelos dados do presente estudo, que constataram a estimulação da proliferação de fibroblastos L-929, células produtoras de colágeno.

Wang e colaboradores (2013) conduziram uma investigação *in vitro* sobre o efeito de plantas da Medicina Tradicional Chinesa em fibroblastos primários de derme humana (pNHDF) e queratinócitos (HaCaT), revelando atividade proliferativa dos extratos de Moutan Cortex (casca da raiz de *Paeonia suffruticosa* Andre., Ranunculaceae). A análise fitoquímica das frações apontou à presença de catequina, epicatequina-3-*O*-galato, epicatequina-(4 β →8)-catequina e uma mistura de glucoses-trigaloil, 1,2,3,4,6-pentagaloil-D-glicose, taninos hidrolisáveis, entre outros metabólitos.

O ensaio de viabilidade realizado pelos autores supracitados demonstrou que tanto a fração acetato de etila (flavan-3-óis e procianidinas oligoméricas de menor massa molecular) quanto a aquosa (proantocianidinas de elevada massa molecular) estimularam a proliferação dos fibroblastos e queratinócitos em concentrações menores do que 10 $\mu\text{g/mL}$.

No ensaio de viabilidade celular do presente estudo, não foram observadas disparidades significativas entre as concentrações de 31,50 e 7,81 $\mu\text{g/mL}$, tanto para EB, FAE e FAQ. A aparente equivalência sugere uma possível indiferença na escolha entre as concentrações testadas. No entanto, ao integrar a análise dos ensaios de proliferação e migração celular, emerge uma concentração mais eficaz para futuros ensaios, demonstrando estímulo tanto à

proliferação quanto à migração celular. Sendo assim, a concentração de 7,81 µg/mL destacou-se, exibindo um fechamento de ferida de 55,15% em um período de 72 h.

Ainda sobre a correlação entre os ensaios, observou-se que, similarmente ao ensaio de viabilidade celular (proliferação), não foram constatadas diferenças estatísticas significativas no ensaio de migração entre as concentrações de 7,81 µg/mL nos três tratamentos ao longo dos três dias de análise. Embora a concentração mais eficaz para a proliferação celular com uso FAE tenha sido de 15,62 µg/mL, a análise conjunta de ambos os ensaios revelou a ausência de diferença estatística entre as concentrações de 15,62 e 7,81 µg/mL ao longo do período de tratamento (72 h). Como resultado, a concentração adequada para possíveis ensaios anti-inflamatórios foi de 7,81 µg/mL, aplicável tanto ao EB, à FAE quanto à FAQ.

Em suma, o aumento na proliferação celular de L-292 observado em concentrações menores do que às citotóxicas, corrobora com os resultados observados em tratamentos *in vivo* com gel de Barbatimão em baixa concentração.

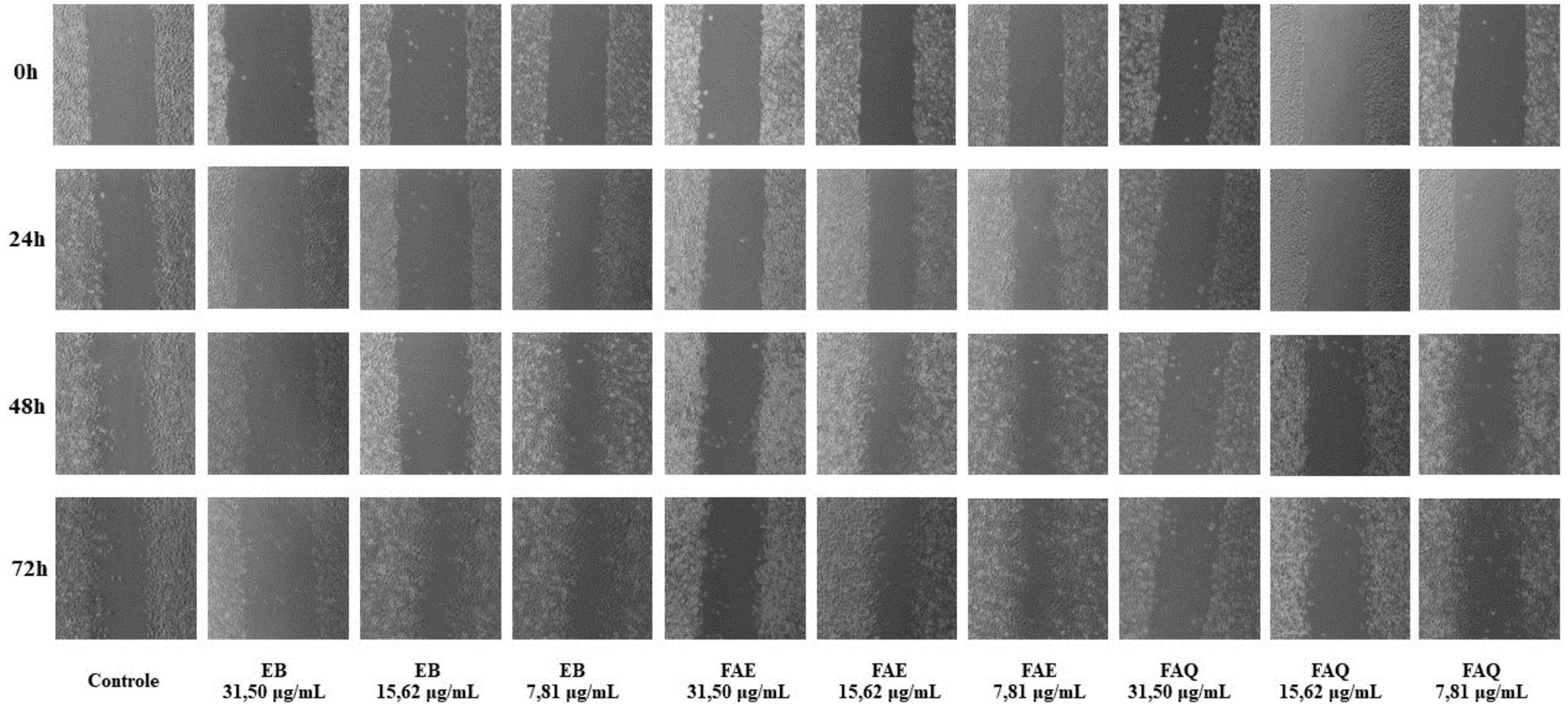


Figura 28. Efeito de distintas concentrações obtidas do extrato bruto (EB), fração acetato de etila (FAE) e fração aquosa (FAQ) de *Stryphnodendron adstringens*. Resultados obtidos no ensaio de migração celular in vitro, sendo as colunas referentes às concentrações de cada amostra e as linhas referentes ao tempo em que foram adquiridas as imagens (0, 24, 48 e 72 h) após a ranhadura realizada com pipeta estéril e administração de tratamento. As imagens foram obtidas por meio do software ZEN Core 9.1 (Carl Zeiss) através de uma câmera Axiocam 105 acoplada o microscópio invertido (Carl Zeiss). Para a análise e mensuração da ferida foi utilizado o software Image J.

6 CONCLUSÕES

Os ensaios qualitativos de controle de qualidade confirmaram a presença de taninos, e os quantitativos com teor de polifenóis semelhante aos encontrados na literatura. Por meio da análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas foi possível identificar na FAE o ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, 4'-*O*-metil-galocatequina, 4'-*O*-metil-epigalocatequina, e epigalocatequina-3-*O*-galato, assim como constatar a presença de dímeros e trímeros de prodelfinidinas.

A avaliação da viabilidade celular demonstrou que a FAE exerceu menor efeito citotóxico e maior efeito proliferativo em células da linhagem L-929, em comparação ao EB e FAQ, em 24 h de exposição. Tanto o EB quanto a FAE e FAQ demonstraram atividade indutora de proliferação celular em baixas concentrações. No ensaio de migração celular a FAE apresentou o melhor resultado quanto ao fechamento de ferida *in vitro* no período de 72 h.

Logo, esta pesquisa demonstrou a aplicação de modelo *in vitro* com células L-929, assim como ampliou os dados sobre o efeito cicatrizante de *S. adstringens*, ao confirmar que sua atuação ocorre na primeira, terceira e quarta etapa do processo de cicatrização. As concentrações encontradas direcionam o desenvolvimento de futuros estudos que poderão explorar os mecanismos de ação relacionados com as fases inflamatória e angiogênica da cicatrização.

REFERÊNCIAS

Obs: as referências estão de acordo com a American Psychological Association (APA)

- Ahmad, J., & Zubair, M. (2019). Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: a detailed review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 20(1), 207-217.
- Al Kayal, T., et al. (2021). Plasminogen-loaded fibrin scaffold as a drug delivery system for wound healing applications. *Pharmaceutics*, 14(1).
- Alves, M. C. M. A., et al. (2022). Hydrophilic scaffolds containing extracts of *Stryphnodendron adstringens* and *Abarema cochliacarpa* for wound healing: *in vivo* proofs of concept. *Pharmaceutics*, 14(1), 2150.
- Antwi-Boasiako, C., & Animapauh, S. O. (2012). Tannin extraction from the barks of three tropical hardwoods for the production of adhesives. *Journal of Applied Science Research*, 8(6), 2959–2965.
- Apel, F., Zychlinsky, A., & Kenny, E. F. (2018). The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nature Reviews: Rheumatology*, 14, 467-475.
- Aquino, A. J. (2018). Diferenciação química de quatro espécies de Bauhinia (Pata-de-vaca). Tese (Doutorado em Ciências com ênfase em Química), Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, p. 54-55
- ATCCI. NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L]. CCL-1tm. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/ccl-1>
- Audi, E. A., Toledo, D. P., Peres, P. G., Kimura, E., Pereira, W. K. V., Mello, J. C. P., Nakamura, C., Alves-do-Prado, W., Cuman, R. K. N., & Bersani-Amado, C. A. (1999). Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, 13, 264-266.
- Ayadi, A. E., Jay, J. E., & Prasai, A. (2020). Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3), 1105.
- Bachetti, T., & Morbidelli, L. (2000). Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacological Research*, 42, 9-19.
- Ballaben, A. S., & Crisci, A. R. (2013). Efeito da pomada de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman* 84artius) associado ao ultrassom de baixa intensidade sobre a cicatrização por segunda intenção de lesões cutâneas totais em ratos. *Revista Uniara*, 16.
- Beretta, G., Rossoni, G., Santagati, N. A., & Facino, R. M. (2009). Anti-ischemic activity and endothelium-dependent vasorelaxant effect of hydrolysable tannins from the leaves of *Rhus coriaria* (sumac) in isolated rabbit heart and thoracic aorta. *Planta Medica*, 75(14), 1482–1488.
- Bersani-Amado, C. A., Nakamura, C. V., Ueda-Nakamura, T., Martinez, M., & Mello, J. C. P. (1996). Avaliação das atividades antiinflamatória e antibacteriana do extrato bruto do *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 14.

- Blainski, A., Lopes, G. C., & Mello, J. C. P. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium 85artius85e85e L.* *Molecules*, *18*, 6852–6865.
- Boakye, Y. D., Agyare, C., Ayande, G. P., Titiloye, N., Asiamah, E. A., & Danquah, K. O. (2018). Assessment of Wound-Healing Properties of Medicinal Plants: The Case of *Phyllanthus muellarianus*. *Frontiers in Pharmacology*, *9*, 945.
- Boelga, C. S., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal Scientific Food Agriculture*, *80*, 1094–1117.
- Bowers, S., & Franco, E. (2020). Chronic Wounds: Evaluation and management. *American Family Physician*, *101*(3), 159-166.
- Brasil, Ministério da Saúde. (2008). PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 2.960 de 09 de junho de 2008. Aprova o programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e cria o comitê nacional de plantas medicinais e fitoterápicos.
- Brasil, Ministério da Saúde. (1967). PORTARIA Nº 22 de 30 outubro de 1967. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas.
- Brasilia, Ministério da Saúde. (2006). PORTARIA Nº 917 de 03 maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS.
- Brasília, Ministério da Saúde. (2006). DECRETO Nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências.
- Brasil. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. Espécies vegetais. DAF/SCTIE/MS - RENISUS - fev/2009.
- Bruyne, T. D. (1999). Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, *27*, 445-459.
- Buelga, C. S., & Scalbert, A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal Scientific Food Agriculture*, *80*, 1094-1117.
- Burn, G. L., et al. (2021). The Neutrophil. *Immunity*, *54*, 1377–1391.
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, *473*, 298–307.
- Carvalho, A. C. B., Branco, P. F., Fernandes, L. A., Marques, R. F. O., Cunha, S. C., & Perfeito, J. P. S. (2012). Regulação brasileira em plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Fitos*, *7*.
- Carvalho, J. R. G., et al. (2020). Hydroethanolic stem bark extracts of *Stryphnodendron adstringens* impair m1 macrophages and promote m2 polarization. *Journal of Ethnopharmacology*, *254*, 112684.
- Cheng, X., et al. (2013). Gestational diabetes *mellitus* impairs Nrf2-mediated adaptive antioxidant defenses and redox signaling in fetal endothelial cells in utero. *Diabetes*, *62*, 4088–4097.

- Chierrito, D., et al. (2019). Using cell cultures for the investigation of treatments for attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *Current Neuropharmacology*, 17, 916–925.
- Chedjou, I. N.; Ngouagong, F. T.; Tchuenguem R. T.; Dzoyem, J. P.; Ponou, B. K.; Teponno, R. B.; Barboni, L.; Tapondjou, L. A. (2023). Siamoside A: a new C-glycosylated flavone from *Senna siamea* (Lam.) H. S. Irwin & Barneby (Caesalpiniaceae). *Natural Product Research*, 37(20)
- Costa, M. A.; Ishida, K.; Kaplum, V.; Kosly, E. D. A.; Mello, J. C. P.; Ueda-Nakamura, T. Filho Dias, B. P.; Nakamura, C. V. (2010). Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 58, 330-335.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. 2006. Fundamentos de cromatografia, Campinas: Editora Unicamp p. 251 – 252.
- Cronquist, A. (1988). *The Evolution and Classification of Flowering Plants* (2nd ed.). New York: The New York Botanical Garden.
- Das, A., et al. (2021). Bleeding with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase: a network meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 157, 103186.
- Das, A. K., Islam, M. N., Faruk, M. O., & Ashaduzzaman, M. (2020). Review on tannins: extraction processes, applications and possibilities. *South African Journal of Botany*, 135, 58-70.
- Davidson, S., Coles, M., Thomas, T., et al. (2021). Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation, and cancer. *Nature Reviews Immunology*, 21, 704–717.
- Demarque, D. P.; Crotti, A. E. M.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products (2016). *Natural Product Reports*, 33, 432.
- Du, Y., et al. (2021). Naringenin: a promising therapeutic agent against organ fibrosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 1-13.
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1768–1774.
- Driskell, R. R.; Lichtenberger, B. M.; Hoste, E.; Kretschmar, K.; Simons, B. D.; Charalambous, M.; Ferron, S. R.; Herault, Y.; Pavlovic, G.; Ferguson-Smith, A. C.; Watt, F. M. (2013). Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature*, 504, 277-281.
- Dvorak, H. F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 20, 4368-4280.
- El-Shitany, N. A., & Eid, B. (2017). Proanthocyanidin protects against cisplatin-induced oxidative liver damage through inhibition of inflammation and NF-kappaB/TLR-4 pathway. *Environmental Toxicology*, 32(7), 1952–1963.

- Fabbrini, M., et al. (2022). Polyphenol and tannin nutraceuticals and their metabolites: how the human gut microbiota influences their properties. *Biomolecules*, 12(7), 875.
- Falanga, V.; Isseroff, R. R.; Soulika, A. M.; Romanelli, M.; Margolis, D.; Kapp, S.; Granick, M.; Harding, K. (2022). Chronic wounds, *Nature Reviews: Disease Primers*, 8(50), 1-21.
- Farmacopeia Brasileira. 6. Ed. Plantas medicinais. Brasília: ANVISA, 2019. V. 2
- Ferrari, G., Cook, B. D., Terushkin, V., Pintucci, G., & Mignatti, P. (2009). Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis. *Journal Cellular Physiology*, 219(2), 449-458.
- Gomes, P.; Quirós-Guerrero, L.; Silva, C.; Pamplona, S.; Boutin, J. A.; Eberlin, M.; Wolfender, J. L.; Silva, M. (2021). Feature-based molecular network-guided dereplication of natural products from leaves of *Stryphnodendron pulcherrimum* (Willd.) Hochr. *Metabolites*, 11, 281
- Gonçalves, R. V., et al. (2010). Effects of gallium-arsenide laser, gallium-aluminum-arsenide laser, and healing ointment on cutaneous wound healing in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43, 350-355.
- Guzik, T. J., Korbout, R., & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 54(4), 469-487.
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 3rd ed. London: Chapman & Hall.
- Haslam, E. (1998). *Practical polyphenolics: From structure to molecular recognition and physiological action*. Cambridge: Cambridge University Press, 155-163.
- Hashimoto, F.; Nonaka, G.I.; Nishioka, I. (1989). Tannins and related compounds. XC.¹⁾ 8-C-Ascorbyl (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate and Novel Dimeric Flavan-3-ols, Oolonghomobisflavans A and B, from Oolong Tea. (3). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37(12), 3255-3263
- Hemingway, R. W., & Karchesy, J. J. (1989). *Chemistry and significance of condensed tannins*. New York: Plenum Press.
- Hensel, A., & Symma, N. (2022). Advanced analysis of oligomeric proanthocyanidins: Latest approaches in liquid chromatography and mass spectrometry-based analysis. *Phytochemistry Reviews*, 21, 809-833.
- Hernandes, L., et al. (2010). Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(3), 431-436.
- Herrero-Cervera, A., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory disease. *Cellular & Molecular Immunology*, 19, 177-191.
- Hillis, W. E. (1997). Tannin chemistry. In: Brown, A.G., Ko, H.C. (Eds.), *Black wattle and its utilization*. 97/72, RIRDC Publication, 167.

- Infanger, M., Schmidt, O., Kossmehl, P., Grad, S., Ertel, W., & Grimm, D. (2004). Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns*, *30*, 305-311.
- Ishida, K., Mello, J. C. P., Cortez, D. A. G., Dias Filho, B. P., Ueda-Nakamura, T., & Nakamura, C. V. (2006). Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*, 942-949.
- Ishida, K., Rozental, S., Mello, J. C. P., & Nakamura, C. V. (2009). Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: Effects on growth, capsule size, and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *8*(29), 1-10.
- Ikarashi N.; Toda T.; Okaniwa T.; Ito, K.; Ochiai, W.; Sugiyama, K. (2011). Anti-obesity and anti-diabetic effects of acacia polyphenol in obese diabetic KKAy mice fed high-fat diet. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, *2011*, 952031
- Jescheke, M. G.; van Baar, M. E.; Choudhry, M. A.; Chung, K. K.; Gibran, N. S.; Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nature Reviews: disease primers*, *6*(11), 4.
- Kashiwada, M.; Nakaishi, S.; Usuda, A.; Miyahara, Y.; Katsumoto, K.; Katsura, K.; Terakado, I.; Jindo, M.; Nakajima, S.; Ogawa, S.; Sugiyama, K; Ochiai, W. (2021). Analysis of anti-obesity and anti-diabetic effects of acacia bark-derived proanthocyanidins in type 2 diabetes model KKAy mice. *Journal of Natural Medicine*, *75*, 893–906.
- Krambeck, K. (2020). Lipid nanocarriers containing *Passiflora edulis* seed oil intended for skin application. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *193*, 111057.
- Lai, J. Y., et al. (2004). Mitosis increases levels of secretory leukocyte protease inhibitor in keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *316*(2), 316-407.
- Lande, R., et al. (2011). Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus. *Science Translational Medicine*, *3*, 73ra19.
- Lerf, A., & Wagner, F. E. (2016). Model compounds of iron gall inks – a Mössbauer study. *Hyperfine Interactions*, *237*(1), 13–18.
- Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B., & Lock, M. (2005). Legumes of the world. Kew, Royal Botanic Gardens, 1-19.
- Lewis, G. P., & Schrire, B. D. (2003). Leguminosae or Fabaceae? In B. B. Klitgaard & A. Bruneau (Eds.), *Advances in Legume Systematics: Higher Level Systematics*. Part 10. The Royal Botanic Gardens, 1-3.
- Li, Z., Li, Y., Liu, S., & Qin, Z. (2020). Extracellular S100A4 as a key player in fibrotic diseases. *Journal of Cell Molecular Medicine*, *24*(11), 5973-5983.
- Lima, A. G., Paula-Souza, J., Ringelber, J. J., Simon, M. F., Queiroz, L. P., Borges, L. M., Mansano, V. F., Souza, V. C., & Scalón, V. R. (2022). New segregates from the neotropical genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Mimosoid Clade). *PhytoKeys*, *205*, 203-237.

- Lima, J. C. S., et al. (1998). Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research*, 12, 218-220.
- Lima, T. C. D., et al. (2016). Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. *Fitos*, 10(3), 220-372.
- Lin, Y. L., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., & Ho, C. T. (1999). Theaflavin-3,30-digallate from black tea blocks the nitric oxide synthase by downregulating the activation of NF-kappaB in macrophages. *European Journal of Pharmacology*, 367, 379-388.
- Liu, Y., Liu, Y., Deng, J., Li, W., & Nie, X. (2021). Fibroblast growth factor in diabetic foot ulcer: progress and therapeutic prospects. *Frontiers in Endocrinology*, 12, 744868.
- Liu, Z. L., et al. (2023). Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(198).
- Lokman, N. A., et al. (2012). Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(8), 9959-9970.
- Legume Phylogeny Working Group (LPWG). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44-77.
- Legume Phylogeny Working Group (LPWG). (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects, and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248.
- Luck, G., et al. (1994). Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, 37(2), 357-371.
- Luiz, R. L. F., Vila, T. V. M., Mello, J. C. P., Nakamura, C. V., Rozental, S., & Ishida, K. (2015). Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15, 68.
- Luo, Y., Jian, Y., Liu, Y., Jiang, S., Muhammad, D., & Wang, W. (2022). Flavanols from Nature: A Phytochemistry and Biological Activity Review. *Molecules*, 27(3), 719.
- Machado, F. A. V. (2005). Estudo Fitoquímico e valiação da capacidade antioxidante de extratos das cascas de *Stryphnodendron polyphyllum* mart., leguminosae, barbatimão. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas., Universidade Estadual Paulista ‘Julio de mesquita filho’, Araraquara, p. 20, 2005.
- Maciag, T., Hoover, G. A., Stemerman, M. B., & Weinstein, R. (1981). Serial propagation of human endothelial cells *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, 91, 420-426.
- Manconi, F., Markham, R., & Fraser, I. S. (2000). Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods in Cell Science*, 22, 89-99.
- Martins, D. T., Lima, J. C., & Rao, V. S. (2002). The acetone-soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. *Phytotherapy Research*, 16, 427-431.

- Mello, J. C. P., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1999). A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, *51*, 1105-1107.
- Mello, J. C. P., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1996a). Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, *41*(3), 807-813.
- Mello, J. C. P., Petereit, F., & Nahrstedt, A. (1996b). Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, *42*(3), 857-862
- Mello, J. C. P.; Santos, S. C. Taninos. *In: Simões, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2016
- Melo, B. A. G., Benincasa, J. C., Cruz, E. M., Maricato, J. T., & Porcionatto, M. A. (2021). 3D culture models to study SARS-CoV-2 infectivity and antiviral candidates: From spheroids to bioprinting. *Biomedical Journal*, *44*, 31-42.
- Morey, A. T., et al. (2016). Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *17*(4), 365-375.
- Nascimento, M. A. (2008). Avaliação da qualidade de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville. Dissertação de mestrado, Curso de Pós-Graduação UFMG, Belo Horizonte, 159f.
- Negrão, R., et al. (2013). Different effects of catechin on angiogenesis and inflammation depending on VEGF levels. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *24*, 435-444.
- Neves, L. M. G., Wilgus, T. A., & Bayat, A. (2023). *In vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* approaches for investigation of skin scarring: Human and animal models. *Advances in Wound Care*, *12*(2), 97-116.
- Niu, H.; Chao, Y.; Li, K.; Li, J.; Gong, W.; Huang, W. (2015). Robinetinidol-flavone attenuates cholesterol synthesis in hepatoma cells via inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Molecular Medicine Reports*, *11*, 561-566
- Nizamutdinova, I. T., et al. (2009). Anthocyanins from black soybean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. *Food and Chemical Toxicology*, *47*, 2806-2812.
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, *41*(5), 694-707.
- Occhioni, E. M. L. (1990). Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-Mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. *Acta Bot. Bras.*, *4*, 153-158.
- Okonkwo, E. A., & DiPietro, L. A. (2017). Diabetes and wound angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*.
- Onat, D., et al. (2011). Human vascular endothelial cells: A model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis. *Curr. Diab. Rep.*, *11*, 193-202.

- Pellenz, N. L., Barbisan, F., Azzolin, V. F., Marques, L. P. S., Mastella, M. H., Teixeira, C. F., Ribeiro, E. E., & Cruz, I. V. M. (2019). Healing activity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), a Brazilian tannins rich species: A review of the literature and a case series. *Wound Medicine*, 26, 100163.
- Penna, M. Dicionário brasileiro de plantas medicinais. 3. Ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946.
- Pereira Junior, L. C. S., Oliveira, E. D., Rorig, T. D. V., Araújo, P. I. P., Sanchez, E. F., Garret, R., Mello, J. C. P., & Fuly, A. L. (2020). The plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of Bothrops jararacussu snake venom. *Toxicon*, 186, 182-190.
- Pérez, M., Dominguez-López, L. E., & Lamuela-Raventós, R. M. (2023). The chemistry behind the Folin-Ciocalteu method for the estimation of (poly)phenol content in food: Total phenolic intake in a Mediterranean dietary pattern. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(46), 17543-17553.
- Pinto, S. C. G. *Stryphnodendron adstringens*: análise fitoquímica e biológica *in vitro* e *in vivo*. (2011). Dissertação – (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p.23-24.
- Pinto, S. C., G., Buneo, F. G., Panizzon, G. P., Morais, G., Santos, P. V. P., Baesso, M. L., Leite-Mello, E. V. S., & Mello, J. C. P. (2015). *Stryphnodendron adstringens*: clarifying wound healing in streptozotocin-induced diabetic rats. *Planta Medica*, 81, 109-1096.
- Pittito, B. A.; Bahia, L. Melo, K. 2023. Dados Epidemiológicos do diabetes *mellitus* no Brasil. Sociedade Brasileira de Diabetes.
- Plants of the World Online (POWO). Fabaceae Lindl. Royal Botanic Gardens Kew, 2024. Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30000147-2>. Acesso em: 05 abril 2024.
- Rada, B., & Leto, T. L. (2013). Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends in Microbiology*, 21, 73–81.
- Rebecca, M. A., et al. (2002). Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 83, 101-104.
- Reinke, J. M., & Sor, H. (2012). Wound repair and regeneration. *European Surgical Research*, 49, 35-43.
- Ribeiro, M. M. S., Santos, L. C., Novais, N. S., Viganó, J., & Veggi, P. C. (2022). An evaluative review on *Stryphnodendron adstringens* extract composition: current and future perspectives on extraction and application. *Industrial Crops and Products*, 187, 2022
- Ribeiro, T. D. V. R. (2018). Fração aquosa de barbatimão: avaliação de sua composição química e atividade biológica em células de neuroblastoma humano sh-sy6y. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, p. 58, 2018

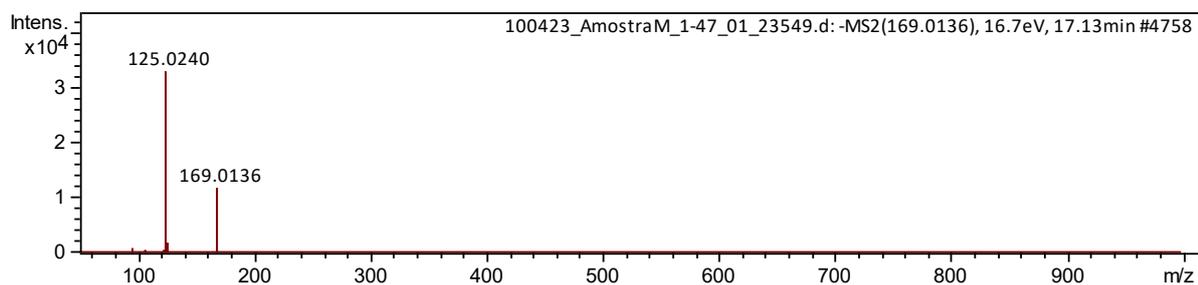
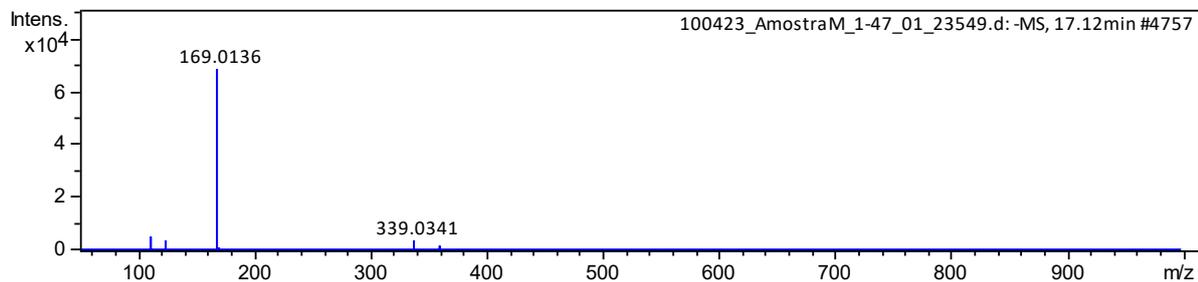
- Rós, A. S., et al. (2020). Can *Stryphnodendron adstringens* extract improve the results of fistulotomy followed by primary sphincteroplasty in the treatment of transsphincteric fistulae? *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 33(3), e1540.
- Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 8, e816460.
- Roth, G. A. (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 392, 1736–88.
- Roulis, M., & Flavell, R. A. (2016). Fibroblasts and myofibroblasts of the intestinal lamina propria in physiology and disease. *Differentiation*, 92(3), 116–131.
- Röszer, T. (2015). Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1-16.
- Sanches, A. C. C., Lopes, G. C., Toledo, C. E. M., Sacramento, L. V. S., Sakuragui, C. M., & Mello, J. C. P. (2007). Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* – Leguminosae. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(3), 362-368.
- Santiago, L. Q. (2022). Estudo sobre estruturas de galato de ferro (III). Monografia (Bacharelado em Química). Instituto de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2022.
- Santos, V. R., Gomes, R. T., Oliveira, R. R., Cortés, M. E., & Brandão, M. G. L. (2009). Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). *International Journal of Dentistry*, 8, 1-5.
- Sato, M., Shay, J. W., & Minna, J. D. (2020). Immortalized normal human lung epithelial cells models for studying lung cancer biology. *Respiratory Investigation*, 58(5), 344-354.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
- Scalon, V. R., Paula-Souza, J., & Lima, A. G. Souza, V. C. (2022). A synopsis of the genus *Stryphnodendron* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Mimosoid clade). *PhytoKeys*, 544(3), 227-279.
- Schachnik, N. C. C. (2008). Uso da citometria de fluxo para análise de óxido nítrico intracelular em monócitos e neutrófilos do sangue periférico de pacientes com nefropatia crônica do enxerto. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de farmácia, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 58-61
- Sereia, A. L. Avaliação *in vitro* dos efeitos protetores de extratos vegetais contra toxicidade induzida por β 25-35 em células SH-SY5Y. (2019). Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. p.9.
- Shapouri-Moghaddam, A., et al. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6425-6440.
- Singh, D., Singh, D., Choi, S. M., Zo, S. M., Painuli, R. M., Kwon, S. W., & Han, S. S. (2014). Effect of extracts of *Terminalia chebula* on proliferation of keratinocytes and fibroblasts cells:

- An alternative approach for wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 701656.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Sivaraman, K., Sujitha, P., Arunkumar, A., & Shanthi, C. (2022). Biocompatible films of collagen-procyanidin for wound healing applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194, 4002-4017.
- Souza, V. C.; Flores, T. B.; Lorenzi, H. 2013. Introdução à Botânica: morfologia.2. Ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, p. 94
- Strijdom, H., Muller, C., & Lochner, A. (2004). Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: Flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 37(4), 897-902
- Symma, N., & Hensel, A. (2022). Advanced analysis of oligomeric proanthocyanidins: Latest approaches in liquid chromatography and mass spectrometry-based analysis. *Phytochemistry Reviews*, 21, 809-833.
- Tammela, T., et al. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 65, 550-563
- Toledo, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico das cascas de extratos de *Stryphnodendron adstringens* (93 artius) coville, leguminosae. (2002). Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas., Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- Trevisan, D. A. C.; Silva, P. V.; Farias, A. B. P.; e Campanerut-Sá, P. A. Z.; Ribeiro, T. D. V. R.; Faria, D. R.; Mendonça, P. S. B.; Mello, J. C. P.; Seixas, F. A. V.; Mikcha, J. M. G. (2020). Antibacterial activity of barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) against staphylococcus aureus: *in vitro* and *in silico* studies. *Letters in applied microbiology*, 71(3), 259-271.
- Usman, M., et al. (2022). Exploring the phytochemicals and anti-cancer potential of the members of Fabaceae family: A comprehensive review. *Molecules*, 27, 3863.
- Vailhe, B., Vittet, D., & Feige, J. J. (2001). *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. *Laboratory Investigation*, 81, 439-452.
- Veloso, s. r. s. a função endotelial e actividade da placa na doença coronária. Dissertação (mestrado em biologia humana e ambiente) – faculdade de ciências, universidade de lisboa, lisboa, p. 36, 2010.
- Vieira, F. C.; Leite-Mello, E. V. S.; Mello, J. C. P. (1998). Cicatrização cutânea em feridas de ratos após aplicação tópica de pomadas de barbatimão e nebacetin. *In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, águas de Lindóia-sp, resumos*, p.15
- Vital, B. R., et al. (2004). Adesivos à base de taninos das cascas de duas espécies de eucaliptos para produção de chapas de flocos. *Revista Árvore*, 28(4), 571-582.

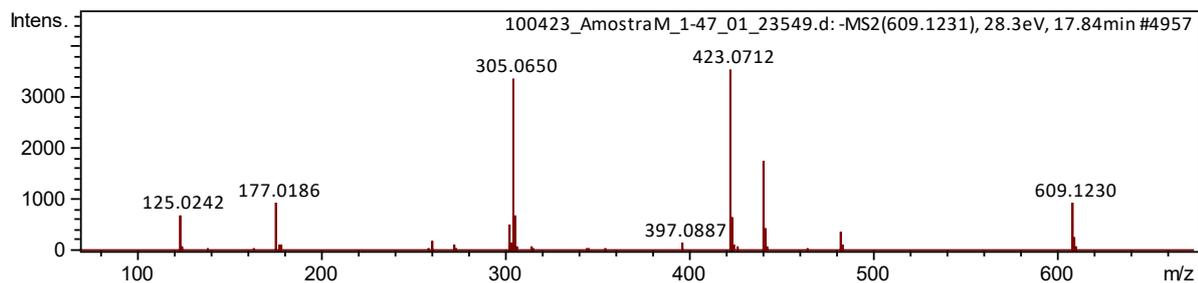
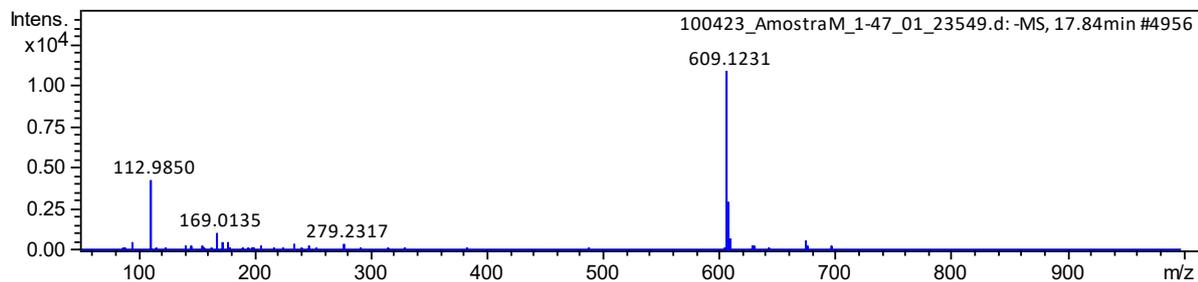
- Waes, C., Burger, A. M., & Lautenberger, J. A. (1998). A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. *Carcinogenesis*, *19*, 673-681.
- Wang, R., et al. (2013). Wound-healing plants from TCM: *In vitro* investigations on selected TCM plants and their influence on human dermal fibroblasts and keratinocytes. *Fitoterapia*, *84*, 308-317.
- Wei, K., Nguyen, H. N., & Brenner, M. B. (2021). Fibroblast pathology in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation*, *131*(20), e149538.
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, *10*, 200223.
- World Flora Online (WFO) Plant List: Snapshots of the taxonomy. Disponível em: <https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-6500000806-2023-12?page=10>. Acesso em: 05 abril 2024
- Yan, H. Y., et al. (2018). Tug1 promotes diabetic atherosclerosis by regulating proliferation of endothelial cells via Wnt pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *22*(20), 6922-6929.
- Yousefi, K., et al. (2017). An *in vitro* ethnopharmacological study on Prangos ferulacea: A wound healing agent. *Bioimpacts*, *7*(2), 75-82.
- Zhao, Y., et al. (2017). Theoretical and practical aspects of using fetal fibroblasts for skin regeneration. *Ageing Research Reviews*, *24*, 36-41.
- Zhu, Z., et al. (2017). Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts. *The International Journal of Tissue Repair and Regeneration*, *25*, 377-388.
- Zubair, M., & Ahmad, J. (2019). Role of growth factors and cytokines in diabetic foot ulcer healing: A detailed review. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *20*, 207-217.

APÊNDICE

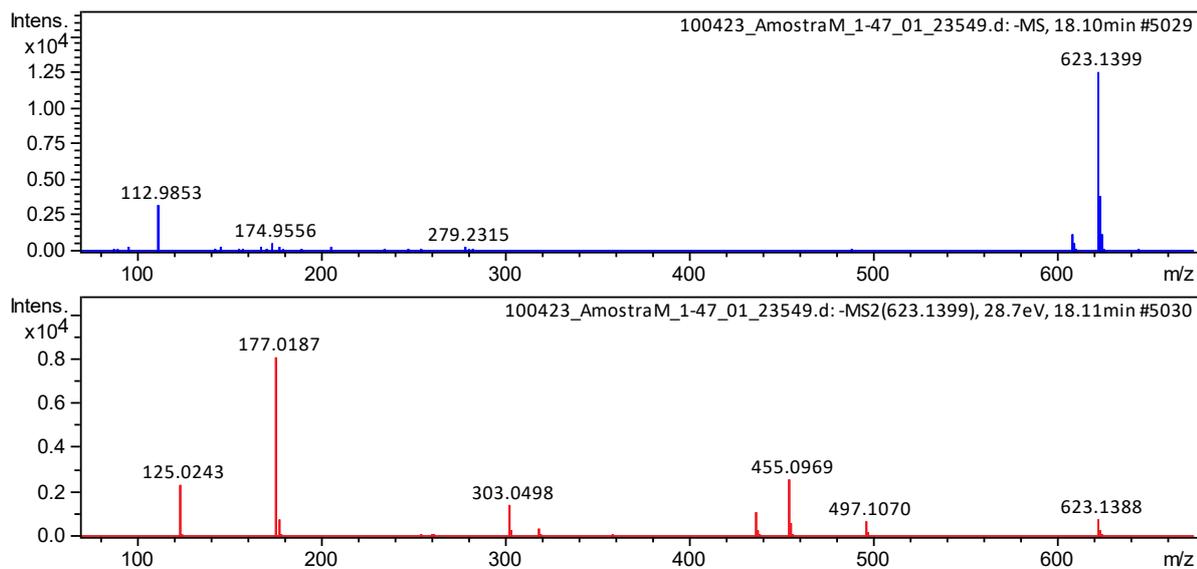
APÊNDICE A – ESPECTROS DE MASSAS OBTIDOS A PARTIR DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DE *Stryphnodendron adstringens*



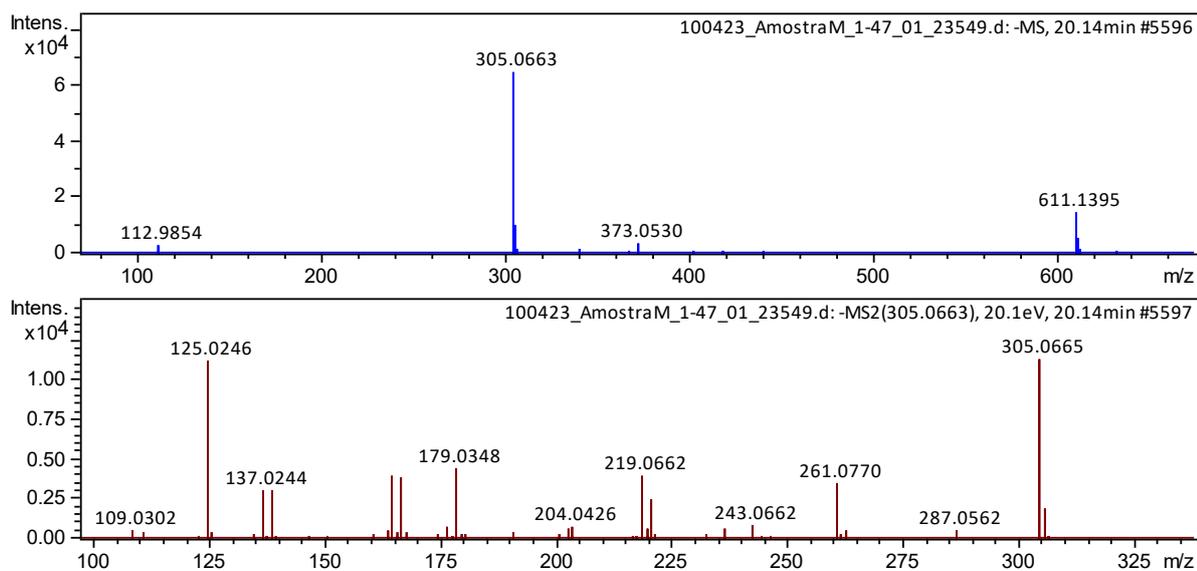
Pico 1. Íon precursor m/z 169,0137 $[M - H]^-$: ácido gálico;



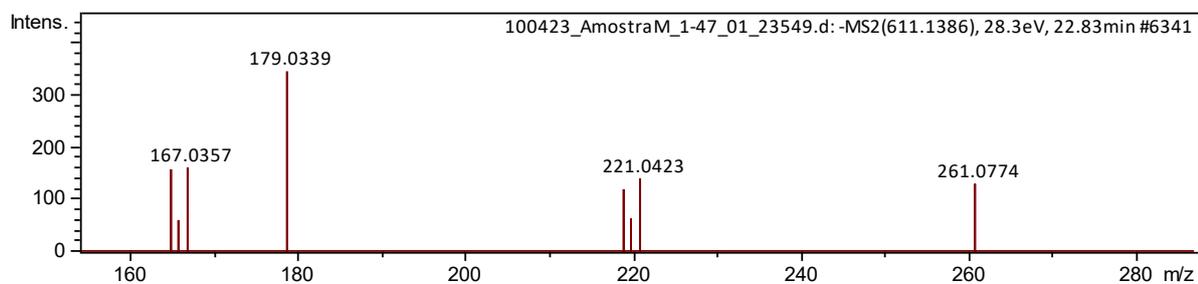
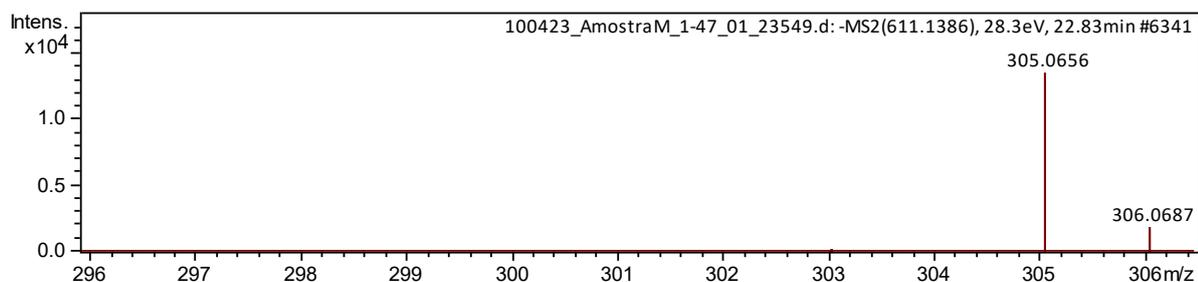
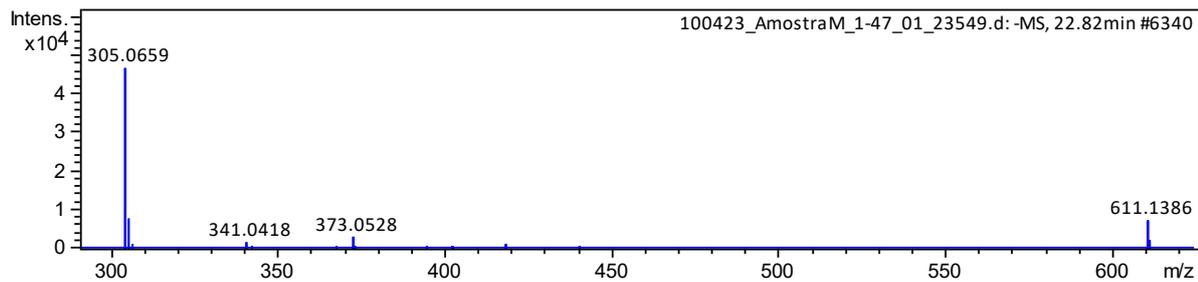
Pico 2. Íon precursor m/z 609,1231 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDE;



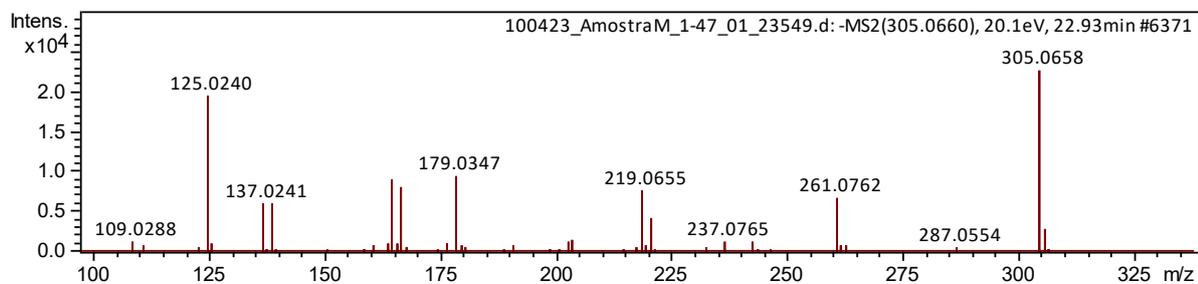
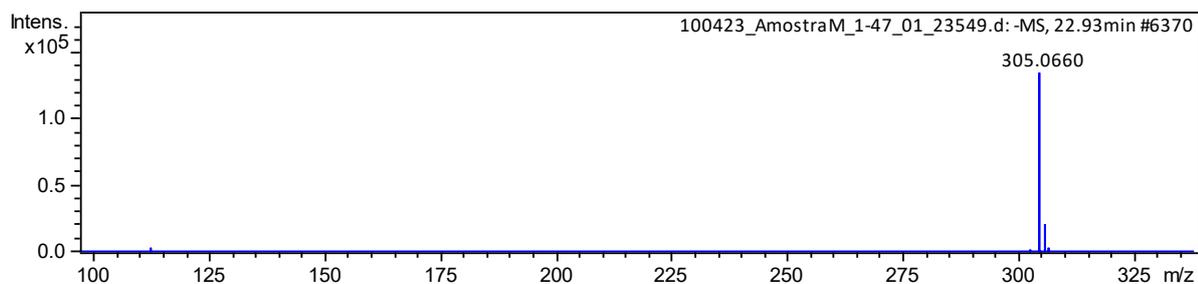
Pico 3. Íon precursor m/z 623,1399 $[M - H]^-$;



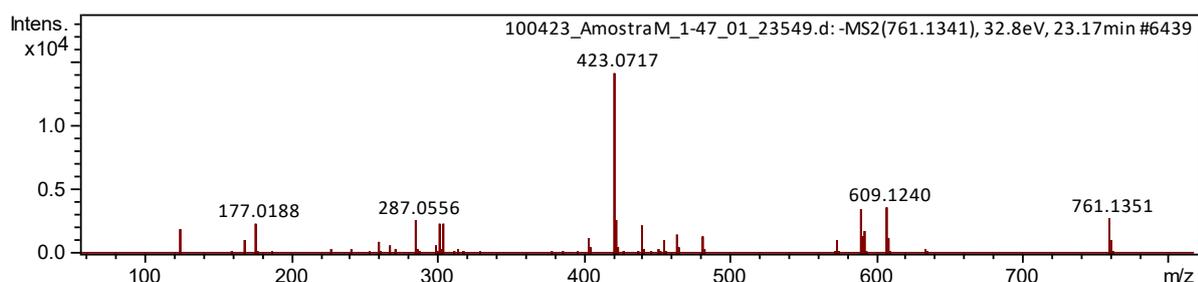
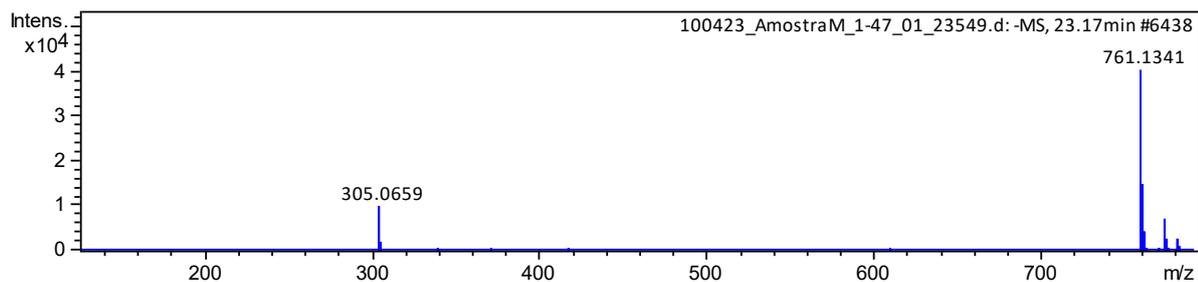
Pico 4. Íon precursor m/z 305,0663 $[M - H]^-$: galocatequina;



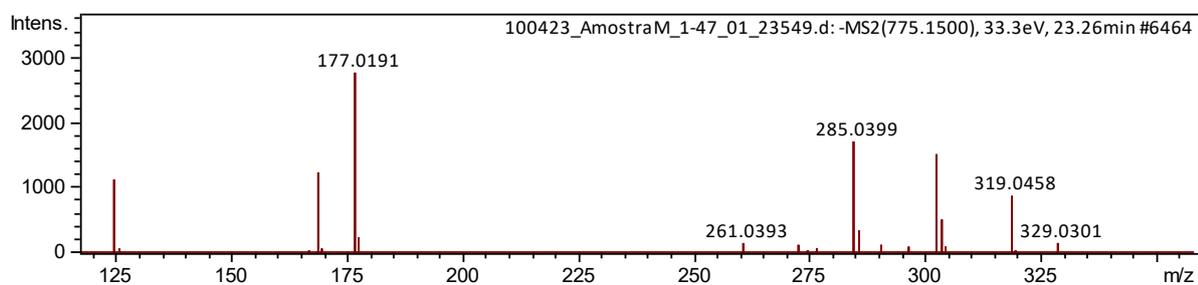
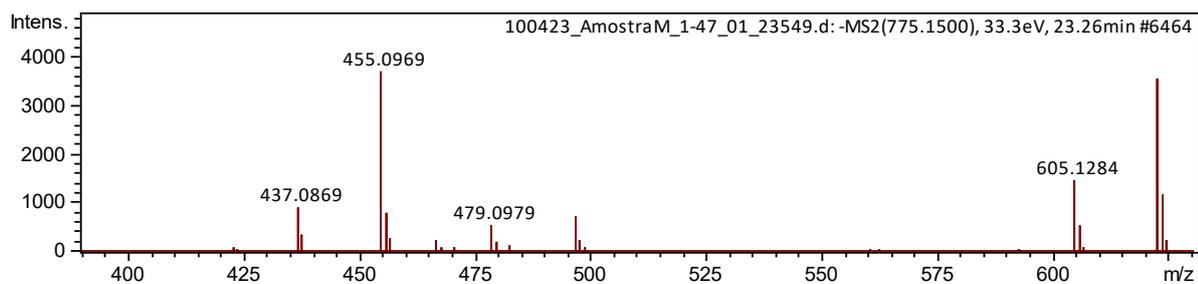
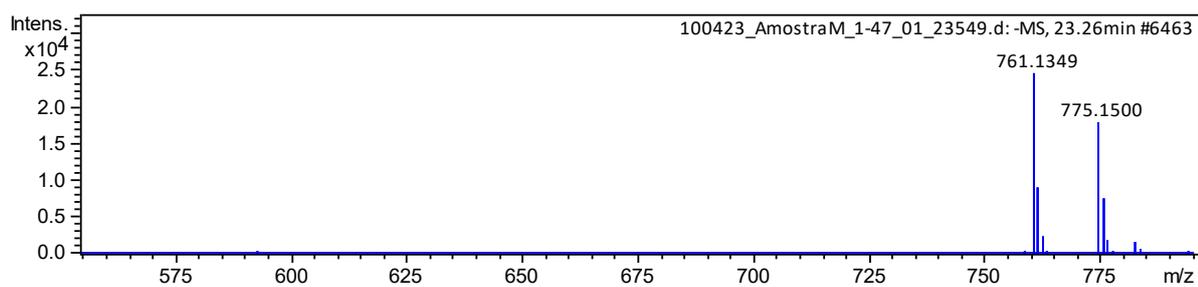
Pico 5. Íon precursor de m/z 611,1386 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDE;



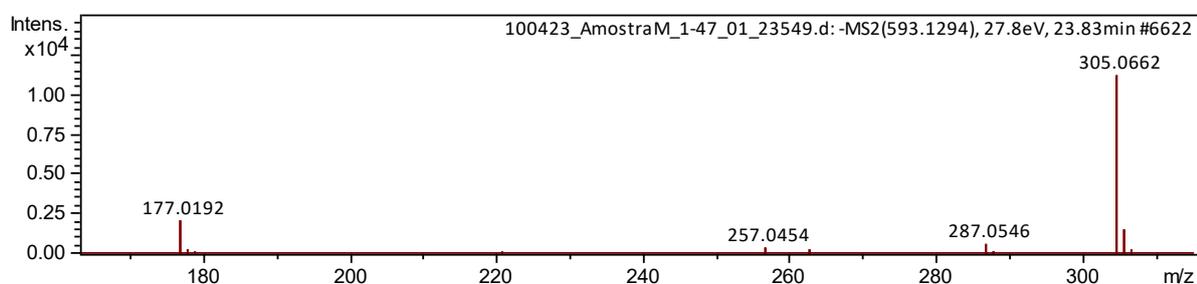
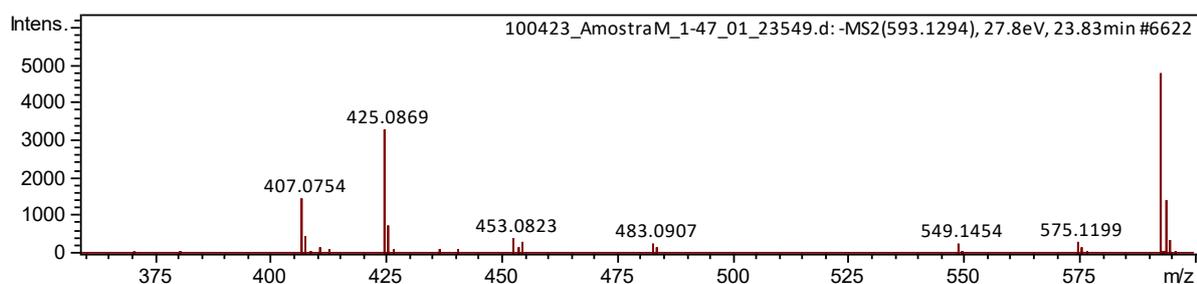
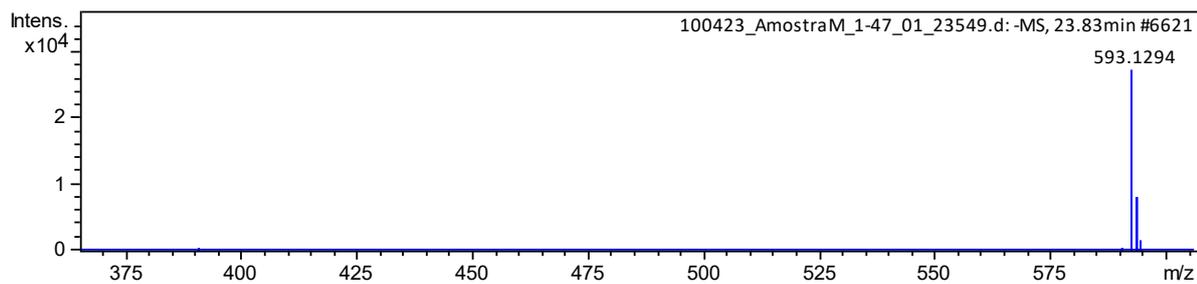
Pico 6. Íon precursor de m/z 305,0660 $[M - H]^-$: epigallocatequina;



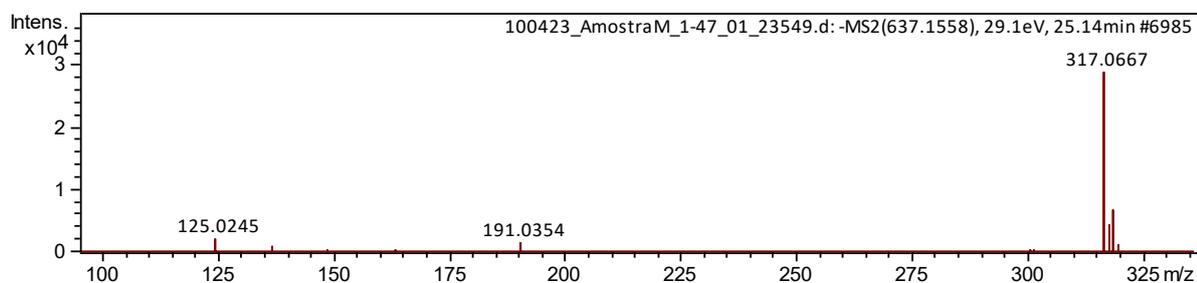
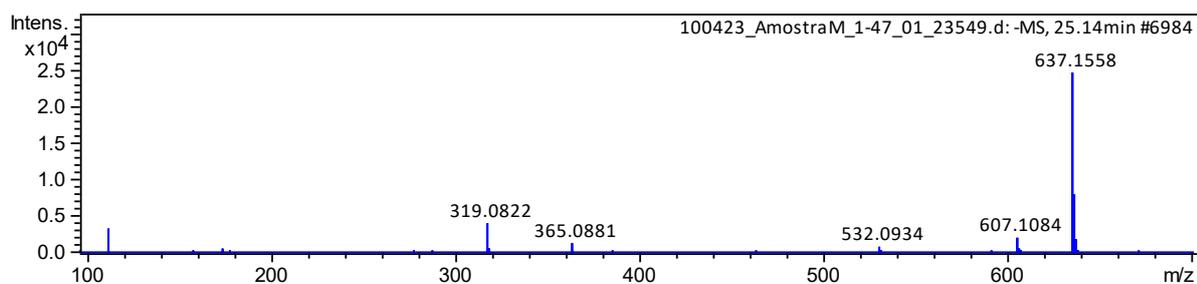
Pico 7. Íon precursor de m/z 761,1341 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDEG;



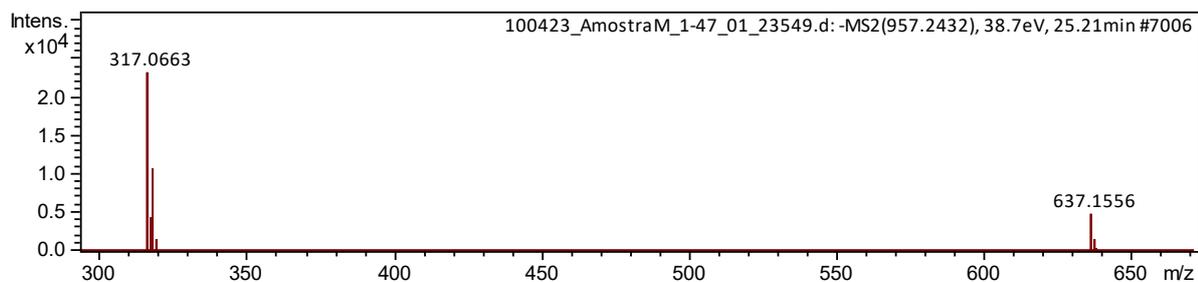
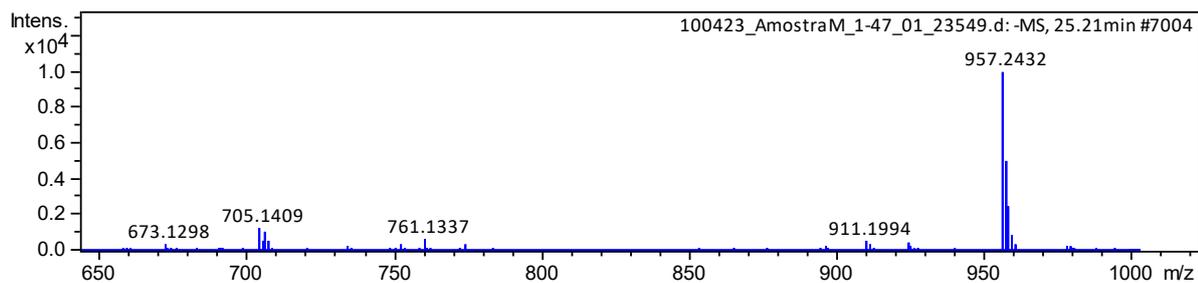
Pico 8. Íon precursor de m/z 775,1500 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDE;



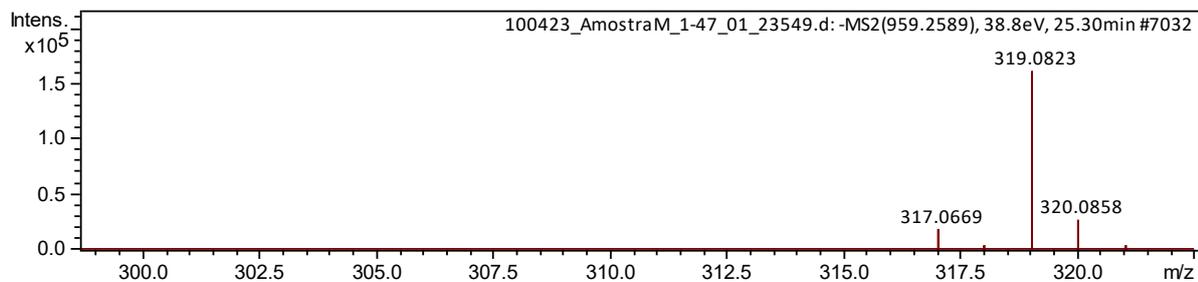
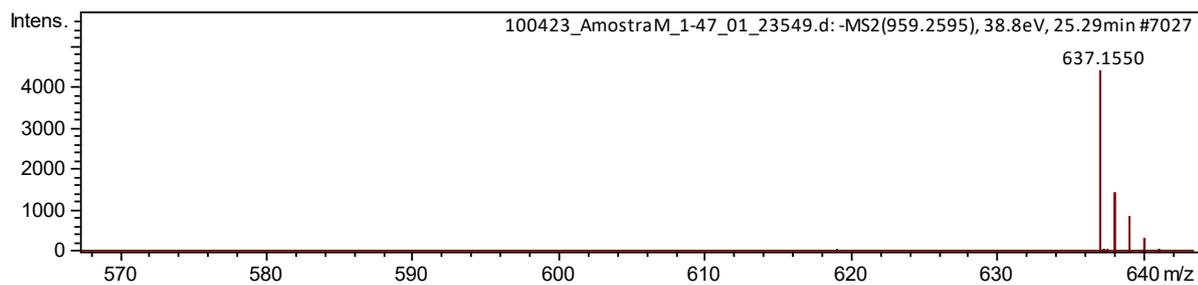
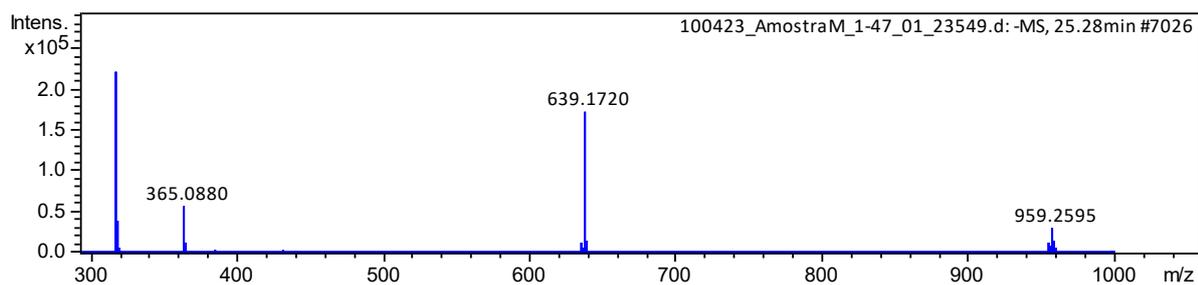
Pico 9. Íon precursor m/z 593,1294 $[M - H]^-$: dímero de PRD-PDE;

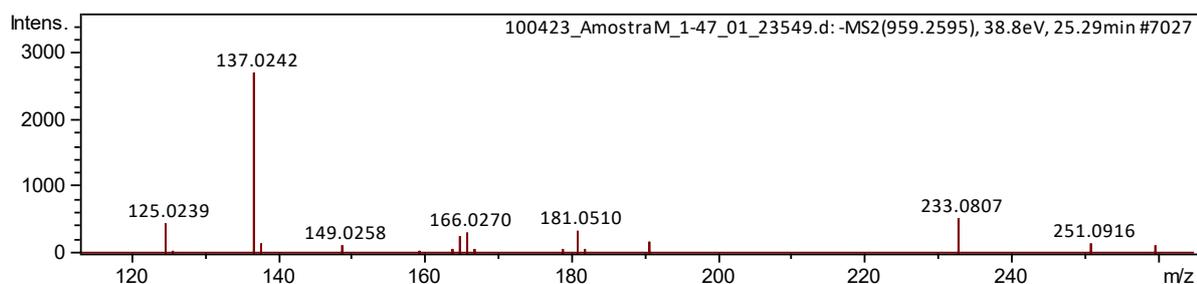


Pico 10. Íon precursor de m/z 637,1557 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDE;

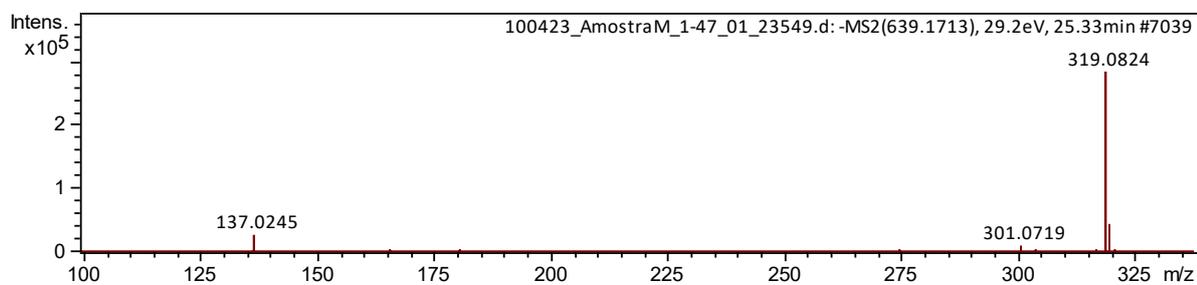
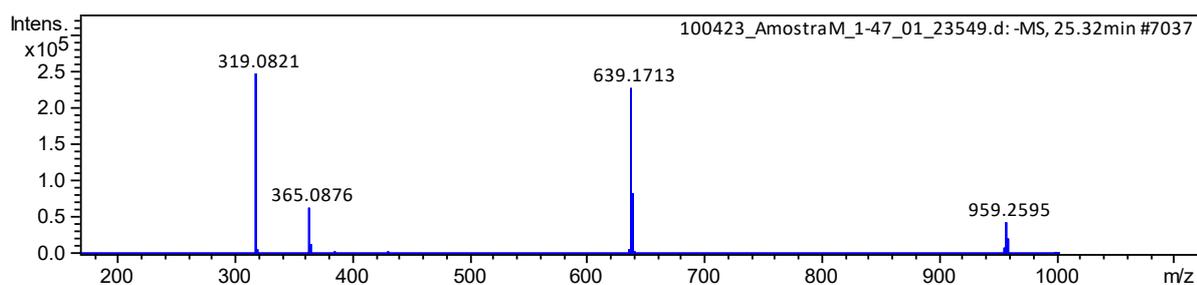


Pico 11. Íon precursor m/z 957,2432 $[M - H]^-$: trímero de PDE-PDE-PDE;

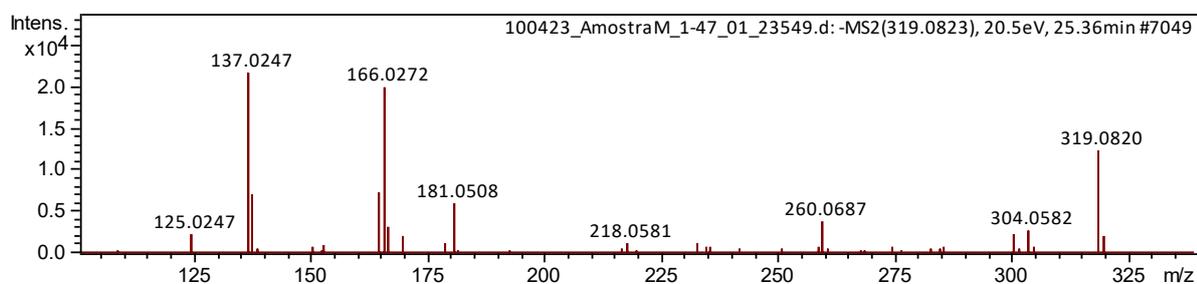
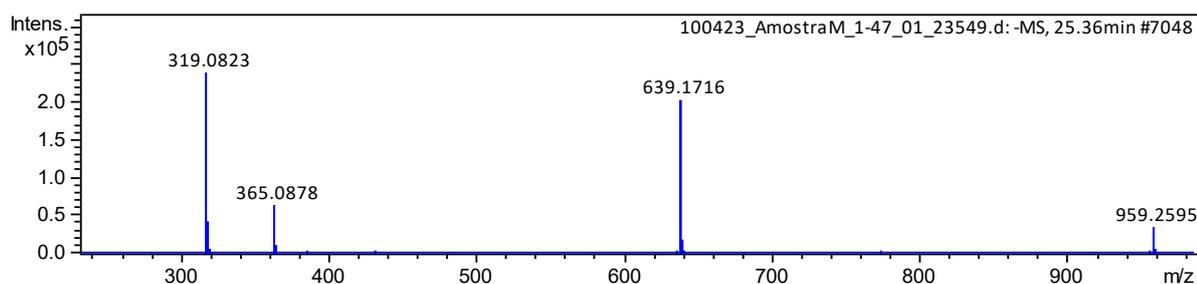




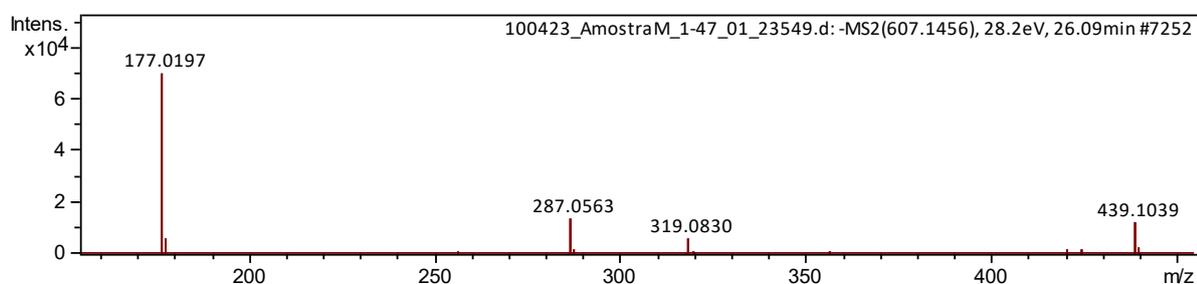
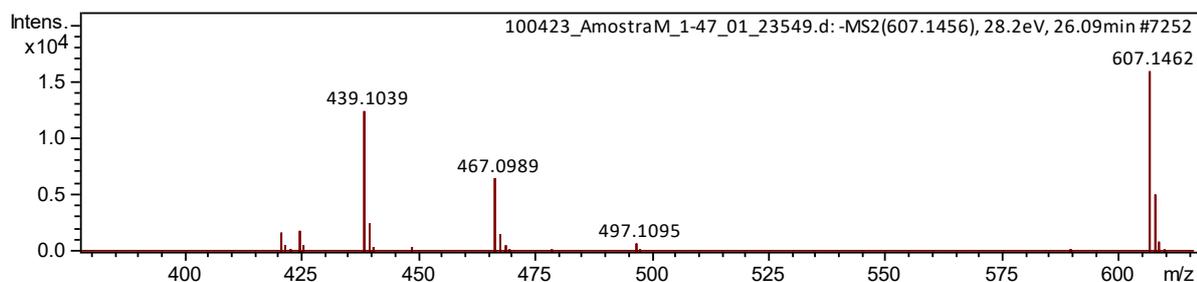
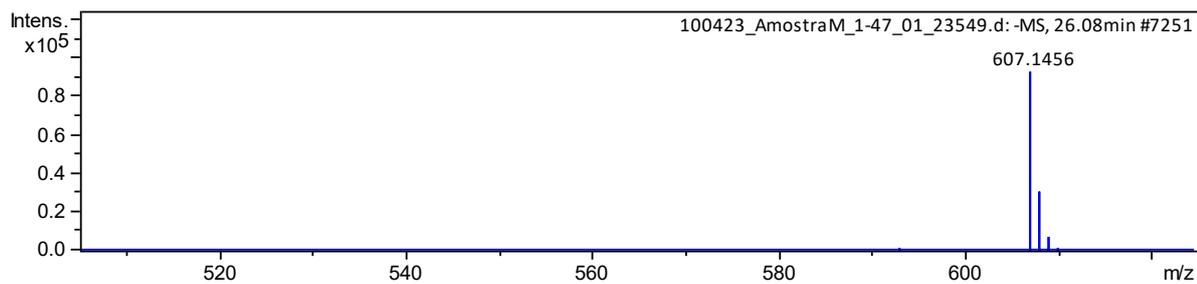
Pico 12. Íon precursor de m/z 959,2595 $[M - H]^-$: trímero de PDE-PDE;



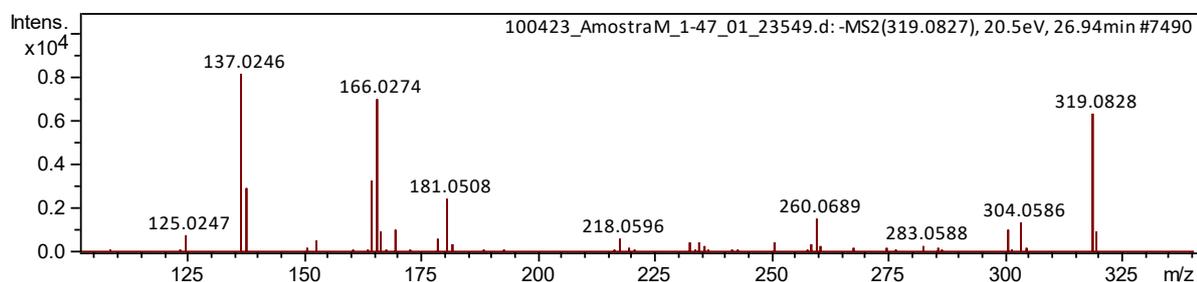
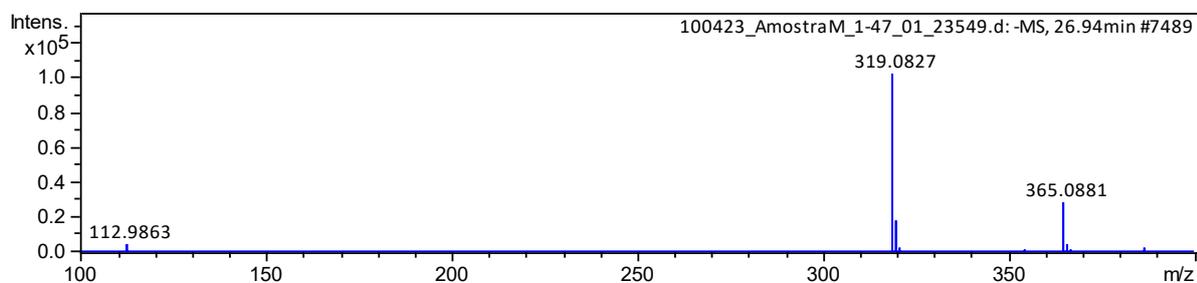
Pico 13. Íon precursor de m/z 639,1710 $[M - H]^-$: dímero de PDE-PDE;



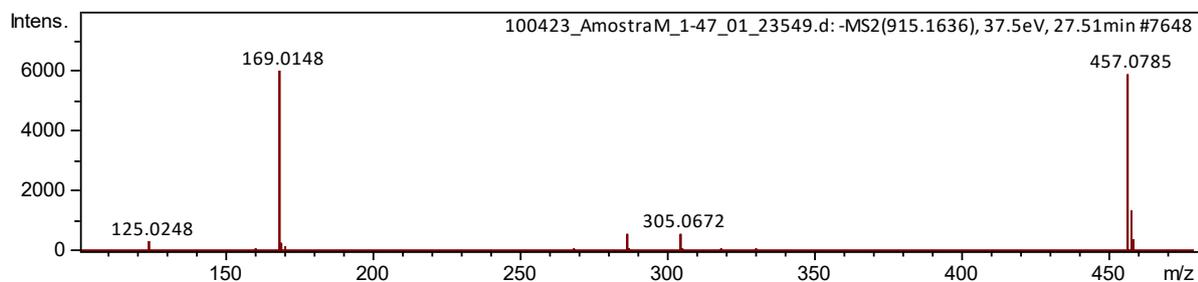
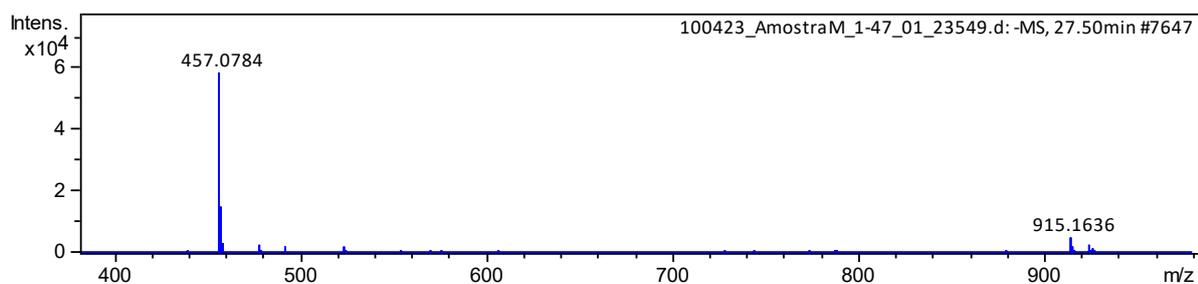
Pico 14. Íon precursor de m/z 319,0823 $[M - H]^-$: 4'-*O*-metil-galocatequina;



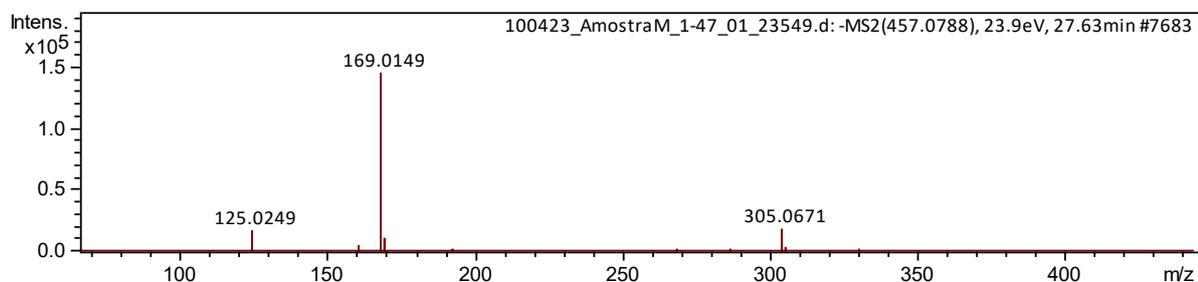
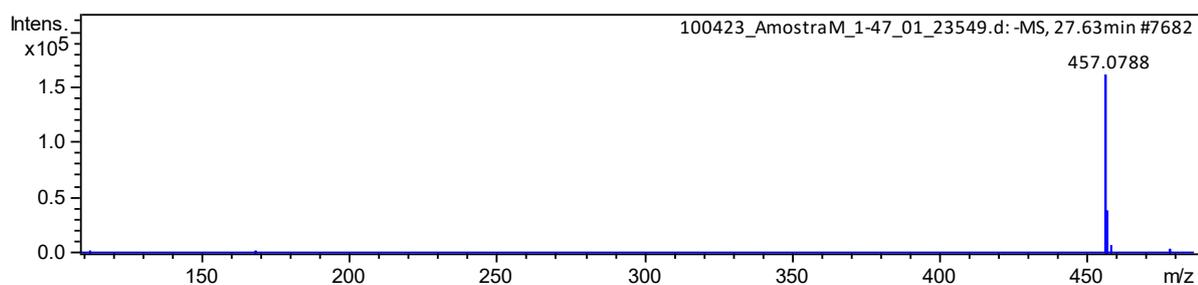
Pico 15. Íon precursor de m/z 607,1456 $[M - H]^-$;



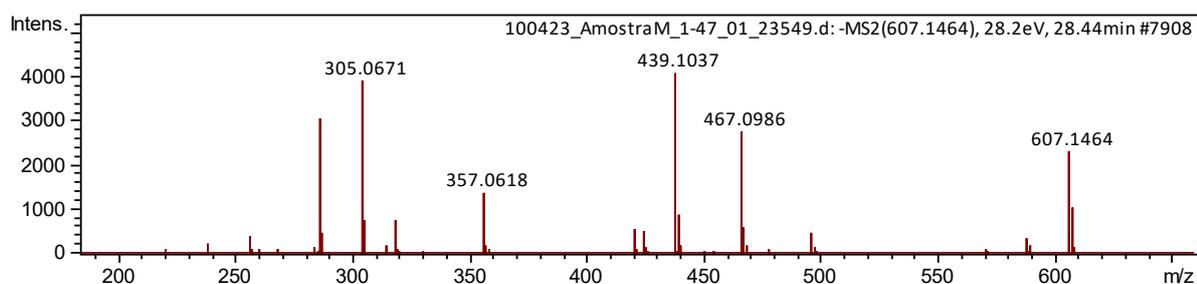
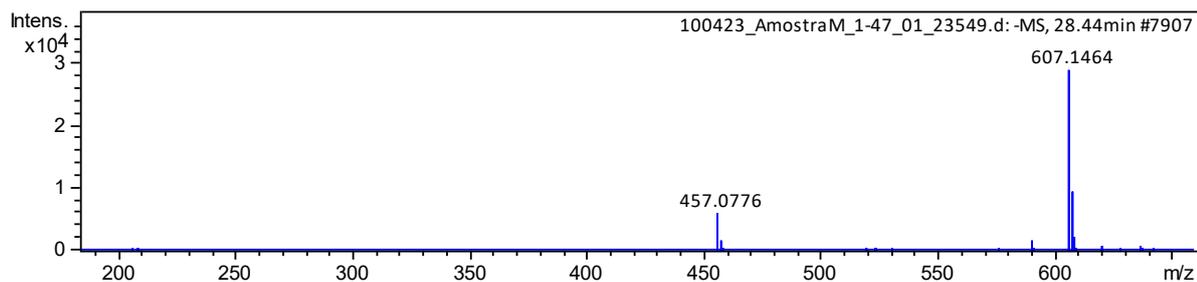
Pico 16. Íon precursor de m/z 319,0827 $[M - H]^-$: 4'-*O*-metil-epigallocatequina;



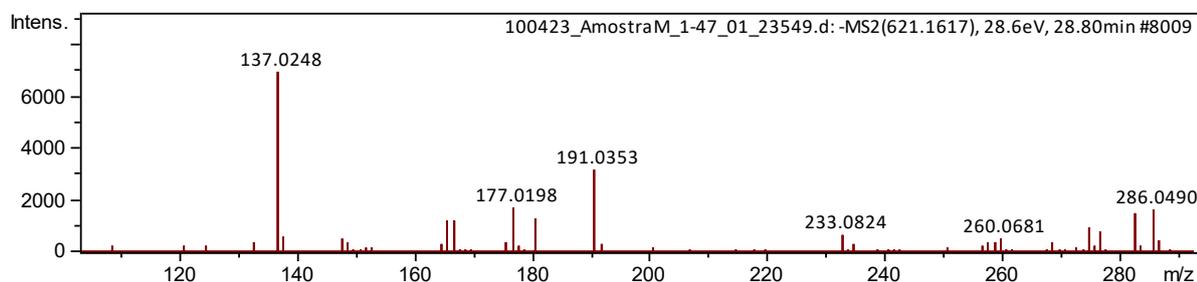
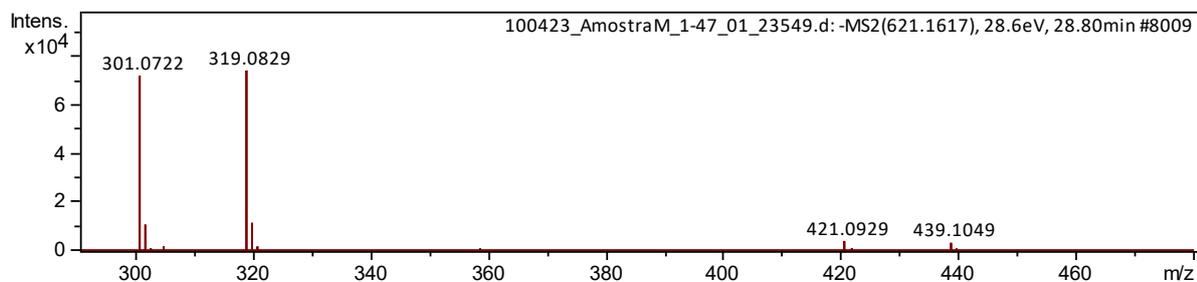
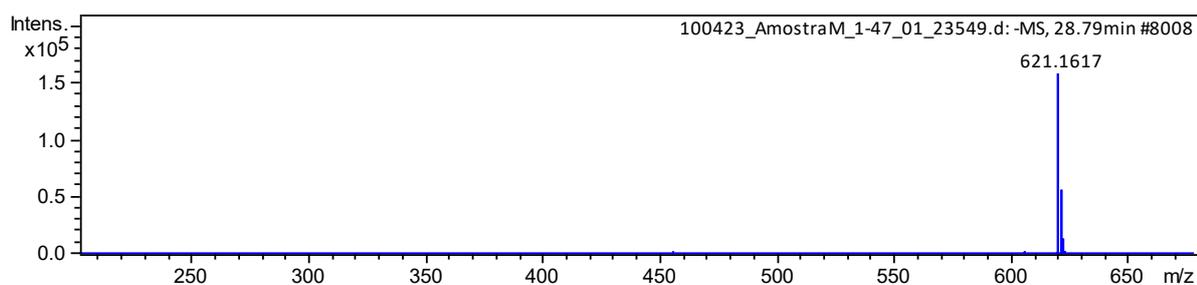
Pico 17. Íon precursor de m/z 915,1636 $[M - H]^-$: dímero de EGCG;



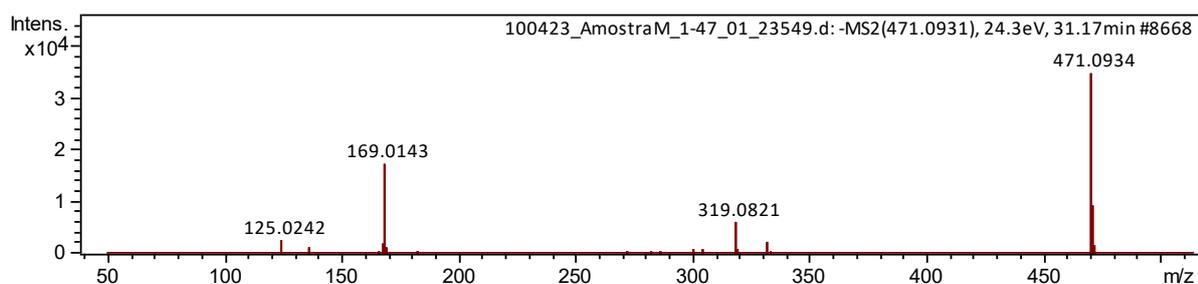
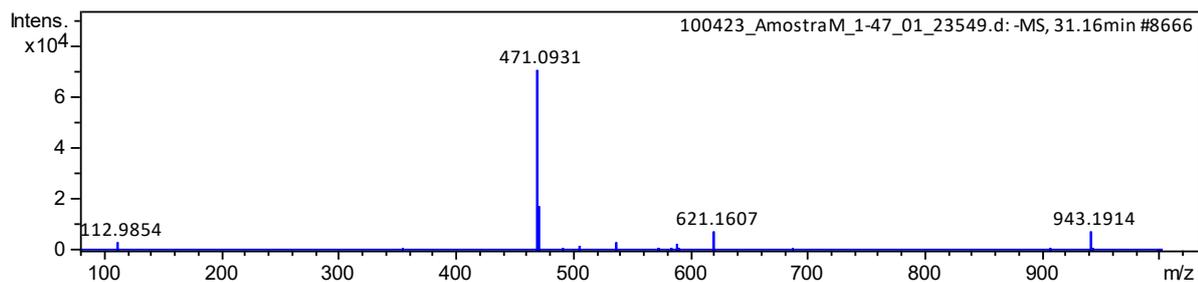
Pico 18. Íon precursor de m/z 457,0788 $[M - H]^-$: epigalocatequina-3-*O*-galato;



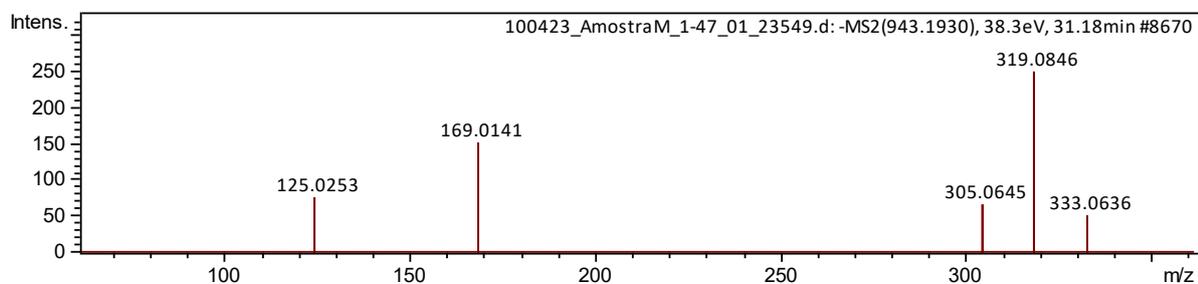
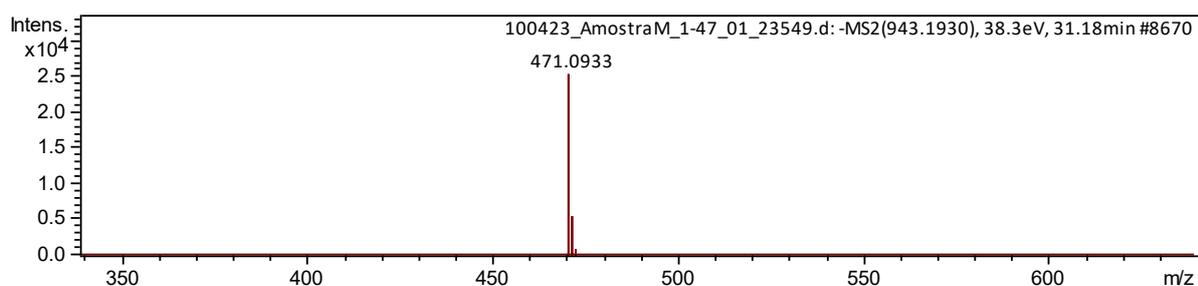
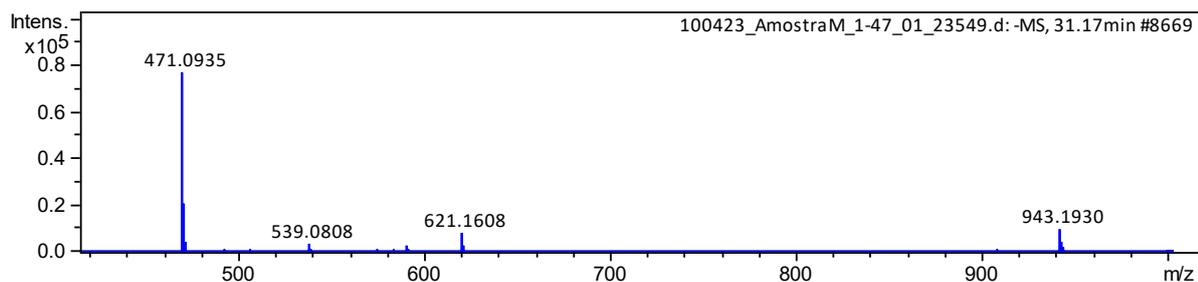
Pico 19. Íon precursor de m/z 607,1464 [M – H]⁻;



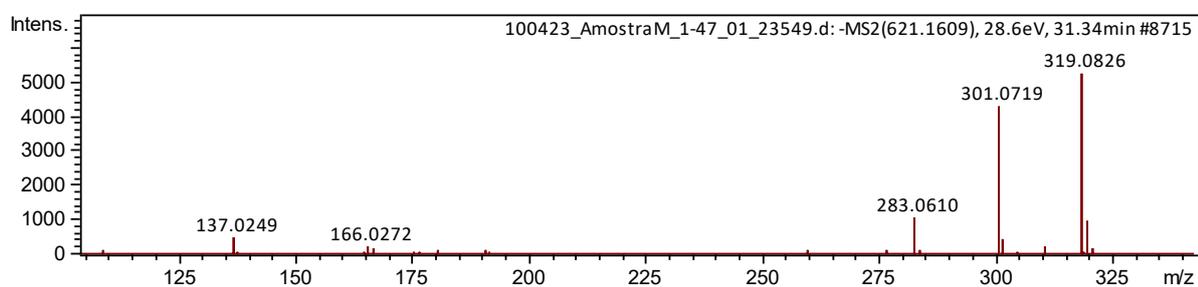
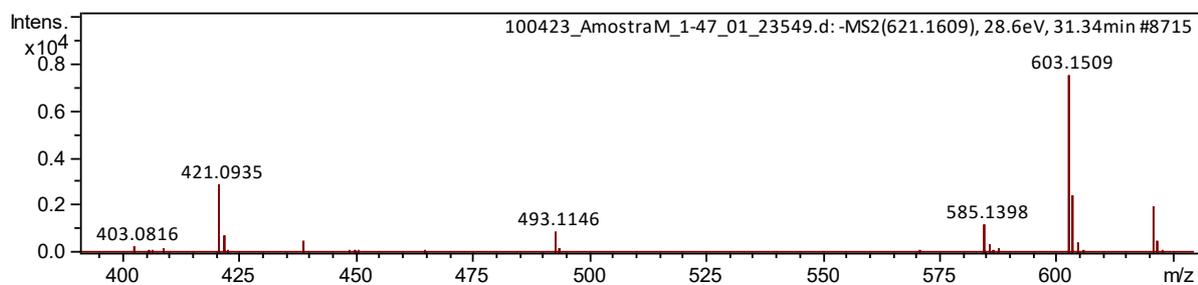
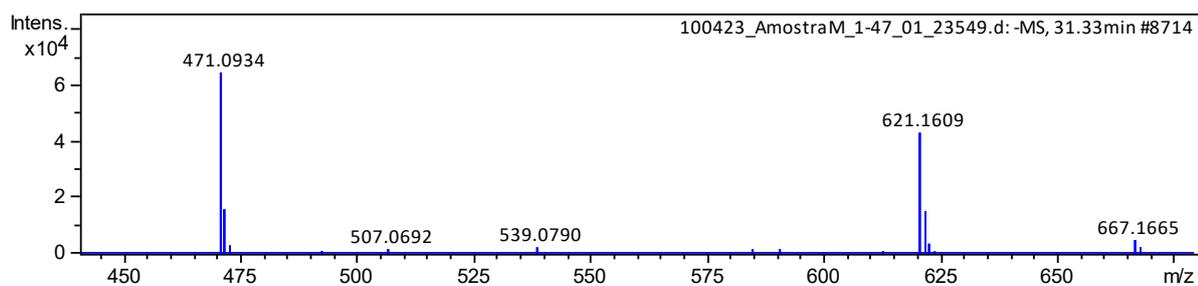
Pico 20. Íon precursor de m/z 621,1617 [M – H]⁻;



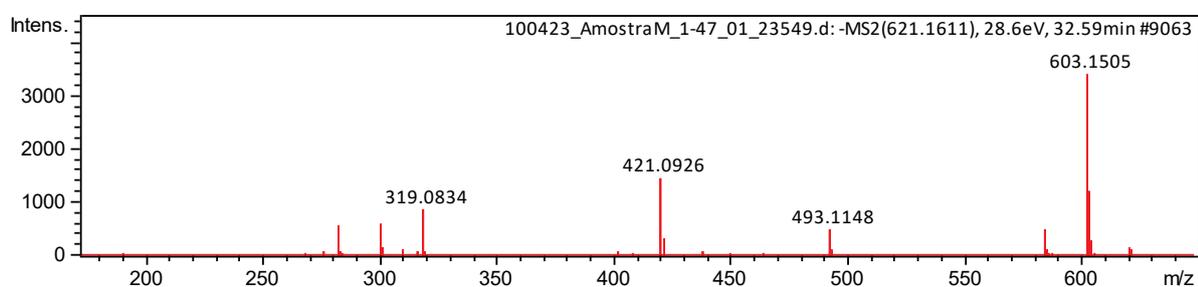
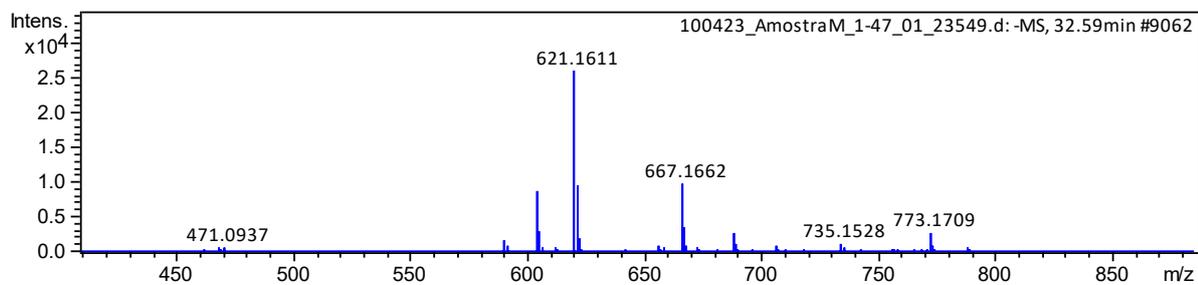
Pico 21. Íon precursor de m/z 471,0931 [M – H]⁻;

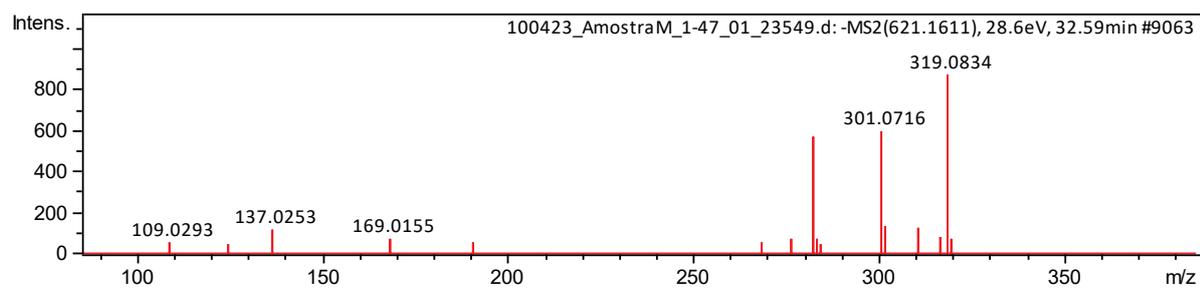


Pico 22. Íon precursor de m/z 943,1930 [M – H]⁻;



Pico 23. Íon precursor de m/z 621,1609 [M – H]⁻;





Pico 24. Íon precursor de m/z 621,1611 $[M - H]^-$;