



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**CONTROLE DE QUALIDADE, DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE *Caesalpinia peltophoroides* BENTH.**

MARINGÁ

2010

FERNANDA GIACOMINI BUENO

**CONTROLE DE QUALIDADE, DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE *Caesalpinia peltophoroides* BENTH.**

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 a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2010

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

B928c Bueno, Fernanda Giacomini, 1982-
Controle de qualidade, desenvolvimento de metodologia analítica e avaliação da atividade cicatrizante de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. / Fernanda Giacomini Bueno. -- Maringá, 2010.
118, [120] f. : figs. color., tabs.

Orientador : Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2010.

1. *Caesalpinia peltophoroides* Benth. - Atividade antioxidante. 2. *Caesalpinia peltophoroides* Benth. - Atividade cicatrizante. 3. Polifenóis. 4. Espectroscopia UV/VIS. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 22.ed. 615.32374

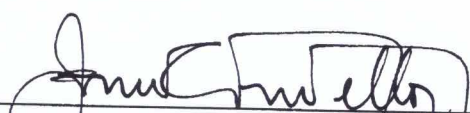
FERNANDA GIACOMINI BUENO

**“CONTROLE DE QUALIDADE, DESENVOLVIMENTO DE
METODOLOGIA ANALÍTICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE *CAESALPINIA PELTOPHOROIDES* BENTH.”**

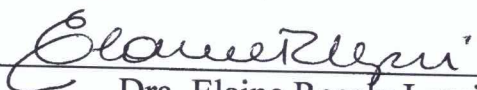
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 01 de outubro de 2010

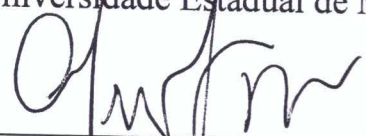
BANCA EXAMINADORA



Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Elaine Rosely Lepri
Universidade Estadual de Maringá



Dra. Gisely Cristiny Lopes
Universidade Estadual de Londrina

“O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”.

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e ao meu noivo por estarem presente na minha vida e me apoiarem a cada momento com compreensão, carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que tem me beneficiado.

Aos meus pais, Luiz e Élide, por terem acreditado no meu sonho e me incentivarem em cada decisão tomada.

Às minhas irmãs, Mariana e Ana Gabriela, pelo carinho, amor e amizade.

Meu noivo amado, quero deixar aqui minha gratidão, meu amor e meu carinho por estes momentos ao meu lado. Você é parte essencial desta conquista.

Ao prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por ter confiado na minha capacidade, pela orientação, paciência e amizade.

Aos professores que contribuíram no desenvolvimento deste trabalho, Profa. Eneri Leite Mello, Profa. Gisely Lopes e Prof. Mauro Baesso.

Aos técnicos de laboratório, Admir, Marli, Cláudio, Maria Eurides e Maria dos Anjos pela amizade, pela compreensão e pela ajuda.

Aos meus queridos companheiros de trabalho, Maria Angélica, Paulo Vitor e Caroline pelos sábados, domingos e feriados, pelos horários vagos. Vocês fazem parte da imensa parte da minha vida. À Ana Cláudia pelas análises de fotoacústica.

Aos amigos de laboratório, Fabio e Helena, que em muitas noites e almoços foram companheiros de trabalho, de risadas e de decepções com as colunas que não reproduziam.

Aos companheiros de mestrado e doutorado, Cleyton, Renata e Traudi.

Aos amigos Sandra pelo companheirismo em longas viagens, e a Thaty e Gileno, pelos almoços, pela pousada e pelo carinho.

À todos os companheiros da pós-graduação que estiveram presentes nestes anos.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos auxílios concedidos.

Aos professores da banca de qualificação pelos conhecimentos passados e pela disponibilidade.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante o período de trabalho.

RESUMO

Caesalpinia peltophoroides Benth., conhecida como sibipiruna, é uma planta muito utilizada para arborização nas cidades brasileiras. Este trabalho objetivou o estudo farmacognóstico, capacidade antioxidante e o teor de taninos do extrato bruto (EB) e de frações semi-purificadas (FAE, FQ e F1-F5), o desenvolvimento de metodologia analítica por espectrofotometria UV/VIS, além da atividade cicatrizante das cascas do extrato bruto de *C. peltophoroides* em feridas cutâneas de ratos Wistar. O controle de qualidade foi realizado através da perda por dessecação (PD), teor de cinzas (TC), teor de extrativos (TE) e teor de resíduo seco, com álcool 100% (TR1), álcool 70% (TR2) e álcool 50% (TR3). Para a determinação de taninos totais (TT) utilizou-se a reação com Folin-Ciocalteu. A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de DPPH, avaliando-se o IC₅₀ (µg/mL). O desenvolvimento da metodologia analítica seguiu os requisitos exigidos pela RE nº 899/2003 -ANVISA. A atividade cicatrizante foi analisada aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento com gel contendo 1% do EB através do comprimento e espessura da área re-epitelizada, análise de permeação cutânea através de espectroscopia fotoacústica, quantidade de células em metáfases e fibras colágenas (tipo I e III). As cascas da droga vegetal apresentaram valores de PD=8,25%, TC=8,66%, TE=7,59%, TR1=10,90%, TR2=9,83% e TR3=14,0%. O teor de TT foi determinado nas amostras: EB=16,80%, FAE=18,62%, FQ=10,27%, F1=28,23%, F2=20,02%, F3=30,40%, F4=40,92% e F5=23,05%. A capacidade antioxidante das amostras foram: EB=7,40, FAE=4,90, FA=9,57, F1=2,95, F2=3,95, F3=4,10, F4=2,38, F5=4,42 e padrões Trolox=3,97 e Vitamina C=4,36. As frações F1 e F4 apresentam IC₅₀ menor que o Trolox e F1, F2, F3 e F4 menores que a Vitamina C (P<0,05). No desenvolvimento de metodologia analítica todas as especificações da RE nº 899/2003 foram cumpridas. A avaliação da atividade cicatrizante mostrou a formação de uma área re-epitelizada maior aos 4 dias e mais espessa aos 10 e 14 dias, assim como a estimulação da maturação das fibras colágenas (tipo I) aos 10 dias e da proliferação celular das metáfases aos 4 e 7 dias. As análises do controle de qualidade cumpriram as especificações farmacopeicas. As frações (F1-F5) apresentaram maior teor de TT e conseqüentemente maior capacidade antioxidante que o EB e FAE. No desenvolvimento da metodologia analítica comprovou-se que o método para determinação do teor de polifenóis totais do EB é válido e confiável, devendo se utilizar o pirogalol como padrão. Na avaliação da atividade cicatrizante, comprovou-se a permeação do EB em todos os tempos analisados e que o gel contendo EB mostrou ação sobre o reparo tecidual, fornecendo condições que favorecem uma cicatrização mais rápida e resistente aos 14 dias de tratamento, em relação ao controle.

Palavras-chave: *Caesalpinia peltophoroides*, Polifenóis, Atividade Antioxidante, Validação por espectroscopia UV/VIS, Atividade cicatrizante

ABSTRACT

Caesalpinia peltophoroides, known as sibiruna, is a widely used plant in Brazilian cities for afforestation. This work conducted a pharmacognosy study, antioxidant capacity and tannin content of the crude extract (CE) and semipurified fractions (EAF, AF and F1-F5), the analytical methodology development using a spectrophotometer UV/VIS, beyond evaluating the healing activity of the bark of crude extract of *C. peltophoroides* in Wistar rats skin wounds. The quality control was performed by loss on drying (LD), ash content (AC), extractives content (EC) and dry content with alcohol 100% (DR1), alcohol 70% (DR2) and alcohol 50% (DR3). The total tannins (TT) content was used the reaction with Folin-Ciocalteu. The antioxidant capacity was determined by DPPH assay, determining the IC₅₀ (µg/mL). The analytical methodology development followed the requirements demanded by RE n° 899/2003-ANVISA. The wound healing activity was analyzed at 4, 7, 10, and 14 days of treatment with gel containing 1% of the CE, through the length and thickness of re-epithelialized area, photoacoustic spectroscopy permeation analysis, number of cells in metaphase and collagen fibers (type I and III). The bark of the vegetal drugs showed values of LD=8,25%, AC=8,66%, EC=7,59%, DR1=10,90%, DR2=9,83% and DR3=14,0%. The TT content was determined in the samples: CE=16,80%, EAF=18,62%, AF=10,27%, F1=28,23%, F2=20,02%, F3=30,40%, F4=40,92% and F5=23,05%. The samples antioxidant capacity tested were: CE=7,40, FAE=4,90, FA=9,57, F1=2,95, F2=3,95, F3=4,10, F4=2,38, F5=4,42, and standards Trolox=3,97 and Vitamin C=4,36. F1 and F4 demonstrated a IC₅₀ lower than Trolox and F1, F2, F3, and F4 lower than Vitamin C (P<0,05). In the analytical methodology development, all the specifications of RE n° 899/2003 were applied. The wound healing activity evaluation showed the formation of a bigger re-epithelialized area in 4 days, and thicker in 10 and 14 days, as well as the stimulation of maturation of collagen fibers (type I) in 10 days and metaphases cell proliferation in 4 and 7 days. The quality control tests were in according with the pharmacopoeic specifications. The fractions (F1-F5) showed a higher amount of TT and therefore a higher antioxidant capacity than the CE and EAF. The analytical methodology development it has been proved that the method for determining the total polyphenol content in CE is valid and reliable, and pyrogallol may be used as standard. In the wound healing activity evaluation, the permeation of the CE was proved in all analyzed times and the gel containing CE showed action on the tissue repair, providing conditions that favor a faster and resistant healing in 14 days of treatment, compared to the control.

Keywords: *Caesalpinia peltophoroides*, Polyphenols, Antioxidant capacity, analytical Methodology development using a spectrophotometer UV/VIS, Wound healing

NOTA BIOGRÁFICA



Fernanda Giacomini Bueno, nasceu em Toledo-Pr, no dia 26 de novembro de 1982. Em 1999, concluiu o ensino médio no Colégio La Salle. Em 2003 iniciou o curso de Farmácia Generalista pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná e neste período foi bolsista pelo CNPQ e Fundação Araucária. Participou de diversos projetos e grupos de pesquisa. Recebeu Prêmio de Menção Honrosa pela Universidade Estadual de Maringá devido a trabalho apresentado no EAIC. Realizou estágio curricular no Centro de Estudos Biofarmacêuticos – Biocinese na área de Equivalência Farmacêutica, formando-se em 2008. Permaneceu no mesmo centro como Responsável Técnica Substituta do Centro de Equivalência Farmacêutica pelo período de 2008 a 2009. Em 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, realizando atividades no laboratório de Farmacognosia sob a orientação do professor Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Estrutura química de (A) protosappanina A, (B) protosappanina B e brazileína isolados de <i>Caesalpinia sappan</i>	24
2	Estrutura química de (1-4) isosovouacapenol A-D e (5-6) pulcherrimas A-B.....	25
3	Estrutura química de (1) deoxicaesaldecarina C, (2) bentaminina 1 e (3) bentaminina 2.....	26
4	(A) Partes aéreas e (B) tronco da <i>Caesalpinia peltophoroides</i>	27
5	Estrutura química de tanino hidrolisável (A) e condensado (B).....	31
6	Representação do local atingido pelas EROs e suas doenças associadas	33
7	Cascas secas de <i>C. peltophoroides</i>	41
8	Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto de <i>C. peltophoroides</i>	42
9	Espectros de varredura no visível (400 a 800 nm) das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de <i>C. peltophoroides</i> após 30 min de reação com Folin-Ciocalteu	L 54
10	Porcentagem de aumento nas absorbâncias médias do comprimento de onda maior em relação ao menor (691, 715, 760 e 800) dos padrões e do EB de <i>C. peltophoroides</i>	56
11	Estruturas químicas das substâncias referências: (A) ácido gálico, (B) ácido tânico, (C) catequina e (D) pirogalol.....	58
12	Curva de calibração do pirogalol.....	59
13	Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva de calibração do padrão de pirogalol.....	61
14	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva de calibração do padrão de pirogalol.....	61
15	Representação da curva de linearidade, com coeficiente de determinação (r) e equação da reta da metodologia descritiva de polifenóis totais.....	62
16	Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para polifenóis totais (PT) das amostras de EB <i>C. peltophoroides</i>	63
17	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de <i>C. peltophoroides</i>	64
18	Representação da curva obtida na especificidade do extrato bruto de <i>C.</i>	

	<i>peltophoroides</i>	68
19	Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB <i>C. peltophoroides</i> adicionada do padrão.....	69
20	Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de <i>C. peltophoroides</i> adicionada do padrão.....	69
21	Comparação entre a curva da especificidade e a linearidade do EB de <i>C. peltophoroides</i>	70
22	Comparação entre os valores de IC ₅₀ (µg/mL) do extrato bruto, frações e antioxidantes padrão realizados pelo método de DPPH, onde *(P<0,05) quando comparado com o Trolox e **(P<0,05) quando comparado à Vitamina C.....	75
23	Correlação de Pearson entre IC ₅₀ (µg/mL) e taninos totais (%).....	76
24	Camadas da pele.....	78
25	Fases de cicatrização: (A) fase inflamatória, (B) fase de proliferação e (C) fase de remodelagem.....	81
26	Fases da cicatrização com as respectivas migrações celulares em cada etapa.....	81
27	Esquema de uma célula fotoacústica.....	83
28	(A) Feridas realizadas no dorso dos animais e (B) punch utilizado para marcação no dorso.....	87
29	Fotomicrografia medida do comprimento (A) e espessura (B) da área re-epitelizada.....	88
30	Fotomicrografia das metáfases (A) contadas na camada basal/supra basal (B) da área de re-epitelização.....	89
31	Fotomicrografia da birrefringência das fibras colágenas tipo I (vermelha/amarela) e III (verde).....	90
32	Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para medidas <i>in vitro</i>	91
33	Fotografia da região dorsal do animal após 4 dias de tratamento com o gel contendo EB (esquerda) e gel base (direita).....	92
34	Representação da média±desvio padrão da medida do comprimento da área de re-epitelização, em µm, aos 4 e 7 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada em ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	93

35	Representação da média±desvio padrão da espessura da área de re-epitelização, em μm , aos 10 e 14 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	94
36	Fotografia de cortes histológicos da área re-epitelizada de um dos lados das feridas tratadas e do centro das feridas tratadas com gel com EB (A, B, C e D) e com o gel base (E, F, G e H), aos 4, 7, 10 e 14 dias, respectivamente (n=5). As setas indicam o início e fim da área re-epitelizada aos 4 e 7 dias e o centro da área aos 10 e 14 dias (HE, objetiva 10X).....	95
37	Representação da média±desvio padrão do número de metáfases contadas na camada basal e suprabasal da área re-epitelizada das feridas com tratamento aos 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	97
38	Percentagem de fibras colágenas tipo III (vermelhas/amarelas) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	100
39	Percentagem de fibras colágenas tipo I (vermelhas/amarelas) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.....	100
40	Fotomicrografia da camada papilar da derme. Fibras colágenas aos 4, 7, 10 e 14 dias com gel com EB (A-D) e gel base (E-H), respectivamente (n=5) (picro-Sírius, objetiva 20X).....	101
41	Espectro de absorção óptica do gel base, EB de sibipiruna e gel contendo EB. As setas indicam a região de absorção do gel contendo EB em 280 nm e 370 nm.....	103
42	Espectros de absorção aos 4, 7, 10 e 14 dias (A, B, C e D) de tratamento da ferida com o gel base e o gel contendo EB, e o do gel contendo EB, sem tratamento.....	104
43	Diferença dos espectros de absorção do gel contendo EB e gel base aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Pág.
1	Resultados dos ensaios realizados para avaliação do controle de qualidade das cascas de <i>C. peltophoroides</i>	53
2	Valores das absorvâncias encontradas na varredura (400 a 800 nm) dos padrões (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogallol), com 2 µg/mL, e do extrato bruto de <i>C. peltophoroides</i> , com 16 µg/mL, nos tempos de 10 a 40 min.....	55
3	Comparação entre a absortividade molar dos padrões e o teor de polifenóis totais do EB de <i>C. peltophoroides</i>	58
4	Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).....	60
5	Determinação decrescente do analito até a menor concentração detectável com demarcação da faixa de trabalho utilizada.....	62
6	Concentração do EB de <i>C. peltophoroides</i> e suas respectivas absorvâncias na curva de linearidade.....	63
7	Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).....	65
8	Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes de repetibilidade e precisão intermediária da amostra com 16 µg/mL do EB de <i>C. peltophoroides</i>	66
9	Teores de polifenóis totais (PT) obtidos nas amostras na ausência de luz, Na ₂ CO ₃ 7,5% e Na ₂ CO ₃ 14,06%.....	67
10	Concentração do EB de <i>C. peltophoroides</i> e as respectivas absorvâncias das amostras testadas na análise de especificidade.....	67
11	Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).....	70
12	Teor de polifenóis totais obtidos no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação.....	71
13	Teor de polifenóis totais e taninos totais do EB e frações de <i>C. peltophoroides</i>	72
14	Faixa de trabalho determinada na triagem para a análise de atividade sequestradora de DPPH.....	74

15	Capacidade antioxidante do extrato de frações de <i>C. peltophoroides</i> pela redução de DPPH.....	74
16	Comparação do teor de polifenóis totais (TT) e taninos totais em relação ao IC ₅₀ do extrato e frações de <i>C. peltophoroides</i>	76
17	Valores médios do comprimento (4 e 7 dias) e espessura (10 e 14 dias) da área re-epitelizada para as feridas tratadas com gel base e gel com EB (n=5).....	93
18	Número de metáfases/mm encontradas na camada basal e supra basal da área re-epitelizada para os dois tratamentos (n=5).....	96
19	Porcentagem de fibras colágenas tipo I e III presentes no gel base e gel com EB aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5).....	99

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbância
AA	Atividade antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AbsA	Absorbância da amostra
AbsCN	Absorbância do controle negativo
b	Espessura da célula
BHT	Butil hidróxi tolueno
c	Concentração da amostra
CAT	Catalase
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CV%	Coefficiente de variação em percentagem
Dp	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
ϵ	Absortividade molar
EB	Extrato bruto de <i>C. peltophoroides</i>
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	Teste F
FAE	Fração acetato de etila
FAQ	Fração aquosa
gL	Grau de liberdade
GPx	Glutathione peroxidase
HE	Coloração de Hematoxilina e Eosina
IC ₅₀	Concentração que inibe 50% dos radicais livre
IL	Interleucina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mM	Milimolar
Mol	Molaridade
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
Nm	Nanômetro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio (anidro)
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAS	Técnica de espectroscopia fotoacústica

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PNA	Polifenóis não adsorventes
PT	Polifenóis totais
r	Coeficiente de correlação linear
RE	Resolução específica
SM	Soma média dos quadrados
Sm	Solução-mãe
SOD	Superóxido dismutase
SQ	Soma dos quadrados dos resíduos
TGF- α	Fator de crescimento transformance- α
TGF- β	Fator de crescimento transformance- β
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TT	Taninos totais
μ A	Unidades de absorbância
UV/VIS	Ultravioleta/Visível
VEGF	Fator de crescimento de célula endoteliais
v/v	Volume/volume
\bar{x}	Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ASPECTOS GERAIS	23
2.1.1	Família Fabaceae	23
2.2.2	Gênero <i>Caesalpinia</i>	23
2.3.3	<i>Caesalpinia peltophoroides</i> Benth.	26
3	OBJETIVOS GERAIS	28
CAPÍTULO 1: CONTROLE DE QUALIDADE, DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE TANINOS TOTAIS		
1	REVISÃO DE LITERATURA	30
1.1	ASPECTOS QUÍMICOS	30
1.1.1	Compostos fenólicos	30
1.1.2	Taninos	30
1.1.3	Atividade antioxidante	32
1.1.3.1	Processo oxidativo	32
1.1.3.2	Processo de oxidação lipídica	34
1.1.3.3	Antioxidante	35
1.2	ASPECTOS ANALÍTICOS	36
1.2.1	Validação de metodologia analítica para a determinação de polifenóis totais	36
2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	MATERIAL	40
3.1.1	Solventes, reagentes e soluções	40
3.2.2	Equipamentos	40
3.2	MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	41
3.3	CONTROLE DE QUALIDADE	43
3.3.1	Análises Físico-Químicas	43
3.3.1.1	Perda por dessecação	43
3.3.1.2	Determinação do teor de extrativos	43
3.3.1.3	Determinação do teor de resíduo seco	43
3.3.1.4	Determinação de cinzas totais	43
3.3.2	Análise quantitativa	44
3.3.2.1	Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais	44
3.4	PREPARAÇÃO DE EXTRATOS	45

3.4.1 Extrato bruto (EB).....	45
3.4.2 Fração acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ).....	45
3.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	46
3.5.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila.....	46
3.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)	46
3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE	46
3.6.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila	46
3.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA	47
3.7.1 Padronização da metodologia analítica	47
3.7.2 Validação da metodologia analítica	48
3.7.2.1 Curva de calibração da substância de referência (pirogalol)	48
3.7.2.2 Linearidade	49
3.7.2.3 Intervalo.....	49
3.7.2.3 Limite de detecção (LD).....	49
3.7.2.4 Limite de quantificação (LQ)	49
3.7.2.6 Precisão.....	50
3.7.2.7 Exatidão.....	50
3.7.2.9 Robustez	50
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 CONTROLE DE QUALIDADE	52
4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS	53
4.2.1 Padronização de metodologia analítica	53
4.2.2 Validação.....	59
4.2.2.1 Curva de calibração do padrão	59
4.2.2.2 Linearidade	61
4.2.2.3 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo.....	64
4.2.2.4 Precisão.....	65
4.2.2.5 Robustez	66
4.2.2.6 Especificidade e seletividade	67
4.2.2.7 Exatidão.....	70
4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	71
4.3.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais.....	71
4.3.2 Atividade antioxidante	72
4.3.3 Correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante.....	75

CAPÍTULO 2: ATIVIDADE CICATRIZANTE	77
1. REVISÃO DA LITERATURA	78
1.1 A PELE.....	78
1.2 ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	79
1.2.1 Processo de cicatrização.....	79
1.2.2 Permeação cutânea em espectroscopia fotoacústica	82
2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	84
3 MATERIAIS E MÉTODOS	85
3.1 MATERIAL	85
3.1.1 Solventes, reagentes e soluções.....	85
3.1.2 Equipamentos.....	85
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE.....	86
3.2.1 Animais	86
3.2.2 Comitê de ética em experimentação animal.....	86
3.2.3 Obtenção do gel de carbopol para o tratamento das feridas	86
3.2.4 Avaliação da atividade cicatrizante.....	86
3.2.4.1 Preparação de feridas e tratamento dos animais	86
3.2.4.2 Preparação da pele para análise morfológica	87
3.2.4.3 Análise da re-epitelização	88
3.2.4.4 Contagem de metáfases.....	88
3.2.4.5 Análise das fibras colágenas	89
3.2.4.6 Análise de permeação cutânea.....	90
3.2.7 Análise estatística	91
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
CONCLUSÃO.....	108
REFERÊNCIAS	109
ANEXO I.....	119

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais está descrito na história da humanidade e seu uso vem desde épocas remotas. Foi através de um instinto de sobrevivência que o homem e os animais começaram a utilizar plantas para a cura de enfermidades (CORRÊA et al., 2001). Nas culturas mais antigas são encontrados relatos do uso de fitoterapia nas práticas terapêuticas. Registros tais como os de Hipócrates e Paracelso evidenciaram a utilização destes recursos. Este conhecimento adquirido foi passado através de gerações permitindo que o homem moderno iniciasse a busca dos mecanismos de ação e propriedades farmacológicas destas espécies vegetais (SILVA et al., 2008).

Nos anos 60, países desenvolvidos, como a Alemanha e França, aumentaram seus interesses pelos medicamentos fitoterápicos, passando a utilizar diferentes formas farmacêuticas. Pesquisadores e indústrias farmacêuticas começaram a investir em pesquisas de novos fármacos provenientes do uso das fontes naturais na medicina popular (SOUSA et al., 2008). O estudo destas plantas e seus extratos levaram os pesquisadores à descoberta de substâncias ativas isoladas que serviram de protótipo para a descoberta de novos fármacos sintéticos ou até como fonte de matéria prima farmacêutica (USTULIN et al., 2009). Mesmo com o avanço da medicina moderna em relação aos produtos sintéticos, cerca de 30% das drogas utilizadas são derivadas de produtos naturais (SOUSA et al., 2008).

Atualmente, para o tratamento de doenças em países desenvolvidos, cerca de 80% da população utilizam plantas medicinais como alternativa (SILVA et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a fitoterapia como uma alternativa de tratamento viável e que apresenta um baixo custo, recomendando o levantamento, identificação, estímulo e orientação do uso das plantas medicinais que possuem eficácia e segurança terapêutica comprovada (LORENZI; MATOS, 2002).

No mercado brasileiro a estimativa é de que a atração de crescimento deste setor seja de aproximadamente 11% maior que com os medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008). No entanto, para que um produto natural se transforme em um medicamento deve-se garantir a integridade química e farmacológica do fitoterápico para que se possa assegurar o potencial terapêutico. Com isso, estudos prévios são necessários como: aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos e desenvolvimento de metodologias analíticas (TOLEDO et al., 2003).

Devido a um melhor controle de qualidade através de técnicas inovadoras de identificação, determinação e quantificação dos compostos é que a área de fitoterápicos passou a ter um crescimento notável em países desenvolvidos (YUNES et al., 2001). O Brasil possui um grande potencial de moléculas inovadoras devido a sua biodiversidade, apresentando uma vantagem competitiva de aproximadamente 55 mil espécies vegetais

catalogadas (BARATA; QUEIROZ, 1995; BRASIL, 2006), de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (GUERRA et al., 2007). Contudo, esta imensa diversidade brasileira ainda é pouco conhecida, permanecendo como o maior potencial de obtenção de novos produtos farmacêuticos (REIS et al., 2007).

No entanto, o avanço das políticas, programas e projetos do governo na área de desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos tem sido importante (RODRIGUES et al., 2006). A implantação do Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais tem o intuito de fornecer embasamento científico nas alegações populares sobre as diversas plantas medicinais utilizadas no país (JUNIOR et al., 2006).

Dentre as classes de compostos mais estudadas encontram-se os compostos fenólicos por ser um grupo largamente encontrado em plantas sendo essenciais para o crescimento e reprodução dos vegetais e nos alimentos, por serem responsáveis pela adstringência, cor, aroma e estabilidade oxidativa. Este grupo possui sua importância por estar envolvido com a redução da oxidação lipídica, além de reduzir o risco de desenvolvimento de algumas doenças e o envelhecimento precoce, atuando como antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2007). Diversos estudos mostram que alguns constituintes fenólicos possuem atividade antiinflamatória (LIMA et al., 1998), antiulcerogênica (AUDI et al., 1999), além de cicatrizante (LOPES et al., 2005), entre outras.

O processo de cicatrização está presente no cotidiano familiar, desde pequenas a grandes injúrias (SHERRAT; DALLON, 2002). É um processo complexo que atua no reparo tecidual através de sinais químicos, organização das células e da matriz celular, sendo normalmente divididos nas fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora.

No entanto, observa-se que a dificuldade na cicatrização de feridas pode ser uma consequência de estados patológicos como a diabetes, perturbações imune, isquemia e, em ferimentos, tais como queimaduras, ou através de fatores locais como infecção, procedimentos operatórios, isquemia tecidual (MENSAH et al., 2001; GALIANO et al., 2004). O diabetes prejudica numerosos componentes de cicatrização de feridas, incluindo hemostasia e inflamação, matriz de deposição e na angiogênese. Também é relatada a alteração do fluxo sanguíneo e diminuição do número de fatores de crescimento essenciais para a cicatrização de feridas, incluindo FGF-2, fator de crescimento derivados de plaquetas (PDGF-B) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GALIANO et al., 2004).

Devido aos custos dos tratamentos destas patologias, associadas a uma cicatrização deficiente, que a busca de novos medicamentos aceleradores do processo cicatricial vem tendo sua importância destacada, os quais são voltados principalmente para a neoformação do tecido. Para que este processo se torne eficaz é necessário que a ferida seja rapidamente fechada e espera-se que a cicatriz resultante seja esteticamente satisfatória e resistente (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). Nos últimos anos, os fitoterápicos

ganharam espaço importante na reparação do tecido, obtendo a partir deles formulações que agem no tratamento das feridas (BALBINO et al., 2005; SEHN et al., 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae compreende 727 gêneros e cerca de 19.327 espécies sendo a terceira maior família de Angiospermas. Do ponto de vista econômico, é uma das mais importantes famílias com representatividade ecológica. No Brasil, são encontrados cerca de 200 gêneros e 1.500 espécies que crescem em campos abertos e regiões de cerrado (LOPES et al., 2009).

A família Fabaceae vem sendo dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoidae e Faboideae e é considerada uma das três maiores famílias das angiospermas (DUTRA et al., 2008; LOPES et al., 2009).

Plantas pertencentes à família Fabaceae, subfamília Casealpinioideae são muito bem representadas no Brasil, sendo utilizadas na arborização de cidades e na indústria madeireira (JOLY, 2002). Apresentam como característica folhas pinadas ou bipinadas, raramente simples, com flores geralmente zigomorfas, com pétalas livres, corola com perfloração imbricada ascendente ou carenal. Os estames são geralmente duplos ao das pétalas (SOUZA; LORENZI, 2005; DUTRA et al., 2008).

2.2.2 Gênero *Caesalpinia*

O gênero *Caesalpinia* pertencente à família Fabaceae, subfamília Caesalpinioideae, é utilizada como bioindicador da poluição ambiental, além de estar sendo avaliada quanto sua ação farmacológica.

A *Caesalpinia sappan* L. possui compostos fenólicos derivados de 4 estruturas: brazileína, chalconas, protosappanina e homisoflavonoide. A partir das cascas, os extratos aquoso, clorofórmico, *n*-butanólico e metanólico, apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, padrão sensível e também contra os resistentes a meticilina. Outros estudiosos isolaram compostos como protosappanina A e B e brazileína (Figura 1) (KIM et al., 2004).

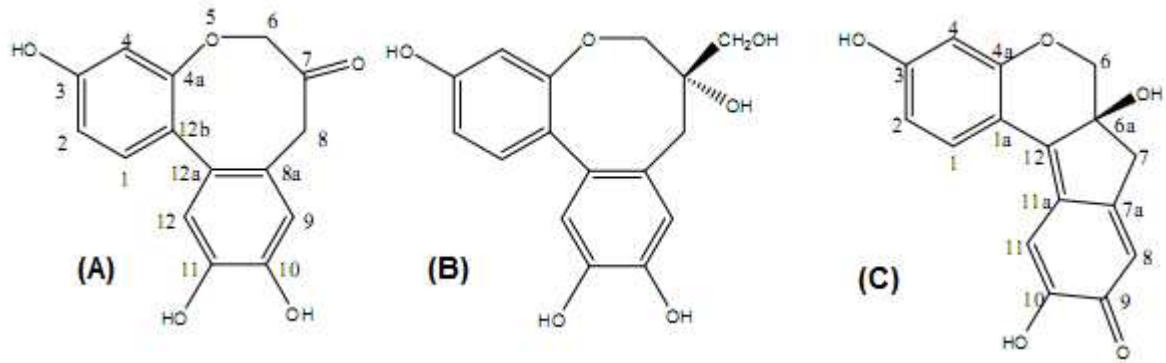


Figura 1 – Estrutura química de (A) protosappanina A, (B) protosappanina B e brazileína isolados de *Caesalpinia sappan* (FU et al., 2008).

A *Caesalpinia pulcherrima* é rica em fontes de diterpenoides, dentre eles a isovouacapenol A-D e pulcherriminas A e B (Figura 2) com ação contra bactérias e fungo e considerados ativos no DNA reparador de leveduras mutantes, respectivamente (Roach et al., 2003). O composto isolado isobonducelina apresenta atividade bacteriana contra bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus sphaericus* (SRINIVAS et al., 2003). As substâncias isoladas apresentaram resultados significativos e dose-dependente *in vivo*, inibindo os mediadores inflamatórios, óxido nítrico (NO) e citocinas [fator de necrose tumoral (TNF) - e interleucina (IL) -12] (RAO et al., 2005).

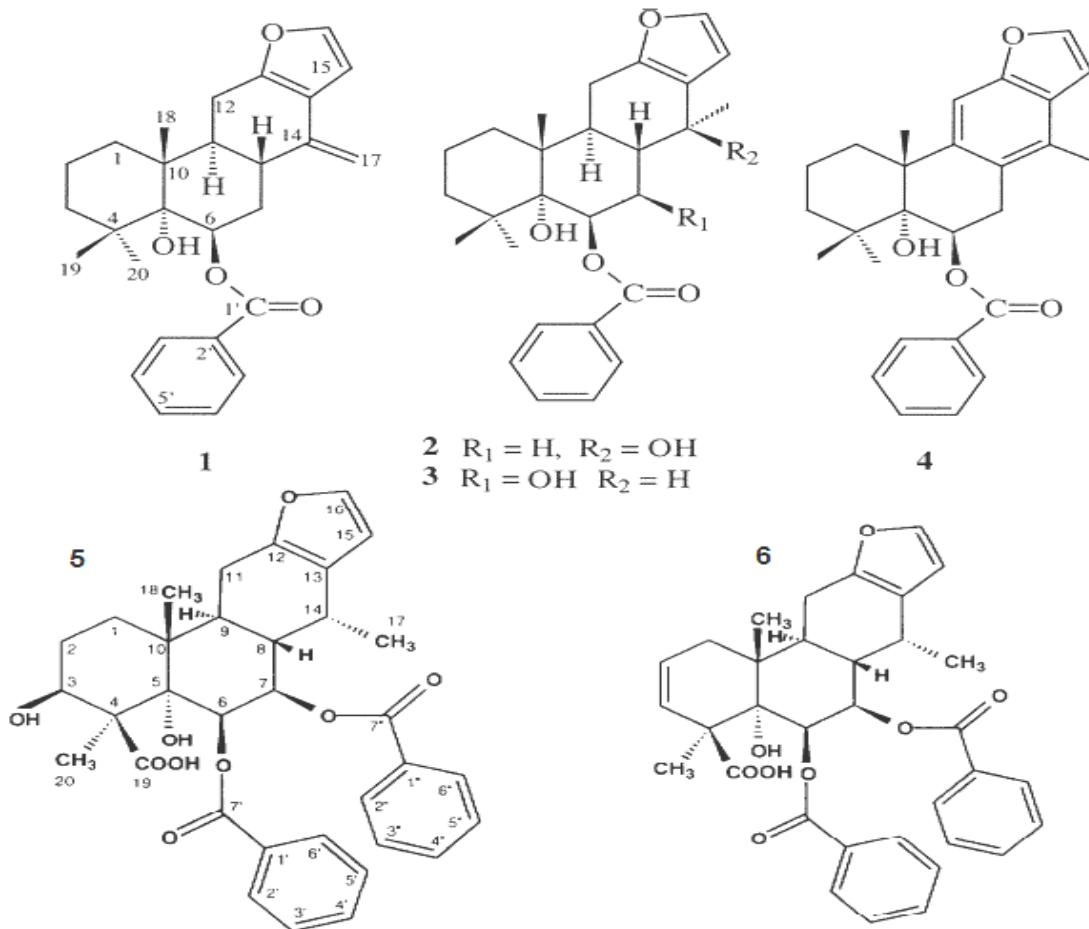


Figura 2 – Estrutura química de (1-4) isosovouacapenol A-D (RAGASA et al., 2002) e (5-6) pulcherrimas A-B (PATIL et al., 1997).

As sementes de *C. bonducella* demonstraram atividade antidiabética para diabetes tipo 2 em modelo crônico *in vivo* e partes da planta têm mostrado algumas atividades farmacológicas tais como antimicrobiana, adaptogênica, atividade contrátil na musculatura esquelética e atividade antifilarial (CHAKRABARTI et al., 2005; YADAV et al., 2007). Shukla et al. (2009) mostraram que a planta possui um potencial terapêutico para a prevenção de doenças auto-imunes e para atividade imunomoduladora.

As cascas e raízes de *C. benthamiana* são utilizadas popularmente no tratamento de infecções tópicas e feridas. Devido a este relato, Dickson et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana e antioxidante das substâncias isoladas do extrato de éter de petróleo das cascas e raízes levando em consideração que as feridas normalmente são impedidas de cicatrizar pela presença de alguns microorganismos, como *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Pseudomonas* sp., e espécies reativas de oxigênio. Deste extrato foi isolado, dois diterpenos, designados de bentaminina 1 e 2 e outro deoxicaesaldecarina C (Figura 3). A bentaminina 1 apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus flavus*. A bentaminina 2 apresentou maior atividade antioxidante

frente ao radical livre DPPH e IC_{50} de 42,7 μ M. Deoxicaesaldekarina C apresentou ambas atividades antibacteriana e antioxidante.

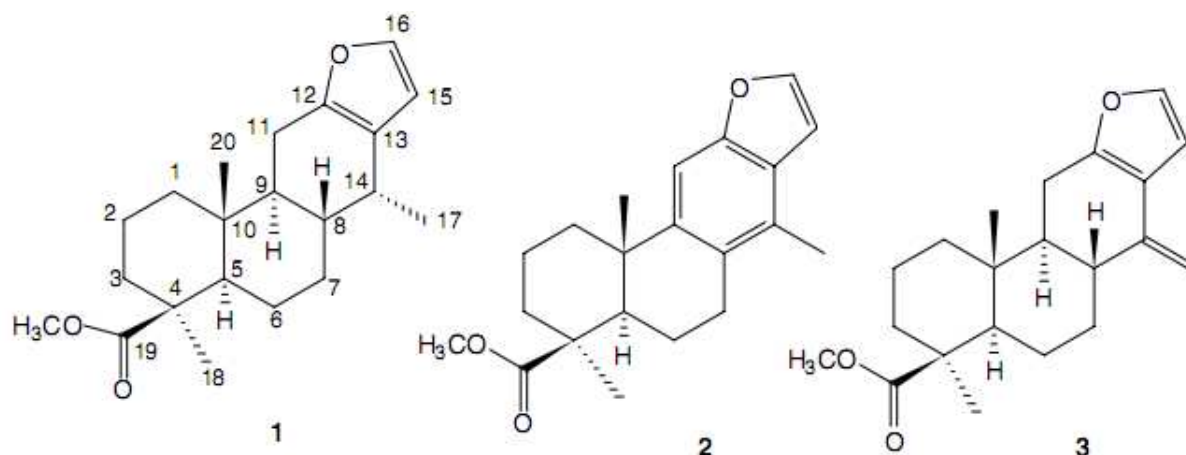


Figura 3 – Estrutura química de (1) deoxicaesaldekarina C, (2) bentaminina 1 e (3) bentaminina 2 (Dickson et al., 2007).

As sementes de *C. crista* são muito utilizadas no sudeste da Ásia como antihelmíntico, antipirético, antiinflamatório e agente antimalárico, além de tônico e tratamento de reumatismo (KALAUNI et al., 2004).

2.3.3 *Caesalpinia peltophoroides* Benth.

A espécie *Caesalpinia peltophoroides* Benth. conhecida popularmente como “sibipiruna” ou “falso pau Brasil” é utilizada como planta ornamental e possui potencial madeireiro. No Brasil é encontrada na região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro, sul da Bahia, São Paulo, Espírito Santo e na região do Pantanal no estado do Mato Grosso (CORTE et al., 2008). A madeira é muito utilizada na construção civil e na produção de móveis em geral, por ser pesada, dura e de média durabilidade (PONTES et al., 2006).

C. peltophoroides possui sinonímia científica com *Caesalpinia pluviosa* DC. e na Bolívia é utilizada para tratamento de disenteria (DEHARO et al., 2001). Extratos da casca de *C. pluviosa* apresentaram atividade antimalárica *in vitro* frente ao agente etiológico da malária, *Plasmodium falciparum*, cloroquina resistente, apresentando um IC_{50} de 8,3 μ g/mL (BAELMANS et al., 2000).

Del Lama e Peruquetti (2006) avaliaram o efeito do néctar das flores de *C. pluviosa* na mortalidade de abelhas. Concluíram que árvores individuais produziram ou não mortalidade de abelhas em diferentes períodos de floração e árvores vizinhas mostraram efeitos distintos em cada floração. Por outro lado, a toxicidade sobre as abelhas foi

igualmente variável. No entanto, o efeito tóxico está presumivelmente relacionado com uma substância presente nas flores e esta ainda é desconhecida.



Figura 4 – (A) Partes aéreas e (B) tronco da *Caesalpinia peltophoroides* (Foto: Fernanda Bueno, 02-05-09).

3 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho objetivou realizar o controle de qualidade farmacognóstico da matéria-prima vegetal, o desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de polifenóis totais e avaliação da atividade cicatrizante do extrato bruto das cascas de *Caesalpinia peltophoroides*.

CAPÍTULO 1

**CONTROLE DE QUALIDADE,
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA E DETERMINAÇÃO DO TEOR
DE TANINOS TOTAIS**

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS QUÍMICOS

1.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis constituem um dos grupos encontrados nas plantas e tem origem no metabolismo secundário, sendo muito importantes para o desenvolvimento e reprodução da mesma. Estas substâncias possuem como característica em sua molécula um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, além dos grupos funcionais, e podem ser encontrados na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) ou proteínas (SOARES, 2002; ANGELO; JORGE, 2007). Os grupos fenólicos são classificados conforme o esqueleto principal como: ácido fenólicos, cumarinas, flavonoides, fenóis simples, estilbenos, lignanas, ligninas, taninos condensados e taninos hidrolisáveis (SOUSA et al., 2007).

A maior parte dos compostos fenólicos são encontrados na forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo assim solúveis em água e em solventes orgânicos polares. São muito reativos quimicamente e podem formar pontes de hidrogênio intra ou intermolecular. Possuem como característica importante a complexação com metais, os quais são encontrados em sistemas biológicos (CARVALHO et al., 2004). No entanto, estes compostos são facilmente oxidáveis, por influência da luz, calor, alcalinidade do meio e através de enzimas.

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo importantes economicamente como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. O consumo destas substâncias vem sendo associada a diminuição do risco de acidente vascular, câncer e doença cardíaca coronária, além do retardamento do envelhecimento celular (PAPADOPOULOU; FRAZIER, 2004). O caráter antioxidante destes compostos permite a neutralização das espécies reativas de oxigênio, em grande parte resultantes da peroxidação lipídica, conferindo vasta atividade biológica. A atividade antioxidante relatada deve-se às suas propriedades redutoras e a sua estrutura química, desempenhando um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição (SOUSA et al., 2007; MATSUMOTO, 2008).

1.1.2 Taninos

A denominação tanino foi originada do termo “tanante” no qual se utilizava a infusão das cascas da castanheira e do carvalho para obtenção de couro de peles animais maleáveis e de grande durabilidade (QUEIROZ et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005). São solúveis em água e possuem massa molecular entre 500 e 3000 u, apresentando a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides e proteínas (MONTEIRO

et al., 2005). Tais substâncias são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais.

São classificados segundo a sua estrutura química em 2 grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são constituídos de ésteres complexos, formando uma cadeia central de carboidrato, geralmente *D*-glicose, cujas funções hidroxilas são esterificadas com o ácido gálico (OLIVEIRA; BERCHIELLI, 2007). Os taninos condensados ou procianidinas são compostos por unidades flavanol: flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (MONTEIRO et al., 2005) (Figura 2). Estes grupos se distribuem no reino vegetal seguindo padrões significativamente diferentes, enquanto os taninos condensados ocorrem amplamente em gimnospermas e angiospermas, os hidrolisáveis estão quase restritos às Choripetales das dicotiledôneas (SANTOS; MELLO, 2007).

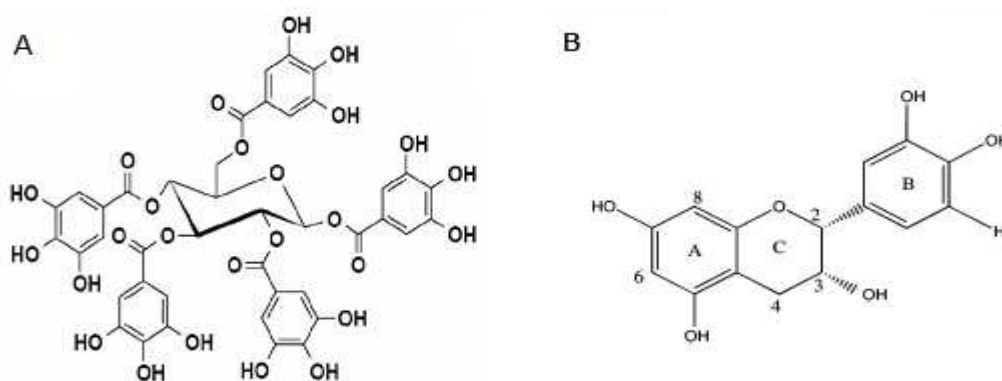


Figura 5 – Estrutura química de tanino hidrolisável (A) e condensado (B) (SCHOFIELD, 2001; CARVALHO, 2007).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996). Os complexos com proteínas podem ser de forma reversível (pontes de hidrogênio) ou irreversível (ligação covalente). As pontes de hidrogênio são formadas provavelmente entre as hidroxilas fenólicas dos taninos e as funções carbonílicas das ligações peptídicas das proteínas, gerando estabilidade entre elas (MONTEIRO et al., 2005). Esta propriedade de complexação com proteínas confere aos taninos a capacidade de inibir enzimas (SCHOLZ, 1994).

Na medicina tradicional este grupo fenólico é utilizado para o tratamento da diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais,

problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral e na indústria alimentícia como antioxidantes de bebidas (PANSERA et al., 2003).

Estudos científicos, através de testes *in vitro* de extratos ricos em taninos ou até de substância isolada, comprovam a ação biológica dos taninos, dentre elas: ação bactericida, fungicida (SANCHES et al., 2005), antiviral (OKUDA et al., 1993), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), ação antitumoral (OKUDA et al., 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006), inibição de *Cryptococcus neoformans* (ISHIDA et al., 2009), ação antioxidante (SANTOS; MELLO, 2007). Lopes et al. (2005) observaram que o extrato bruto da casca de *Stryphnodendron polyphyllum* influencia na proliferação celular do processo de cicatrização e sugeriram que esta atividade possa existir devido a presença de taninos.

A ação dos taninos na cura de feridas, queimaduras e inflamações ocorre através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína/ou polissacarídeo) sobre a pele ou mucosa danificada. Abaixo dessa camada, o processo natural de cura pode, então, ocorrer. O mesmo mecanismo de ação ocorre no caso das úlceras gástricas (HASLAM, 1998). Lopes et al. (2005) observaram que o tratamento de feridas cutâneas com extratos semipurificados das cascas de *S. polyphyllum* e *S. obovatum*, que contém altas concentrações de taninos, promove um aumento significativo na proliferação celular da epiderme.

1.1.3 Atividade antioxidante

1.1.3.1 Processo oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um processo fisiológico natural do organismo (endógeno), mas também pode estar associado a exposição por agentes ambientais (exógenos). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente aceitando quatro elétrons e resultando na formação de água. No entanto, durante este processo são formados compostos intermediários, as EROs, que se dividem em grupos radicalares como superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (HO^{\bullet}), peroxila (ROO^{\bullet}), alcóxila (RO^{\bullet}) e também os não-radicalares como o peróxido de hidrogênio e o oxigênio (SEIFRIED et al., 2007; VICENTINO; MENEZES, 2007). O radical hidroxila é o que provoca maior dano ao organismo, por apresentar uma meia-vida curta, sendo difícil de ser sequestrado *in vivo*. Este radical é formado a partir da reação de peróxido de hidrogênio com metais (M) de transição (cobre e ferro), presentes nas células, e também da quebra da água quando em exposição à radiação ultravioleta, radiação γ e raios x, segundo as equações 1 e 2, respectivamente (BARREIROS; DAVID, 2006).



Os radicais livres são formados a partir de reações de óxido-redução provocadas durante os processos de produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, síntese de substâncias e sinalização intercelular e são reconhecidos por apresentarem dois papéis distintos, um benéfico e o outro deletério a saúde (RATMAN et al., 2006; BARREIROS; DAVID, 2006; GÜLÇİN et al., 2010). O efeito benéfico ocorre pois, em concentrações baixas atuam na regulação da apoptose de células pré-cancerígenas, na ativação de fatores envolvidos na resposta imune e na modulação da expressão de códigos genéticos de enzimas antioxidantes (VICENTE, 2009). No entanto, estes radicais livres constituem moléculas cuja estrutura química possui elétrons desemparelhados, sendo instáveis e altamente reativos, resultando no estresse oxidativo.

A formação do estresse oxidativo deve-se a um desequilíbrio na taxa de produção e degradação dos antioxidantes, podendo levar a danificação de lipídios, proteínas, enzimas, carboidratos e DNA. Estes danos estão relacionados com o desenvolvimento do câncer, doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças auto-imunes, além de causar o envelhecimento precoce (Figura 3) (RATMAN et al., 2006; VICENTINO; MENEZES, 2007).

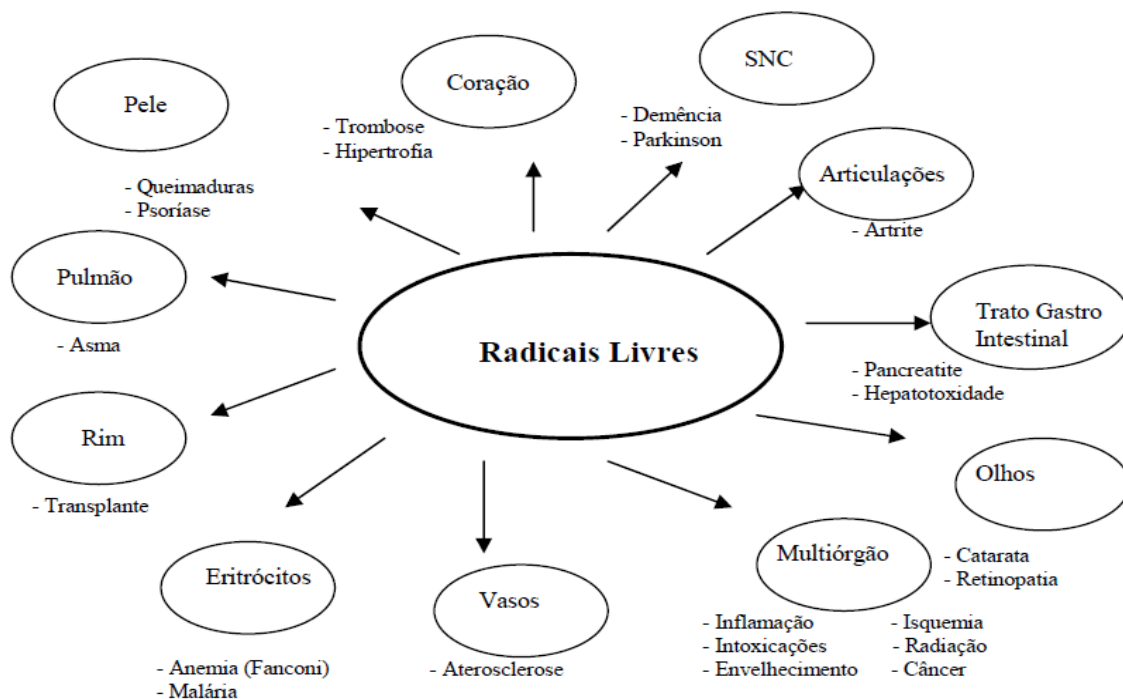
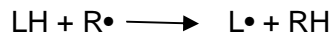


Figura 6 – Representação do local atingido pelas EROs e suas doenças associadas (RENZ, 2003 apud OLDONI, 2007).

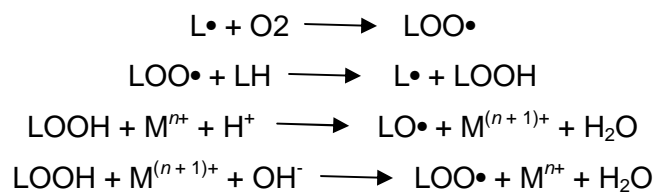
1.1.3.2 Processo de oxidação lipídica

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação é conhecida como sendo uma cascata de eventos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados, devido a suas múltiplas duplas ligações. Esse evento gera reações deletérias que causam alterações na sua estrutura, permeabilidade, alteração de fluxo iônico, e também está associado aos mecanismos de envelhecimento, câncer e a exacerbação da toxicidade de xenobióticos (MATSUMOTO, 2008). A lipoperoxidação pode ser dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação (ANTOLOVICH et al., 2002).

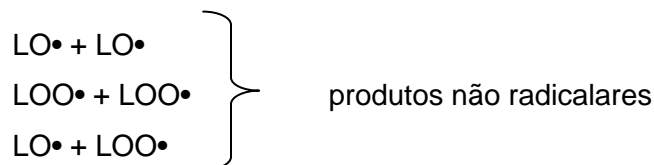
A iniciação ocorre na presença de um agente catalisador externo ($R\bullet$), como calor, luz ou íons metálicos, onde moléculas de lipídeos (LH) sofrem ataque deste agente que resulta na captura de um átomo de hidrogênio do carbono metileno da cadeia do ácido graxo, formando radical alquil ($L\bullet$):



A etapa de propagação ocorre como consequência da primeira etapa, onde os radicais livres formados passam a reagir com o oxigênio formando o radical peroxila ($LOO\bullet$). Este radical é muito instável e posteriormente reage com um hidrogênio dando origem a um hidroperóxido lipídico ($LOOH$). Íons metálicos, como o ferro e o cobre, podem através deste hidroperóxido formar radicais lipídicos alcóxila, peroxila e hidroxila:



Na última etapa, de terminação, ocorre uma reação em cadeia entre os radicais originando produtos não radicalares, sendo o principal deles o malondialdeído, que é altamente tóxico:



1.1.3.3 Antioxidante

Para se proteger dos efeitos indesejáveis dos radicais livres, os organismos aeróbios desenvolveram sistemas defensivos, como a utilização de antioxidantes, que possuem o potencial de neutralizar os radicais livres, retardando ou inibindo a sua ação de oxidação. Os antioxidantes possuem ampla função contra a peroxidação lipídica, retardam algumas doenças crônicas e estão associados na proteção da degradação oxidativa em alimentos (GULÇIN et al., 2010).

O organismo humano possui diversos mecanismos de defesa antioxidante, como a presença de antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos constituem a defesa endógena aos ataques dos EROs estando localizadas no interior das células agindo tanto para a prevenção da oxidação gerada pelos radicais livres quanto na reparação dos danos causados. Como exemplo de antioxidantes enzimáticos tem-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e outros. A SOD é uma enzima importante na eliminação do radical superóxido (O_2^-), formado a partir do oxigênio, requerendo a presença de metais como o cobre, zinco e manganês. A CAT é uma enzima abundante no corpo humano e que o protege contra o peróxido de hidrogênio, convertendo-o em água e oxigênio molecular. A GPx atua semelhante ao SOD, impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio (RATMAN et al., 2006; BARREIROS; DAVID, 2006). Os antioxidantes não enzimáticos, na sua grande maioria, são provenientes da alimentação. Eles agem na neutralização dos radicais livres, quelando metais e bloqueando a ação das espécies reativas. Como exemplo tem-se as vitaminas E e C.

Também existem antioxidantes sintéticos, sendo os mais utilizados o butil-hidróxi-anisol (BHA), butil-hidróxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Estes compostos possuem uma estrutura fenólica que permite a doação de um próton a um radical livre, bloqueando a oxidação. No entanto, estes compostos têm demonstrado em estudos com animais, alta toxicidade, podendo causar efeito carcinogênico e mutagênico. No Brasil, o Ministério da Saúde limita o uso destes antioxidantes determinando concentrações máximas permitidas (MOURE et al., 2001; RAMALHO; JORGE, 2006; GULÇIN et al., 2010). Com isso, surgiu a necessidade de buscar antioxidantes naturais, principalmente os isolados de plantas, como fontes mais seguras para produtos alimentícios e farmacêuticos (SILVA et al., 2009).

Compostos fenólicos possuem grande destaque como agentes antioxidantes por serem eficientes captadores de EROs e por reduzir ou quelar metais, os quais catalisam a lipoxidação (ANDRADE et al., 2007). Esta atividade ocorre devido às propriedades dos grupos fenólicos em agirem como agentes redutores, eliminando o oxigênio singlete (MORAIS et al., 2009).

1.2 ASPECTOS ANALÍTICOS

1.2.1 Validação de metodologia analítica para a determinação de polifenóis totais

A validação de métodos analíticos surgiu com a necessidade de se comprovar que as análises realizadas resultassem em métodos comparáveis, rastreáveis e confiáveis, garantindo a eficiência da técnica e da rotina do laboratório. Resultados analíticos não confiáveis geram desperdício financeiro, além de comprometer a credibilidade do laboratório. A validação constitui um procedimento fundamental que verifica se o método é adequado para o seu propósito, assegurando a confiabilidade dos dados produzidos (RIBANI et al., 2004).

A Resolução Específica (RE) nº 899, de maio de 2003, “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos” da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina os requisitos necessários para a validação de metodologia, tais como: especificidade, precisão, linearidade, robustez, limite de detecção e quantificação e exatidão. Este processo deve ocorrer quando as metodologias já descritas são modificadas, na inclusão de novas metodologias ou no uso de novos equipamentos. Outra agência que determina os procedimentos de validação é o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) (BRASIL, 2003; SOBRINHO et al., 2008).

Existem métodos normalizados descritos em compêndios oficiais, como exemplo as farmacopeias, que apresentam metodologias validadas descritas em cada uma das monografias, não sendo necessária a revalidação destes procedimentos. Quando se trata de plantas medicinais, observa-se a carência de monografias oficiais individuais devido à grande diversidade de espécies existentes (TOLEDO et al., 2003). O desenvolvimento e validação destas metodologias analíticas é importante devido à monografia ser utilizada para garantir a produção de fitoterápicos de qualidade.

Contudo, tem-se observado em diversos trabalhos, com abrangência nas áreas biológicas, farmacêutica e química, métodos validados para a quantificação de compostos ou até mesmo do marcador químico no extrato vegetal. Devido a complexidade da droga vegetal existem definições, parâmetros, procedimentos e estratégias para a realização da validação da metodologia analítica (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004).

No caso da metodologia para a determinação do teor de taninos totais existem diversas técnicas, dentre elas encontram-se métodos por precipitação de metais ou proteínas e também por ensaios colorimétricos. O método colorimétrico é o mais utilizado, no entanto possui suas limitações devido a cada composto fenólico poder produzir intensidade de cor diferente por unidade de massa. Este tipo de análise só pode ser usada para a comparação semi-quantitativa com um padrão externo. No entanto, alguns autores confirmam que não existe método de doseamento de taninos ideal, sendo ainda os métodos colorimétricos os mais utilizados (MONTEIRO et al., 2005; ANGELO; JORGE, 2007).

Para a quantificação de taninos condensados os métodos utilizados são análise colorimétrica com butanol-HCl e vanilina produzindo antocianidinas vermelhas. Para taninos hidrolisáveis destacam-se reações colorimétricas específicas como os ensaios com reagente KIO_3 fornecendo coloração rosa, reagente de Rodanina para cor púrpura e, reagente NaNO_2 para coloração vermelha. Entretanto, estas reações apresentam algumas desvantagens, como a especificidade para alguns grupos de taninos hidrolisáveis e a inviabilidade da execução da técnica numa rotina laboratorial (MONTEIRO et al., 2005).

Dentre os métodos colorimétricos o azul de Prússia e Folin-Denis, posteriormente modificado e aperfeiçoado para Folin-Ciocalteu, são os mais utilizados, tendo sido modificados inúmeras vezes. Estes doseamentos não são específicos para um grupo de polifenóis, mas determinam o total de compostos fenólicos. O azul da Prússia é um método rápido, fácil e possui pouca interferência de compostos não fenólicos, no entanto possui alguns pontos negativos como precipitação e dependência do tempo e temperatura, se tornando um método sem estabilidade. Já o Folin-Ciocalteu além de possuir menos interferência dos compostos não fenólicos, estudos revelam que ele é mais sensível que o Azul da Prússia (SCHOFIELD et al., 2001; MONTEIRO et al., 2005).

A metodologia de determinação de polifenóis totais (PT) pela redução do ácido fosfotúngstico formando a coloração azul é muito utilizada em diversos laboratórios, mas é uma técnica considerada por Cicco et al. (2009) generalizada. Este termo é dado pelo fato de detalhes específicos da técnica serem modificados, como a concentração de carbonato de sódio, o comprimento de onda, a sequência de reagentes adicionados, o tempo e a temperatura da análise. Além disso, a adição de outro solvente que não seja água pode interferir na formação da pigmentação azul (CICCO et al., 2009). A Farmacopeia Europeia (2007) determina como geral a técnica de determinação de taninos, ou seja, para qualquer planta utilizada a metodologia permanece a mesma. Na Farmacopeia Brasileira, os métodos são determinados para cada monografia de planta na qual a determinação é requerida. A mesma apresenta diferentes técnicas, tanto no tempo de leitura (2 para 25 a 30 min) quanto na absorvância utilizada (730 a 760 nm), na quantidade de Folin-Ciocalteu e na concentração do carbonato de sódio, sendo que estes diferem da Farmacopeia Europeia (VERZA et al., 2007).

O método de Folin-Ciocalteu é rotineiramente utilizado por laboratórios, mas assim como as farmacopeias, eles apresentam diversas variações em seus métodos (CICCO et al., 2009). Glasl (1983) utilizou reagente Folin-Ciocalteu, 15 min para a realização da leitura, comprimento de onda de 691 nm e solução de carbonato de sódio 14,06%. Turkmen et al. (2006) utilizaram no método 35% de carbonato de sódio, 30 min para a leitura e uma absorvância de 700 nm. Tawaha et al. (2007) utilizaram ácido gálico como padrão, 2,5 mL de Folin-Ciocalteu e 765 nm de absorvância, com uma incubação das amostras a 30 °C e

com tempo de leitura de 1,5 h. A preocupação com estas variações de métodos está na incompatibilidade dos resultados.

As técnicas espectrofotométricas utilizadas para quantificar polifenóis totais não são específicas para taninos. A determinação de taninos é realizada mediante adsorção com substratos protéicos (pó-de-pele ou caseína). Pode-se afirmar que a variabilidade de resultados experimentais está associada tanto ao tipo (purificada ou grau técnico) como à quantidade de caseína utilizada, que podem levar à obtenção de resultados errôneos. O pó-de-pele, assim como a caseína, demonstra capacidade de complexar com outros polifenóis além dos taninos, independente da quantidade utilizada na reação, demonstrando uma falta de seletividade do método de determinação de taninos totais (VERZA et al., 2007).

Outra variação que ocorre nas metodologias publicadas é a utilização do padrão externo. As Farmacopeias Brasileira e Europeia apresentam o pirogalol como padrão, no entanto artigos científicos mostram o teor de taninos expressos em ácido gálico e ácido tânico (QUEIROZ et al., 2002; PANSERA et al., 2003; SOUSA et al., 2007). Assim, devido a grande variação entre os métodos existentes para a determinação de polifenóis totais é que se torna necessária a padronização e validação de uma metodologia analítica para que se possa assegurar a confiabilidade dos resultados.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Decorrente das necessidades normativas que se refere à regularização de fitoterápicos este trabalho teve como objetivo:

- Avaliar a qualidade das cascas de *Caesalpinia peltophoroides* pelos ensaios de controle farmacognóstico.
- Preparar o extrato bruto das cascas de *C. peltophoroides* e obtenção de frações semipurificadas.
- Validar a metodologia analítica para a determinação do teor de polifenóis totais por espectrofotometria UV/Vis do extrato bruto das cascas de *C. peltophoroides*.
- Determinar o teor de polifenóis totais e taninos totais do extrato bruto e frações semipurificadas.
- Determinar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e frações semipurificadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth®, exceto quando especificado.

- Acetona
- Ácido gálico
- Ácido tânico
- Álcool de cereais - Cereálcool
- BHT
- Carbonato de sódio anidro
- Catequina
- DPPH
- Metanol grau HPLC
- Nitrogênio líquido – Departamento de Física da UEM
- Pirogalol
- Pó de pele levemente cromado Freiberg®
- Reagente de Folin-Ciocalteu - Dinâmica
- Trolox
- Vitamina C

3.2.2 Equipamentos

- Agitador magnético Fisatom
- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Banho-maria Fanem mod 120/3
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Bomba a vácuo Vacuumaster 15601
- Desumidificador de ar Arsec modelo 250M3U
- Espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS PC-1650
- Estufa 105 °C J. Prolab JP101
- Evaporador rotatório Büchi R-114 capacidade 2 L
- Evaporador rotatório Büchi R-153 capacidade 20 L
- Liofilizador – Christ Alpha 1-4
- Moinho de martelos Tigre ASN-5

- Mufla LML
- Tamisador vibratório - RETSCH.
- Turbolizador Sire 2 L
- Ultra-som Unique USC 1540, 25 Hz
- Ultra-turrax UTC 115KT

3.2 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As cascas do vegetal *Caesalpinia peltophoroides* Benth. foram coletadas no campus da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. Uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Maringá, e está registrada sob o número HUEM 12492. As cascas foram fragmentadas com auxílio de tesouras de poda manual e após secagem em estufa com circulação de ar forçada (Figura 7), foram moídas em moinho de martelos de aço inox Tigre ASN-5 sendo posteriormente utilizadas nas análises descritas na Figura 8.



Figura 7 – Cascas secas de *C. peltophoroides* (Foto: Fernanda Bueno, 21-05-2009).

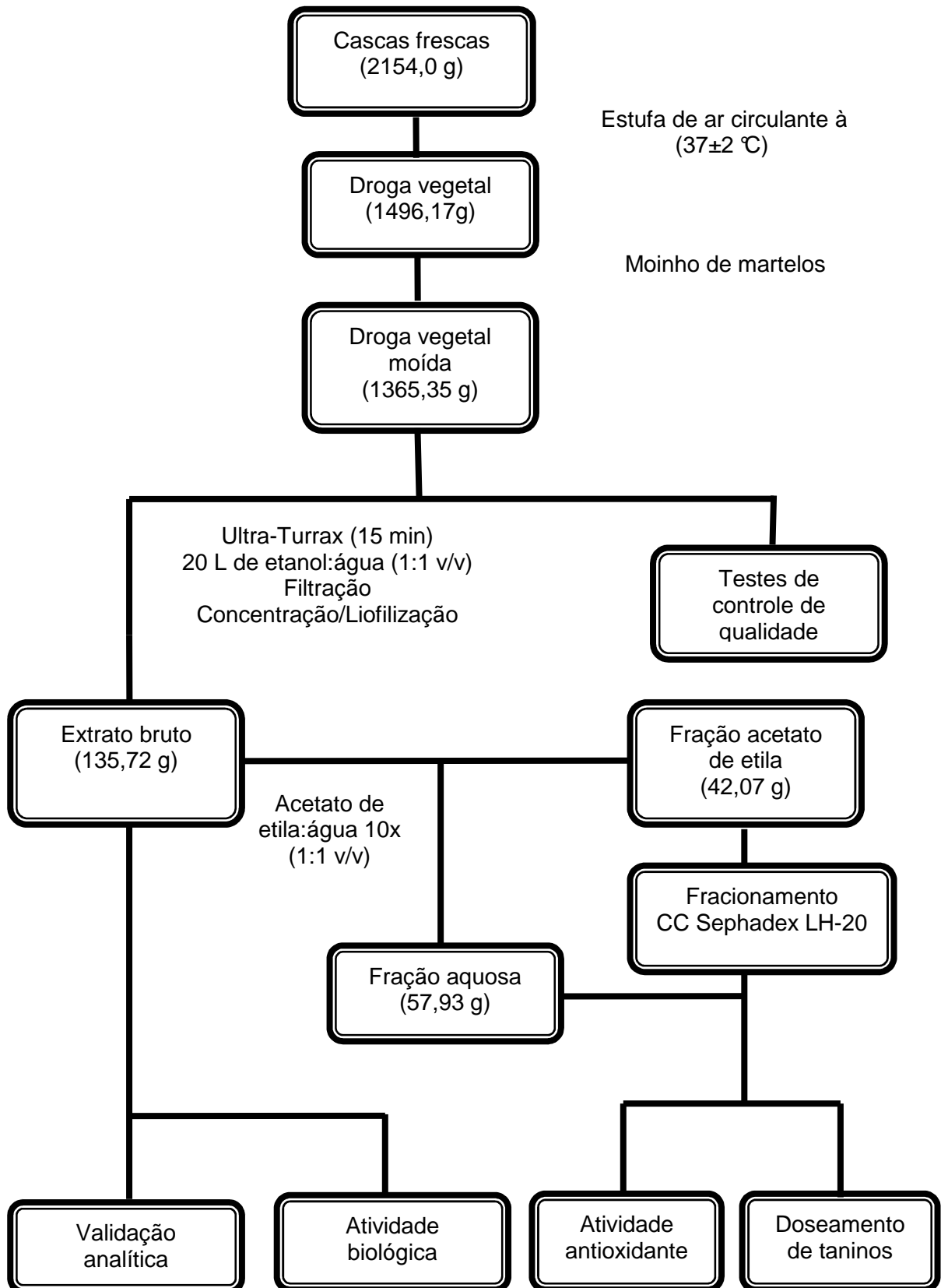


Figura 8 – Rota de trabalho e obtenção do extrato bruto de *C. peltophoroides*.

3.3 CONTROLE DE QUALIDADE

As técnicas para a avaliação da qualidade da droga vegetal foram realizadas segundo normas farmacopeicas e não farmacopeicas.

3.3.1 Análises Físico-Químicas

3.3.1.1 Perda por dessecação

Em pesa-filtros previamente tarados, foram pesadas 2,0 g da droga vegetal e em seguida colocados em estufa por 2 h, à temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, os pesa-filtros foram pesados e recolocados em estufa por mais 30 min. Este procedimento foi repetido até obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual, pela média de três determinações.

3.3.1.2 Determinação do teor de extrativos

Foram pesados exatamente cerca de 1,0 g da droga vegetal cominuída, sendo submetida à decocção com 100,0 mL de água, durante 10 min. Após o resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico e seu volume completado para 100,0 mL. Após filtração em papel filtro, desprezando-se os primeiros 20,0 mL, foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g do filtrado, em pesa-filtro previamente tarado, e este foi levado à evaporação até *secura* em banho-maria. O pesa-filtro contendo o resíduo obtido foi colocado em estufa, à temperatura de 105 °C até peso constante, resfriado em dessecador e pesado. As determinações foram realizadas em triplicata.

3.3.1.3 Determinação do teor de resíduo seco

Utilizou-se a mesma metodologia aplicada para a determinação de extrativos, parcialmente alterada empregando-se refluxo, e as soluções utilizadas foram: etanol 50% (v/v), etanol 70% (v/v) e etanol 100%. O resultado foi expresso em relação a 100,0 g do extrato, pela média de três determinações.

3.3.1.4 Determinação de cinzas totais

Cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada foram pesadas e transferidas para cadinho, previamente calcinado, resfriado e pesado. Após distribuir a amostra uniformemente no cadinho esta foi incinerada, não ultrapassando 450 °C, até que todo o carvão fosse eliminado. O mesmo foi resfriado e pesado, sendo calculada a porcentagem de cinzas totais em relação à droga vegetal seca ao ar (FARMACOPEIA, 1988).

3.3.2 Análise quantitativa

3.3.2.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais

Em um erlenmeyer contendo 150 mL de água destilada foi adicionado cerca de 750 mg de droga vegetal pulverizada e colocada em banho-maria à temperatura de 80 °C por 30 min. Após o resfriamento em água corrente, transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 250 mL e seu volume completado com água destilada. A solução resultante foi filtrada e os primeiros 20 mL desprezados. O filtrado obtido foi denominado de Solução-mãe (Sm).

Para a determinação de polifenóis totais (PT), 5 mL da Sm foram diluídos com água em um balão volumétrico de 25 mL. Transferiram-se 2 mL dessa solução para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 mL de água, sendo o balão completado com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução foi medida a absorbância a 760 nm, empregando-se a água como branco.

Para a determinação de polifenóis não adsorventes (PNA), adicionaram-se 10 mL da Sm em um bécker contendo 0,100 g de pó-de-pele R e o mesmo foi agitado durante 60 min. Após a solução ser filtrada, 5 mL do filtrado foram diluídos em água em balão volumétrico de 25 mL. Dois mililitros dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 mL de água, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução foi medida a absorbância a 760 nm, empregando-se a água como branco.

Para o preparo da solução mãe do padrão de pirogalol utilizou-se 2,5 mg deste padrão em um balão volumétrico de 100 mL, sendo diluído em água destilada. Dois mililitros dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2 *N*) e 10 mL de água, completando-se o volume com solução de carbonato de sódio 10,75%. Após 30 min da adição da última solução foi medida a absorbância a 760 nm, empregando-se a água como branco.

Para a determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais de extratos e frações, a mesma técnica foi realizada, no entanto, a etapa de extração não foi necessária. A quantidade de extrato ou fração utilizada foi equivalente a 0,750 g de planta e calculada com base nos seus respectivos rendimentos em teor de extrativos e/ou resíduo seco. Os doseamentos foram realizados em triplicata (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2007).

A porcentagem de taninos totais foi calculada segundo a expressão:

$$TT = \frac{62,5.(A_1 - A_2).m_2}{A_3.m_1}$$

Em que:

PT = polifenóis totais (%)

PNA = polifenóis não adsorventes (%)

A1 = absorvância da solução amostra para polifenóis totais

A2 = absorvância da solução amostra para polifenóis não adsorventes

A3 = absorvância da solução padrão de pirogalol

m_1 = massa da amostra utilizada no ensaio, em gramas, considerando a determinação de água;

m_2 = massa do padrão de pirogalol, em gramas.

TT = teor de taninos totais (%)

3.4 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS

3.4.1 Extrato bruto (EB)

As cascas secas foram cominuídas em moinho de martelos, empregando-se o material sem separação granulométrica. Após, foram levadas a Ultra-turrax UTC115KT por 15 min, sendo que a cada 5 min esperou-se intervalo de 5 min para que a temperatura do equipamento não excedesse 40 °C. Para cada 50 g de droga vegetal, seca e moída, empregaram-se 500 mL de álcool 50% como líquido extrator, na proporção inicial de 10% (p/v). Após filtração do extrato e posterior evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório sob pressão reduzida, o extrato foi congelado e liofilizado, obtendo-se assim o extrato bruto (EB).

3.4.2 Fração acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ)

O EB (50 g) foi disperso em 500 mL de água destilada e particionado 10 vezes com 500 mL, cada vez, de acetato de etila (MELLO et al., 1996). As fases acetato de etila reunidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas, obtendo-se a fração acetato de etila (FAE). A fase aquosa restante também foi concentrada, congelada e liofilizada, obtendo-se a fração aquosa (FAQ).

3.5 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.5.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila

A FAE foi fracionada, separadamente, empregando-se uma coluna de vidro (h: 15 cm Ø 2,5 cm) contendo SEPHADEX® LH-20 como fase estacionária. Após limpeza apropriada com ácido acético glacial 2%, a coluna foi estabilizada com álcool 50% (v/v). Adicionaram-se ao topo da coluna, com auxílio de pipeta de Pasteur, cerca de 3 g da FAE, previamente diluído com o mínimo de álcool 50%. Após, seguiu-se a sequência de fase móvel em proporção volumétrica:

1. Etanol/água (1:1) 500 mL
2. Etanol 100% 400 mL
3. Metanol/água (1:1) 300 mL
4. Metanol 100% 300 mL
5. Acetona/água (7:3) 300 mL

Ao final da coluna, o monitoramento das frações foi realizado por cromatografia em camada delgada (seção 3.5.2), resultando em cinco frações: F1, F2, F3, F4 e F5. Estas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas.

3.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada em cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck®) com 0,200 mm de espessura, utilizando-se como sistema eluente, acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram visualizadas sob luz UV a 254 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em etanol.

3.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

3.6.1 Determinação da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

Faixa de trabalho: para se obter a faixa de trabalho do extrato bruto, das frações e dos antioxidantes sintéticos, utilizados como padrão, realizaram-se diluições destes de modo a se obter concentrações de 0,2 a 80,0 µg/mL em metanol com um volume final de 3 mL. A seguir, foram adicionados a cada concentração 375 µL de solução de DPPH (1 mM) com posterior agitação. A faixa de trabalho foi definida comparando-se as amostras com o controle negativo.

Preparo das Amostras: o extrato bruto, as frações e os antioxidantes sintéticos foram diluídos seguindo cada um sua faixa de trabalho pré-determinada em metanol, de modo a se

completar 3 mL de solução final. A estas soluções acrescentaram-se 375 µL de solução de DPPH (1 mM).

Solução Branco: foi preparada com solução metanólica de BHT (2 mg em 4 mL de metanol) adicionada de 500 µL de solução de DPPH (1 mM).

Controle negativo: foi preparada com solução metanólica contendo 3 mL de metanol adicionada de 375 µL de solução de DPPH (1 mM).

As amostras, a solução branco e o controle negativo foram agitadas em vórtex por 15 s e deixadas em repouso na ausência de luz durante 30 min. As absorbâncias das soluções resultantes foram medidas a 517 nm.

As amostras foram preparadas em triplicata. As curvas foram estabelecidas e assim calculou-se o IC₅₀, que significa a concentração que possui 50% da atividade antioxidante.

Calculou-se a atividade de seqüestro de radicais (%ASR) pela porcentagem de descoloramento do DPPH, usando a seguinte equação (AMAROWICZ et al., 2004):

$$\%ASR = \frac{AbsCN - AbsA}{AbsCN} \cdot 100$$

Onde:

AbsCN = Absorbância do controle negativo

AbsA = Absorbância da amostra

3.7 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA

3.7.1 Padronização da metodologia analítica

Anterior ao processo de validação, os padrões (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogallol) e o EB de *C. peltophoroides* foram submetidos a uma etapa de padronização seguindo três parâmetros: cinética de reação, comprimento de onda de absorção máxima e substância de referência que melhor caracteriza o EB de *C. peltophoroides*. Utilizou-se como parâmetro para a diluição da amostra e o padrão a metodologia geral descrita pela Farmacopeia Europeia para a determinação de polifenóis totais (PT).

Preparo dos padrões e da amostra: pesou-se individualmente 2,5 mg dos padrões ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogallol, sendo diluído em balão volumétrico de 100 mL em água destilada e 5 mg de EB de *C. peltophoroides*, sendo diluído em balão volumétrico de 25 mL em água destilada. Desta solução transferiram-se 2 mL de cada solução para balões volumétricos de 25 mL adicionando-se 10 mL de água destilada, 1 mL de reagente fosfomolibdotúngstico R e completou-se o volume com solução de carbonato de sódio anidro 10,75% (p/v), obtendo-se as concentrações finais de 2 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro no período de 10 a 40 min

após a adição da última solução, em intervalos de 2 min entre cada leitura, determinando-se os espectros de varredura entre 400 e 800 nm. Água destilada foi utilizada como branco. A comparação do percentual de aumento na absorbância de cada solução foi realizada considerando os comprimentos de onda de 691 (GLASL, 1983), 715 (FARMACOPEIA, 2004), 760 (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007) e 800 nm. Esse percentual foi calculado dividindo-se a diferença das absorbâncias médias entre dois comprimentos de onda pela absorbância média do comprimento de onda menor e multiplicando por 100. Em seguida foi realizada a comparação do percentual de aumento na absorbância de cada solução considerando os tempos de leitura de 10, 20, 30 e 40 min após o início da reação a 760 nm.

Para se confirmar o melhor padrão a ser utilizado calculou-se a absorvidade molar de cada uma das substâncias (padrões e extrato bruto) através da equação:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

Onde:

A = absorbância da amostra, em $\mu\text{g/mL}$

ϵ = absorvidade molar, em mol/L

b = espessura da célula, em cm

c = concentração da amostra, em g/100 mL

3.7.2 Validação da metodologia analítica

Para a validação utilizou-se como padrão o pirogalol e nas demais análises o EB de *C. peltophoroides*, seguindo a mesma metodologia de determinação do teor de polifenóis totais (seção 3.3.2.1). Todas as análises seguiram os critérios da RE nº 899/2003 e foram realizadas em triplicata (BRASIL, 2003).

A solução mãe amostra (SMA) foi preparada a partir de 25 mg do EB de *C. peltophoroides* diluídos com água destilada em balão volumétrico de 25 mL, obtendo uma concentração final de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

3.7.2.1 Curva de calibração da substância de referência (pirogalol)

Para a determinação das absorbâncias teóricas do teste de exatidão e a absorbância específica da substância, foi realizada a curva de calibração com 5 pontos de concentração 1,6, 2,4, 3,2, 4,1 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$, utilizando-se como solução mãe padrão (SMP) 8 mg de pirogalol sendo diluído com água destilada em balão volumétrico de 10 mL.

3.7.2.2 Linearidade

Foi determinada a partir de diluições decrescentes de uma amostra de concentração alta (32,45 µg/mL) até se obter uma faixa de trabalho que se apresentasse linear, seguindo a Lei de Lambert-Beer. Foram utilizadas soluções de EB de *C. peltophoroides* com concentrações finais de 6,4, 12,8, 16,0, 22,4 e 26,88 µg/mL. Após a determinação das leituras em 760 nm foi realizada a análise da equação da reta onde o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser igual ou maior que 0,99. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

3.7.2.3 Intervalo

O intervalo foi determinado pelo limite de quantificação inferior e superior, sendo que o mesmo deve seguir os requisitos para linearidade além de mostrar exatidão e precisão, seguindo a lei de Lambert-Beer.

3.7.2.3 Limite de detecção (LD)

Este estudo foi realizado por sucessivas diluições da amostra da menor concentração da curva de linearidade (a partir de 6,5 µg/mL) até a menor concentração detectável do analito. O resultado foi determinado a partir da curva da linearidade do EB de *C. peltophoroides* pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa \cdot 3}{IC}$$

Em que:

LD: limite de detecção;

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva;

3 = relação sinal-ruído.

3.7.2.4 Limite de quantificação (LQ)

Este estudo foi realizado através de sucessivas diluições da menor amostra da curva de linearidade (a partir de 6,5 µg/mL), sendo o limite de quantificação determinado pela menor concentração que obteve precisão e exatidão. Foi determinada a menor amostra que manteve a linearidade da curva dentro do critério de aceitação de linearidade, coeficiente de correlação (r) igual ou maior que 0,99. O limite de quantificação inferior (LQ) foi determinado a partir da curva da linearidade do EB de *C. peltophoroides* pela fórmula:

$$LQ = \frac{DPa.10}{IC}$$

Em que:

LQ: limite de quantificação;

DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva;

10 = relação sinal-ruído.

3.7.2.6 Precisão

Foram analisadas 6 determinações da amostra com concentração final de 16,0 µg/mL do EB de *C. Peltophoroides* (análise I). Avaliou-se a precisão intra-dia (repetibilidade), na qual se repetiu as determinações no mesmo dia da análise I, e a precisão inter-dias (precisão intermediária), que foi analisada com um intervalo de 2 dias da análise I, não sendo admitido coeficiente de variação superior a 5%.

3.7.2.7 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela porcentagem de recuperação, considerando adição de três massas conhecidas 1, 2 e 3 mg (baixa, média e alta) da substância de referência (pirogalol), em triplicata, à solução mãe da amostra 100% da linearidade de EB de *C. peltophoroides*, resultando em uma concentração final de padrão de pirogalol de 0,064, 0,128 e 0,192 µg/mL. Para se determinar a recuperação, foram utilizadas como absorbâncias esperadas os valores encontrados na curva de calibração do padrão e na linearidade do EB.

3.7.2.8 Especificidade e Seletividade

Foi determinada pela adição do padrão de pirogalol nas soluções da linearidade do EB de *C. peltophoroides* resultando em uma concentração final de pirogalol nas amostras de 3,2 µg/mL. Os resultados foram plotados em um gráfico para se verificar a linearidade da curva e a mesma foi comparada com a curva da linearidade do EB de *C. peltophoroides*, onde as curvas paralelas indicam a especificidade do método.

3.7.2.9 Robustez

Para se determinar a robustez do método foi avaliada a estabilidade da solução à luz (realizado o teste sem proteção da luz) e influência do pH na reação colorimétrica (ensaio com solução de carbonato de sódio anidro a 14,06% e 7,5% (p/v)).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa Statistica[®] 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os resultados foram expressos como a média±desvio padrão [coeficiente de variação (%)] e os mesmos foram analisados utilizando análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas através do teste de Dunnett em comparação com o grupo controle, considerando $P < 0,05$ como critério de significância. Os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples e residual, considerando r igual ou maior que 0,99. A correlação entre taninos totais e IC_{50} foi determinada pela correlação de Pearson.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CONTROLE DE QUALIDADE

O controle de qualidade das cascas da droga vegetal *Caesalpinia peltophoroides* foi realizado a partir de técnicas farmacopeicas e não farmacopeicas, sendo elas: perda por dessecação, perda por secagem, teor de extrativos, resíduo seco e teor de cinzas. Por ser uma droga vegetal pouco estudada, a *C. peltophoroides* não apresenta dados sobre o controle de qualidade em literatura.

Na análise de perda por secagem obteve-se uma perda de água de 30,54%, com um rendimento de cerca de 70% da droga vegetal seca. De acordo com a Tabela 1, a perda por dessecação e o teor de cinzas apresentaram-se dentro dos limites preconizados pelas farmacopeias, com variação de 8 a 14% para a umidade (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; FARIAS, 2007) e máximo de 14% de cinzas totais (FARMACOPEIA, 1988).

Quanto ao teor de extrativos (Tabela 1), referente à quantidade de constituintes que são extraídos da droga vegetal durante o processo de extração com água como líquido extrator, obteve-se como resultado médio de três determinações, 7,56%.

Para a avaliação do teor de resíduo seco utilizou-se a mesma técnica do teor de extrativos, no entanto, substituiu-se o líquido extrator por outros solventes: álcool 100%, álcool 70% e álcool 50% (v/v). Na Tabela 1, observa-se que o líquido extrator que apresentou um maior rendimento (14%) foi o álcool 50% (v/v), sendo este o solvente de escolha para a preparação do extrato bruto.

Tabela 1 – Resultados dos ensaios realizados para avaliação do controle de qualidade das cascas de *C. peltophoroides*.

Ensaio	Resultados (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
Perda por dessecação	8,25±0,21 [2,52]
Teor de cinzas	8,66±0,19 [2,19]
Teor de extrativos – Água	7,59±0,16 [2,05]
Teor resíduo seco – Álcool 100%	10,90±0,30 [2,76]
Teor resíduo seco – Álcool 70%	9,83±0,17 [1,73]
Teor resíduo seco – Álcool 50%	14,00±0,27 [1,93]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV%= coeficiente de variação em percentagem

A determinação do teor de umidade é realizada para se verificar a existência de água em excesso na droga vegetal, que provoca o risco de contaminação por fungos e bactérias, além da ação de enzimas que podem causar a degradação dos constituintes químicos da mesma. A grande quantidade de água pode ser um fator limitante no armazenamento de

uma droga vegetal por tempo prolongado. A perda por dessecação foi realizada com a droga vegetal cominuída para se avaliar a umidade residual, que está relacionada com a correta conservação da amostra (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; FARIAS, 2007).

A presença de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes na droga vegetal como contaminantes, derivados do tecido vegetal (cinzas fisiológicas) e de materiais estranhos, como a terra e areia (cinzas não fisiológicas) são verificadas através do ensaio de teor de cinzas totais (FARIAS, 2007).

Outra análise que auxilia na avaliação da qualidade da droga vegetal é a determinação do teor de extrativos e de resíduo seco, na qual se verifica a quantidade de constituintes extraídos da droga durante o processo de extração pelo líquido extrator utilizado como solvente. Com estes dados pode-se dizer qual é o melhor solvente a ser utilizado durante a extração dos princípios ativos para se garantir eficiência no processo. Essa é uma característica própria de cada vegetal e deve ser realizada anteriormente à preparação do extrato bruto.

4.2 VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV-VIS

4.2.1 Padronização de metodologia analítica

Devido à grande diversidade entre as metodologias é que se optou por realizar a validação da metodologia analítica de determinação de polifenóis totais (PT) e para assim garantir confiabilidade nos resultados apresentados. A determinação de taninos totais a partir da complexação com pó-de-pele não foi realizada na validação pela falta de seletividade por apresentar um alto desvio padrão (VERZA et al., 2007).

Inicialmente foi realizada a etapa de padronização da metodologia com base na Farmacopeia Europeia para se verificar tanto o tempo de reação e a absorbância, através do estudo cinético, quanto o padrão ideal a ser utilizado na metodologia. Para isso realizou-se uma varredura entre 400 e 800 nm do extrato bruto de *C. peltophoroides* e dos padrões de referência (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalo) após 30 min de reação, segundo a metodologia descrita pela Farmacopeia Europeia. Observa-se na Figura 9 que somente através da varredura não se pode obter um padrão ideal para determinação do teor de polifenóis totais, por apresentarem o mesmo perfil que o extrato bruto de *C. peltophoroides* nos comprimentos de onda utilizados.

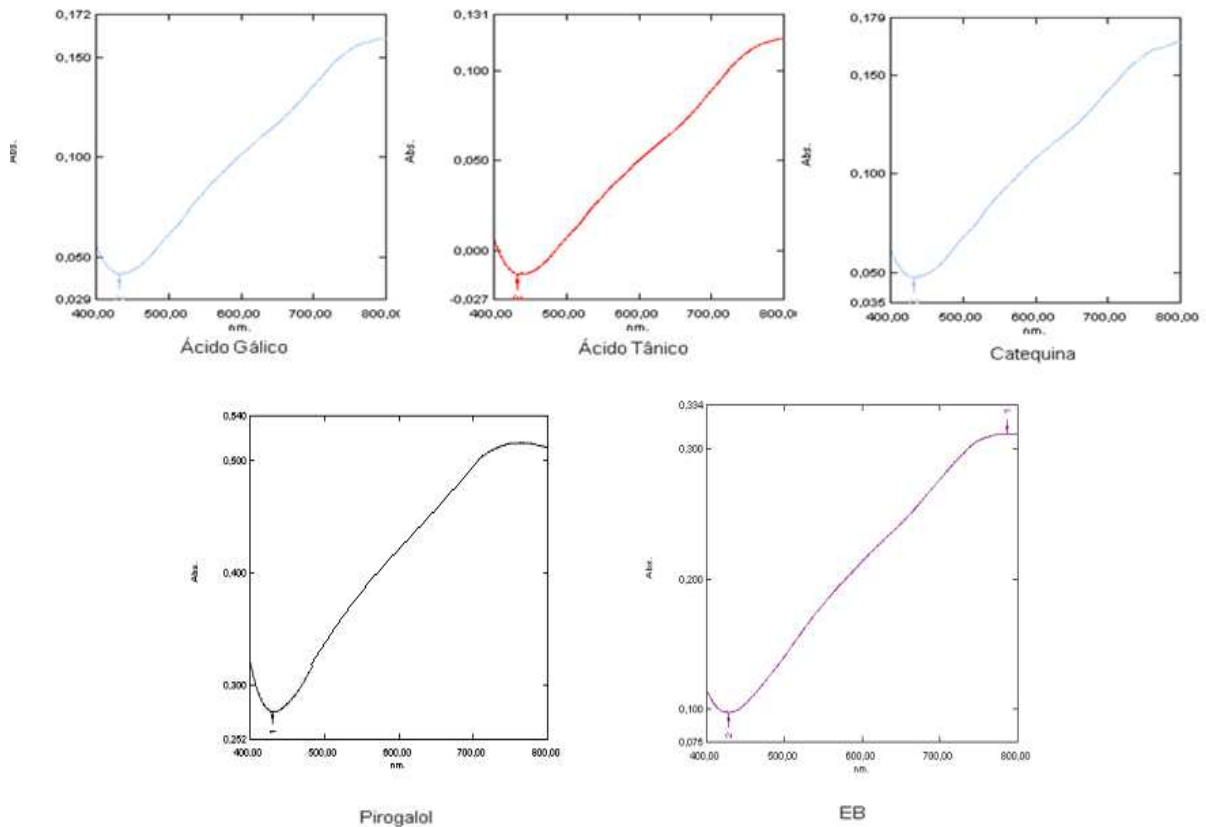


Figura 9 – Espectros de varredura no visível (400 a 800 nm) das soluções referências (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol) e EB de *C. peltophoroides* após 30 min de reação com Folin-Ciocalteu.

Para se obter o padrão ideal realizou-se a cada 2 min, em um intervalo de tempo de 10 a 40 min de reação com o Folin-Ciocalteu, varreduras entre 400 e 800 nm do extrato bruto e dos padrões de referência, como verificado na Tabela 2. Com esta determinação também pode-se avaliar o tempo e a absorbância ideal para a metodologia analisada com estas varreduras.

Observa-se na Tabela 2 que a concentração dos padrões (2 $\mu\text{g/mL}$) e do EB (16 $\mu\text{g/mL}$) são diferentes entre si. O estabelecimento desta diferença foi necessário pois o EB contém diversas substâncias não sabendo-se assim qual a concentração de polifenóis totais nesta amostra. Caso fosse se utilizar o padrão na mesma concentração do EB, este apresentaria absorbâncias acima da faixa linear.

Tabela 2 – Valores das absorvâncias encontradas na varredura (400 a 800 nm) dos padrões (ácido gálico, ácido tânico, catequina e pirogalol), com 2 µg/mL, e do extrato bruto de *C. Peltophoroides*, com 16 µg/mL, nos tempos de 10 a 40 min.

nm/min		10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40
Ácido Gálico	691	0,127	0,129	0,130	0,131	0,131	0,131	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,132	0,133	0,133	0,133
	715	0,137	0,139	0,140	0,140	0,141	0,141	0,141	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142	0,142
	760	0,151	0,153	0,154	0,154	0,155	0,155	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156	0,156
	800	0,155	0,156	0,157	0,158	0,158	0,159	0,159	0,159	0,159	0,159	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160	0,160
Ácido Tânico	691	0,080	0,081	0,082	0,083	0,083	0,083	0,084	0,084	0,084	0,084	0,085	0,085	0,085	0,085	0,085	0,086
	715	0,091	0,092	0,093	0,094	0,094	0,095	0,095	0,095	0,095	0,096	0,096	0,096	0,096	0,096	0,097	0,097
	760	0,108	0,109	0,110	0,110	0,111	0,111	0,112	0,112	0,112	0,113	0,113	0,113	0,113	0,113	0,114	0,114
	800	0,113	0,114	0,114	0,115	0,115	0,116	0,116	0,117	0,117	0,117	0,118	0,118	0,118	0,118	0,119	0,119
Catequina	691	0,134	0,135	0,136	0,136	0,137	0,138	0,138	0,138	0,138	0,138	0,139	0,139	0,139	0,139	0,139	0,139
	715	0,144	0,144	0,146	0,146	0,146	0,146	0,147	0,147	0,147	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148	0,148
	760	0,146	0,157	0,158	0,160	0,161	0,161	0,161	0,161	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,162	0,163	0,163
	800	0,161	0,162	0,163	0,164	0,164	0,164	0,165	0,165	0,165	0,166	0,166	0,166	0,166	0,166	0,166	0,167
Pirogalol	691	0,266	0,266	0,267	0,268	0,270	0,266	0,268	0,267	0,266	0,266	0,267	0,267	0,269	0,269	0,270	0,270
	715	0,284	0,283	0,284	0,283	0,283	0,283	0,283	0,283	0,284	0,284	0,284	0,283	0,284	0,283	0,284	0,284
	760	0,303	0,303	0,305	0,306	0,307	0,303	0,303	0,303	0,303	0,305	0,305	0,304	0,304	0,304	0,306	0,307
	800	0,306	0,306	0,307	0,307	0,309	0,307	0,307	0,307	0,307	0,307	0,307	0,306	0,306	0,306	0,307	0,309
Extrato Bruto	691	0,492	0,493	0,494	0,493	0,493	0,492	0,493	0,493	0,494	0,493	0,492	0,492	0,493	0,493	0,493	0,493
	715	0,505	0,504	0,505	0,505	0,504	0,505	0,505	0,505	0,505	0,505	0,505	0,504	0,505	0,504	0,504	0,504
	760	0,517	0,517	0,517	0,517	0,516	0,516	0,516	0,516	0,516	0,516	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517	0,517
	800	0,512	0,511	0,511	0,511	0,512	0,512	0,511	0,511	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,512	0,511	0,512

A varredura em diferentes comprimentos de onda foi realizada para se obter o percentual de aumento entre a média das absorvâncias (691, 715, 760 e 800 nm) de cada um dos padrões e da amostra, já que não houve diferença visual (Figura 6) na varredura para distinguir a melhor substância de referência a ser utilizada na metodologia analítica. Através da Figura 10, nota-se que o aumento da absorvância entre os comprimentos de onda 691/715 e 715/760 foi significativo (ácido gálico $F_{60,3}=1081,9$; ácido tânico $F_{60,3}=1213,8$; catequina $F_{60,3}=1033,2$; pirogalol $F_{60,3}= 3442,9$ e EB $F_{60,3}= 5984,4$, $P<0,001$) tanto para os padrões quanto para o EB. Entre os comprimentos de onda de 760/800, para os padrões, observa-se que o aumento foi significativo, mas menor que 5%, em relação ao valor obtido em 760 nm. Para ao EB de *C. peltophoroides*, nota-se que não houve aumento entre 760/800, mas diminuição na absorvância em 800 nm, concluindo-se que a partir deste comprimento de onda os valores de absorvância diminuem. Com estes resultados optou-se por seguir a absorvância (760 nm) descrita na metodologia descrita pela Farmacopeia Europeia.

Quanto ao tempo de reação de redução do ácido fosfotúngstico (10 a 40 min) verificado durante a varredura observa-se que o mesmo é estável, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados. Por isso optou-se por continuar com o tempo de reação descrito na metodologia analisada (30 min).

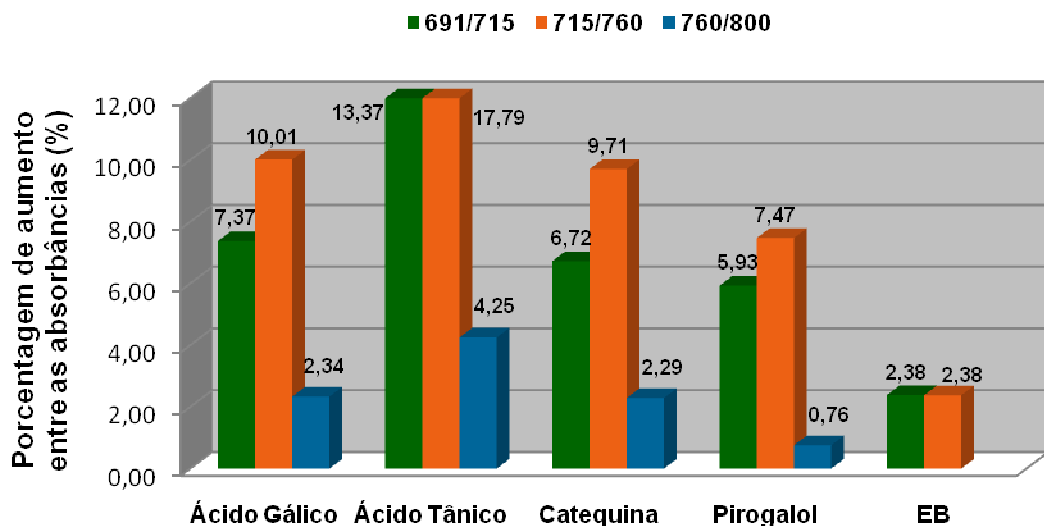


Figura 10 – Porcentagem de aumento nas absorvâncias médias do comprimento de onda maior em relação ao menor (691, 715, 760 e 800) dos padrões e do EB de *C. peltophoroides*.

Pela Figura 10 nota-se que a cinética de reação, demonstrada pelo percentual de aumento da absorvância entre os comprimentos de onda relacionados, é semelhante entre o pirogalol e o EB de *C. peltophoroides*. Segundo Glasl (1983) cada substância possui uma variação característica quanto à absorção em comprimento de onda diferente, e que uma cinética de reação similar deve ocorrer em substâncias com estruturas parecidas.

O método de Folin-Ciocalteu possui resposta equivalente ao número de grupos fenólicos dos compostos, formando um complexo de reação azul proporcional ao número de hidroxilas presentes no anel aromático (CHUN; KIM, 2004). A estrutura e a atividade dos compostos fenólicos estão relacionadas com o número de grupos hidroxilas presentes no anel aromático (SINGLETON et al., 1999 apud NENADIS et al., 2007). Na Figura 11, observa-se que os padrões possuem estruturas diferentes e que o pirogalol apresenta o maior número de hidroxilas ligada ao anel aromático proporcional a sua massa. Isto pode ser verificado através da absorvância molar que é dada pela Lei de Lambert-Beer no qual se relaciona a absorvância e a concentração molar do analito (PELILLO et al., 2004). Uma absorvância elevada demonstra a capacidade do cromóforo em absorver luz em determinadas condições e quanto maior é este valor mais precisa será a determinação da absorvância (LENZ, 1997). Assim, o pirogalol apresenta maior disponibilidade de suas hidroxilas ligadas ao anel aromático e apresenta uma cinética de reação semelhante ao EB de *C. peltophoroides*, sendo considerado o melhor padrão para a análise de determinação de PT para esta droga vegetal.

Na Tabela 3 observa-se a variação que pode ocorrer no teor de polifenóis totais (22,19 a 57,63%) ao se utilizar padrões com diferentes absorvâncias molares e cinética de reação, mostrando assim que a análise pode ser induzida ao erro quando se utiliza um padrão equivocado.

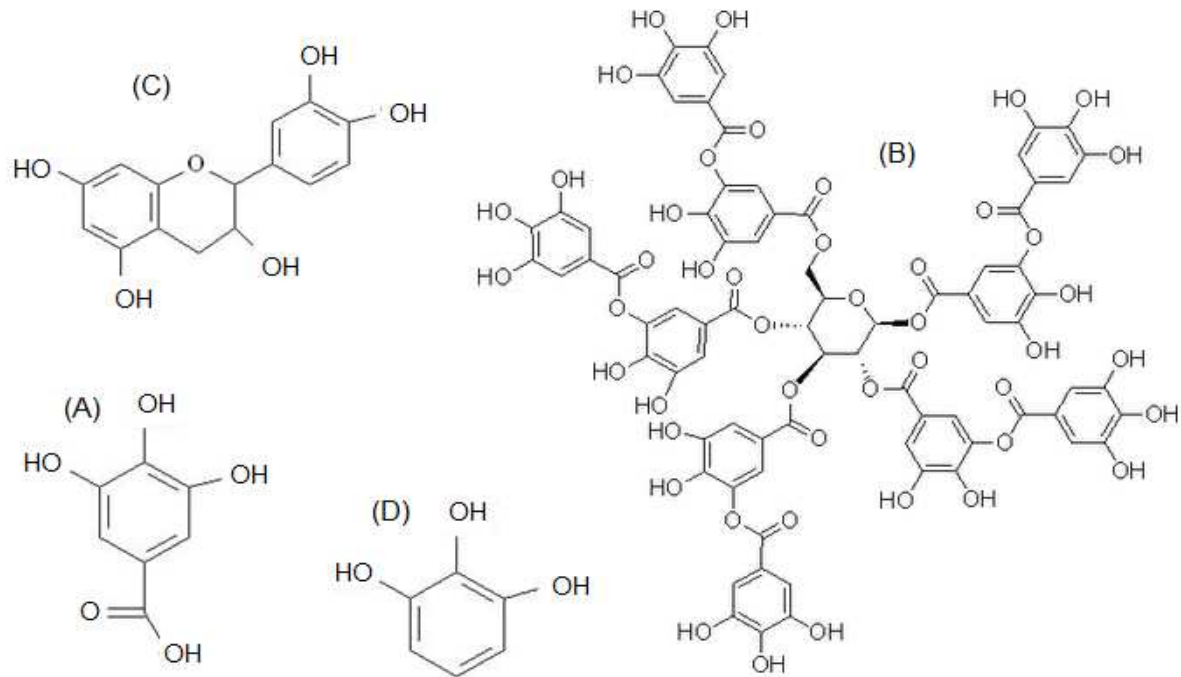


Figura 11 - Estruturas químicas das substâncias referências: (A) ácido gálico, (B) ácido tânico, (C) catequina e (D) pirogalol.

Tabela 3 – Comparação entre a absorvidade molar dos padrões e o teor de polifenóis totais do EB de *C. peltophoroides*.

Amostras	Absorvidade molar	Teor de polifenóis totais do EB de <i>C. peltophoroides</i> (%)
Ácido Gálico	975,0	41,74
Ácido Tânico	802,6	57,63
Catequina	1191,0	40,98
Pirogalol	1438,7	22,19

Através da padronização da metodologia para o extrato bruto de *C. peltophoroides* pode-se garantir que o melhor comprimento de onda a ser utilizado é 760 nm e que de 10 a 40 min de reação com o Folin-Ciocalteu não houve diferença significativa entre as absorvâncias tanto do extrato bruto como do padrão. Assim, para se realizar a validação, seguiu-se a metodologia descrita na Farmacopeia Europeia (2007), considerando o tempo de análise de 30 min, absorvância de 760 nm, além da utilização do padrão de pirogalol.

4.2.2 Validação

4.2.2.1 Curva de calibração do padrão

A curva de calibração mostra a relação existente entre as concentrações das amostras analisadas e a resposta obtida pelo equipamento, através de um padrão. De acordo com o que foi discutido no item 4.2.1, a substância de referência escolhida como padrão externo para a validação foi o pirogalol. A curva linear desta substância foi realizada nas concentrações 1,6; 2,24; 3,2; 3,84 e 4,8 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12).

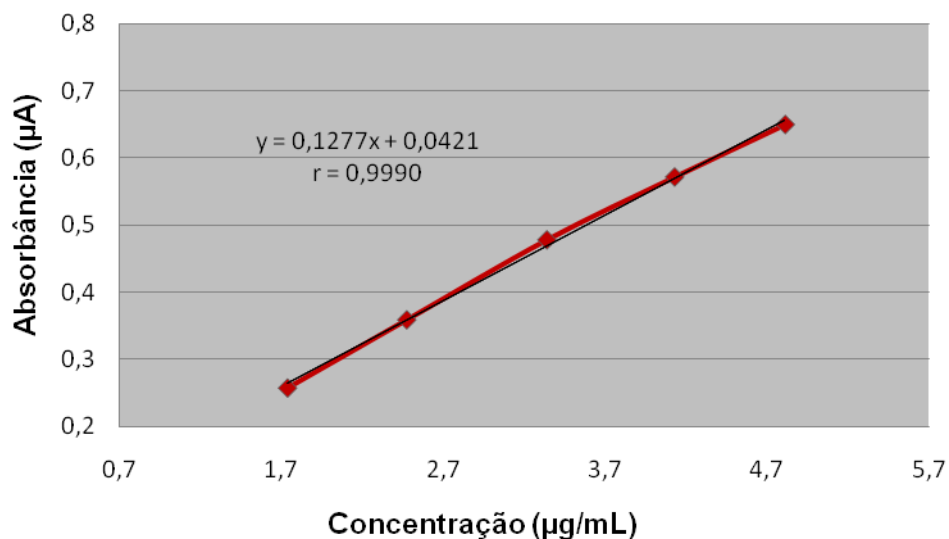


Figura 12 – Curva de calibração do pirogalol.

A estimativa dos coeficientes, a e b, de uma curva podem ser obtidos através do método matemático de regressão linear, no qual é possível se calcular o coeficiente de correlação (r) (RIBANI et al., 2004). De acordo com a RE nº 899/2003 o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação (r) deve ser um valor maior ou igual a 0,99. Isto se explica, pois o coeficiente determina uma estimativa da qualidade da curva, sendo que quando r encontra-se próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão (RIBANI et al., 2004). Na Figura 9, observa-se um r de 0,9990.

No entanto, apenas este critério não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear da curva de calibração. Para a obtenção do ajuste e do modelo, utilizou-se a análise de variância pelo método do quadrado mínimo (Tabela 4) que fornece resultados não tendenciosos e com uma variação mínima, e que prediz os valores de y a partir dos valores de x (PIMENTEL; NETO, 1996; COSTA et al., 2006).

Através da análise estatística do modelo e da falta de ajuste pode-se calcular o teste F. Na Tabela 4, observa-se que o valor F do modelo (1223,062) é maior que o F crítico

(4,667) em 95% de significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto há falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (0,842) é menor que o F crítico (3,71), assim aceita-se a hipótese nula (não há falta de ajuste) (PIMENTEL; NETO,1996).

Tabela 4 – Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).

	SQ	gL	SM	F	F crítico
Modelo	0,075313	1	0,075313	1223,062	4,667
Resíduo	0,000801	13	0,000062		
Falta de ajuste	0,001663	3	0,000128	0,842	3,71
Erro Puro	0,001524	10	0,000152		

A verificação do ajuste permite definir a melhor curva como sendo aquela que fornece o menor valor da soma quadrática dos resíduos (SQ) obtidos entre o sinal analítico medido e o sinal analítico predito (RIBEIRO et al., 2008). Para evitar problemas de falta de ajuste é necessário uma análise cuidadosa do gráfico de resíduos e realizar aplicação de testes para determinar qual a faixa em que a curva de calibração apresenta comportamento linear (RIBEIRO et al., 2008). Para se verificar o modelo e a falta de ajuste, é necessário se obter a razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e erro puro, conhecido como teste F.

Além do teste F, é importante verificar os resíduos deixados pelo modelo. Em um modelo ajustado os resíduos devem dar a impressão de uma distribuição normal, não apresentando resultados tendenciosos. As Figuras 13 e 14 mostram os gráficos dos resíduos onde se observa que os erros são independentes com distribuição normal, apresentando pontos próximos à reta, e que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero com variância homogênea.

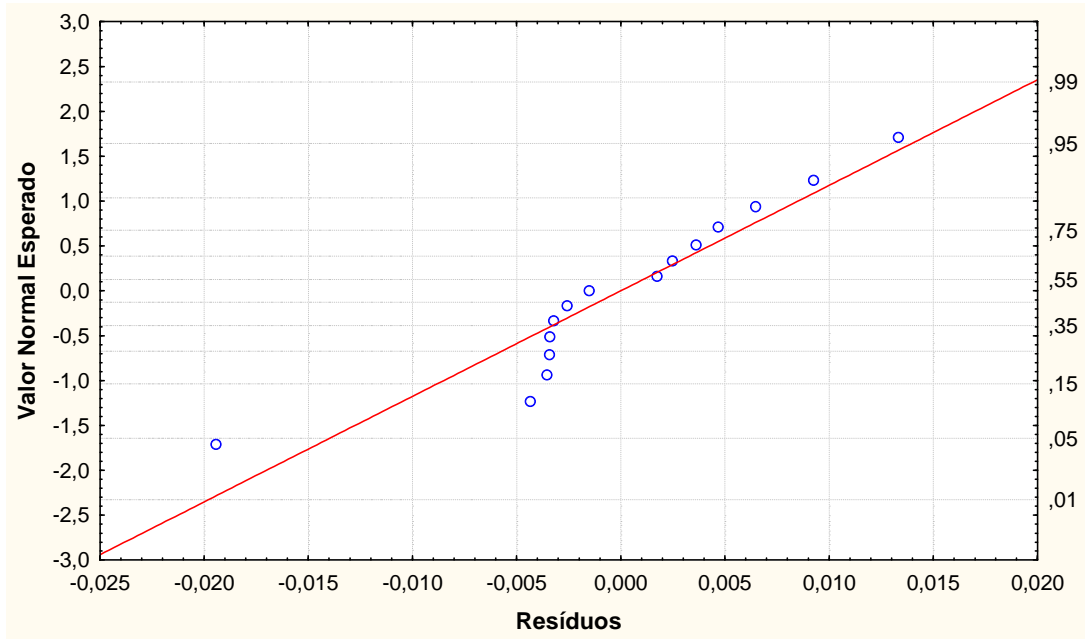


Figura 13 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos na curva de calibração do padrão de pirogalol.

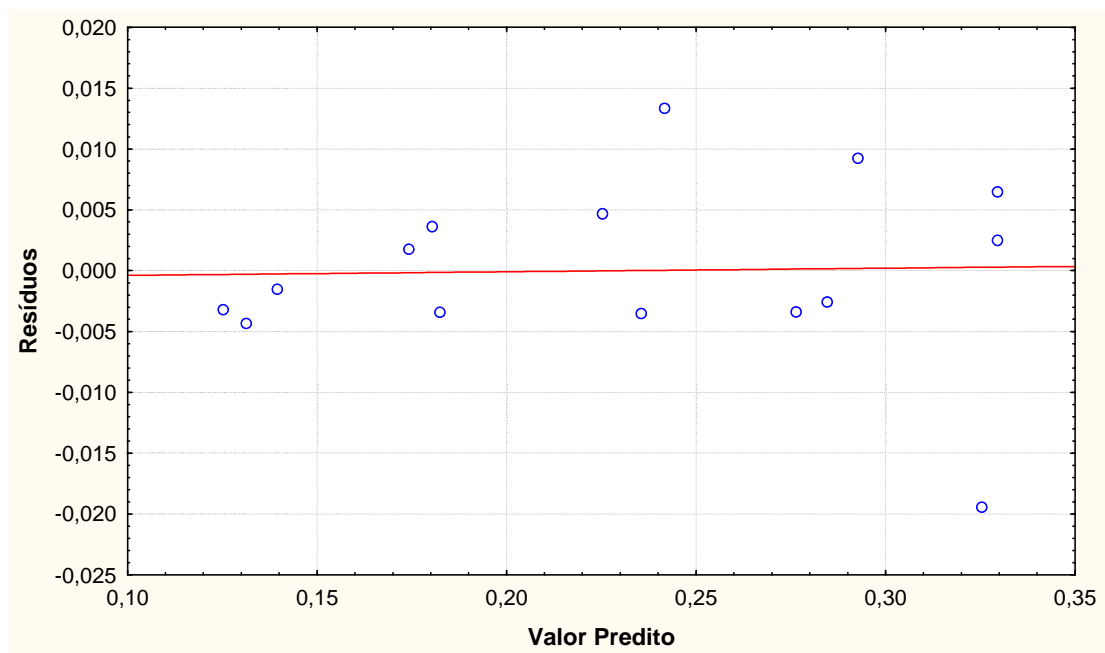


Figura 14 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos na curva de calibração do padrão de pirogalol.

4.2.2.2 Linearidade

A linearidade é definida como a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos (variável dependente y) são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (variável independente x), dentro de um intervalo

especificado (BRASIL, 2003). A equação matemática que expressa essa dependência é chamada de curva analítica ou de calibração (RIBEIRO et al., 2008).

O valores da curva de calibração estão expressos na Tabela 5 e na Figura 15 observa-se que o coeficiente de correlação (0,999) encontra-se dentro dos limites preconizados pela RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003), além de apresentar exatidão e precisão.

Tabela 5 – Concentração do EB de *C. peltophoroides* e suas respectivas absorbâncias na curva de linearidade.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância média (μA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
26,93	0,815 \pm 0,01 [0,79]
22,71	0,687 \pm 0,00 [0,67]
16,23	0,511 \pm 0,00 [0,20]
12,98	0,394 \pm 0,00 [0,60]
6,49	0,200 \pm 0,00 [1,77]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

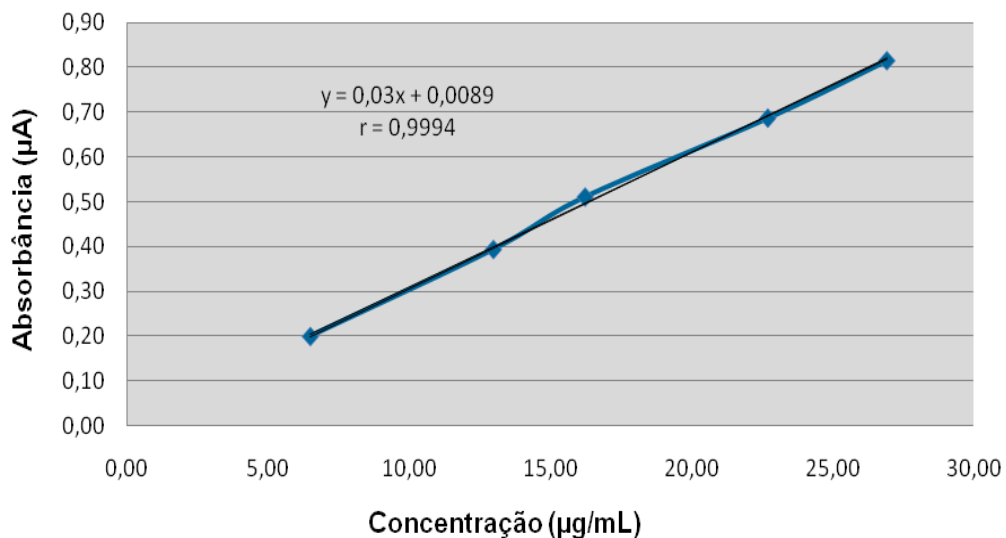


Figura 15 – Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta da metodologia descritiva de polifenóis totais.

Para evitar problemas de falta de ajuste é necessário uma análise cuidadosa do gráfico de resíduos e realizar aplicação de testes para determinar qual a faixa em que a curva de calibração apresenta comportamento linear (RIBEIRO et al., 2008). Para se verificar o modelo e a falta de ajuste, é necessário se obter razão entre as médias quadráticas da falta de ajuste e erro puro, conhecido como teste F. Na Tabela 6 observa-se

que o valor F do modelo (5311,478) é maior que o F crítico (4,667) em 95% de significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto há falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (2,70) é menor que o F crítico (3,71), assim aceita-se a hipótese nula (não há falta de ajuste) (PIMENTEL; NETO,1996).

Tabela 6 – Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).

	SQ	gL	SM	F	F crítico
Modelo	0,638102	1	0,638102	5311,478	4,667
Resíduo	0,001562	13	0,000120		
Falta de ajuste	0,023934	3	0,001841	2,40	3,71
Erro Puro	0,007681	10	0,000768		

No entanto, como discutido na curva de calibração do padrão (seção 4.2.2.1) deve-se evitar problemas de falta de ajuste sendo necessário uma análise cuidadosa do gráfico de resíduos, além do teste F (RIBEIRO et al., 2008). Em um modelo ajustado os resíduos devem dar a impressão de uma distribuição normal, não apresentando anormalidade. As Figuras 16 e 17 mostram os gráficos dos resíduos onde observa-se que os erros são independentes com distribuição normal e que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero com variância homogênea.

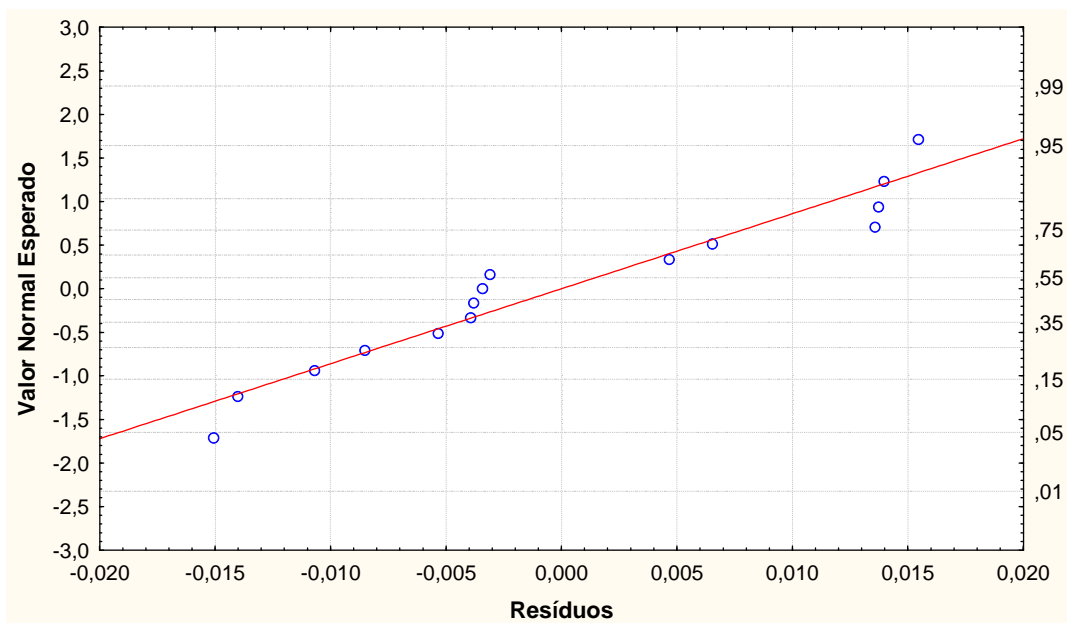


Figura 16 – Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de linearidade para polifenóis totais (PT) das amostras de EB *C. peltophoroides*.

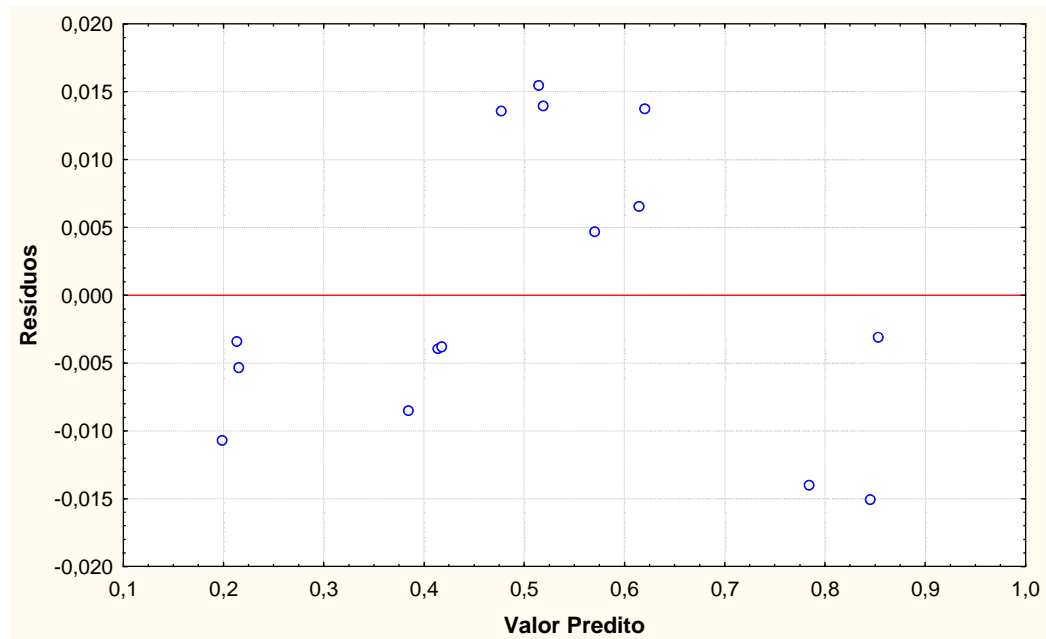


Figura 17 – Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de linearidade das amostras de EB de *C. peltophoroides*.

A partir dos resultados obtidos, considerou-se que o método escolhido para a determinação de polifenóis totais é linear e possui método adequado e ajustado para as análises.

4.2.2.3 Limite de detecção, limite de quantificação e intervalo

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada e diferenciada do ruído, mas não necessariamente quantificada e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão, sob condições estabelecidas. O intervalo é considerado como a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico, onde se confirma que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

O LD e LQ podem ser estabelecido através da análise de soluções com concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até se chegar ao menor nível detectável e quantificável, respectivamente (BRASIL, 2003). Podem ser determinados a partir de 3 métodos diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Para a análise espectrofotométrica em questão foi utilizado, além das diluições decrescentes (Tabela 7), a curva analítica, na qual deve-se considerar a equação da reta, obtida na linearidade do EB ($y=0,03x+0,0089$), para se obter o LD e LQ. Pela equação da reta tem-se o desvio padrão

do intercepto y (DPA), 0,0129, e a inclinação da reta (IC), 0,03, resultando em LD e LQ de 1,29 $\mu\text{g/mL}$ e 4,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O limite de quantificação superior foi determinado pela última concentração da amostra que apresentou linearidade (26,93 $\mu\text{g/mL}$), sendo que acima desse valor a relação concentração/absorbância não apresenta-se linear. O intervalo (4,3 a 26,93 $\mu\text{g/mL}$) apresenta concentrações com linearidade, exatidão e precisão.

Tabela 7 – Determinação decrescente do analito até a menor concentração detectável com demarcação da faixa de trabalho utilizada.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (μA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
32,45	0,933 \pm 0,01 [0,99]
31,00	0,870 \pm 0,01 [0,88]
29,82	0,831 \pm 0,01 [1,30]
26,93	0,815 \pm 0,01 [0,79]
22,71	0,687 \pm 0,00 [0,67]
16,23	0,511 \pm 0,00 [0,20]
12,98	0,394 \pm 0,00 [0,60]
6,49	0,200 \pm 0,00 [0,18]
3,24	0,122 \pm 0,00 [1,48]
0,65	0,027 \pm 0,00 [10,79]
0,32	0,018 \pm 0,01 [32,01]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

4.2.2.4 Precisão

A análise de precisão é considerada como uma avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de amostragens múltiplas de uma mesma amostra, sendo analisada pela precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dias (precisão intermediária) (BRASIL, 2003). A precisão pode ser expressa através do desvio padrão relativo (DPR) ou do coeficiente de variação (CV) (RIBANI et al.,2004).

Ao se analisar os dados obtidos da Tabela 8 e através do cálculo do coeficiente de variação da repetibilidade (0,36%) e da precisão intermediária (0,05%) nota-se que os resultados apresentam-se dentro do valor permitido pela legislação, coeficiente de variação de no máximo 5% (BRASIL, 2003). Na análise estatística, observa-se que não há diferença significativa nas análises intra-dia e inter-dias, sendo encontrado $P > 0,05$ (0,87 e 0,42, respectivamente), comprovando que o método é preciso.

Tabela 8 – Teor de polifenóis totais (PT) obtidos nos testes intra-dia e inter-dia da amostra com 16 µg/mL do EB de *C. peltophoroides*.

Amostras	Teor de PT (%)	Teor de PT (%)	
		Intra-dia	Inter-dia
1	22,88	23,06	22,88
2	23,11	23,11	22,97
3	22,84	22,70	22,93
4	22,79	22,88	23,11
5	22,79	23,23	22,75
6	23,06	23,20	22,75
$\bar{x} \pm dp$ [CV%]	22,91 ± 0,13 [0,60]	23,03 ± 0,20 [0,88]	22,90 ± 0,13 [0,60]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

A repetibilidade é realizada para comprovar a concordância entre os resultados em um curto período de tempo, sendo a análise realizada nas mesmas condições de medição: mesmo procedimento, analista, instrumento e local. A precisão intermediária, possui a mesma finalidade da análise de repetibilidade, sendo realizada no mesmo laboratório, no entanto, por um analista diferente. É considerada como a análise mais representativa que demonstra o efeito das variações em um laboratório devido a eventos como dias, analistas ou equipamentos diferentes, garantindo assim se o método é reprodutível. (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2004).

4.2.2.5 Robustez

A robustez de um método é dada pela capacidade desta metodologia em resistir a pequenas variações analíticas, sem perder a exatidão e a precisão. Ao se saber a susceptibilidade do método pode-se controlar e precaver alguns erros no método durante o procedimento (BRASIL, 2003; RIBEIRO et al., 2008).

Para a análise em espectrofotômetro UV-VIS, realizou-se o preparo de quatro amostras seguindo o método descrito na Farmacopeia Europeia, no entanto com uma alteração no método de cada uma delas: sem proteção à luz e com duas concentrações diferentes de carbonato de sódio (7,5% e 14,06%) e uma amostra sem nenhuma alteração.

Segundo a Tabela 9 observa-se que os valores encontrados para estas variações foram próximos, no entanto a amostra preparada com solução de Na₂CO₃ 14,06% é significativamente diferente da amostra sem nenhuma alteração do método, apresentado um P<0,05. Através deste resultado observou-se que um aumento na quantidade de carbonato de sódio pode ser significativo na diminuição do teor de polifenóis totais. As demais

amostras, com presença de luz e com solução de Na_2CO_3 7,5%, apresentaram um $P > 0,05$, sendo consideradas semelhantes.

Tabela 9 – Teores de polifenóis totais (PT) obtidos nas amostras na ausência de luz, Na_2CO_3 7,5% e Na_2CO_3 14,06%.

Amostras (n=3)	Teor de PT (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
Amostra	22,02±0,08 [0,34]
Sol. Na_2CO_3 7,5% (p/v)	22,10±0,09 [0,4]
Sol. Na_2CO_3 14,06% (p/v)	21,18±0,07 [0,34]
Presença de luz	22,05±0,11 [0,49]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

4.2.2.6 Especificidade e seletividade

A especificidade é definida como a habilidade do método em distinguir o analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Para se avaliar este parâmetro, foi adicionado padrão pirogalol nas concentrações das amostras utilizadas na linearidade (26,93, 22,71, 16,23, 12,98 e 6,49 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados, especificado na Tabela 10, foram plotados em um gráfico (Figura 17) para se verificar a linearidade da curva e a mesma foi comparada com a curva da linearidade (seção 4.2.2.2).

Tabela 10 – Concentração do EB de *C. peltophoroides* e as respectivas absorbâncias das amostras testadas na análise de especificidade.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbância (μA) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
25,17	0,882±0,01 [1,23]
24,25	0,852±0,01 [0,79]
16,21	0,620±0,003 [0,71]
12,83	0,501±0,003 [0,82]
6,42	0,326±0,003 [1,36]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

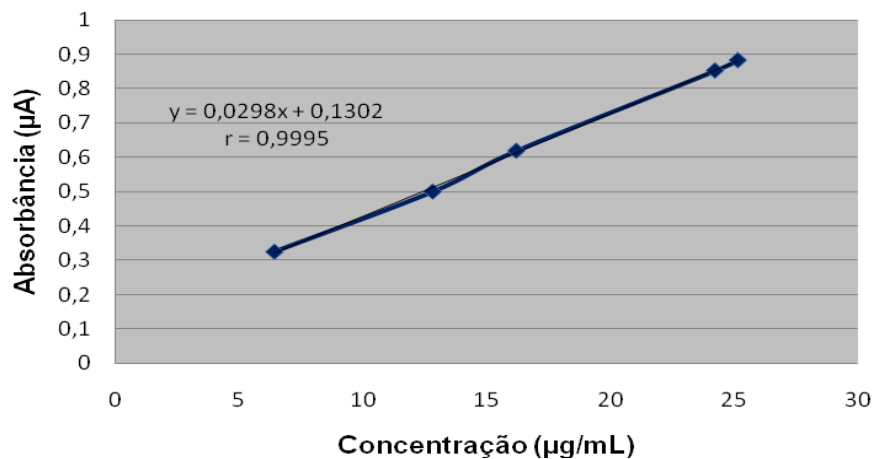


Figura 18 - Representação da curva obtida na especificidade do extrato bruto de *C. peltophoroides*.

Antes de se realizar a comparação entre a curva analítica da especificidade e da linearidade deve-se garantir a adequação do ajuste linear da curva de calibração. A partir da Figura 18 nota-se que a curva analítica é linear por apresentar um r maior que 0,99, conforme exige a RE nº 899/2003 (BRASIL, 2003). No entanto, como discutido em linearidade (seção 4.2.2.2) deve-se verificar a distribuição normal, os resíduos, a falta de ajuste e modelo.

Nas Figuras 19 e 20 observa-se que os pontos ficam próximos da reta, seguindo uma distribuição normal e que os resíduos se distribuem aleatoriamente em torno da média zero, respectivamente.

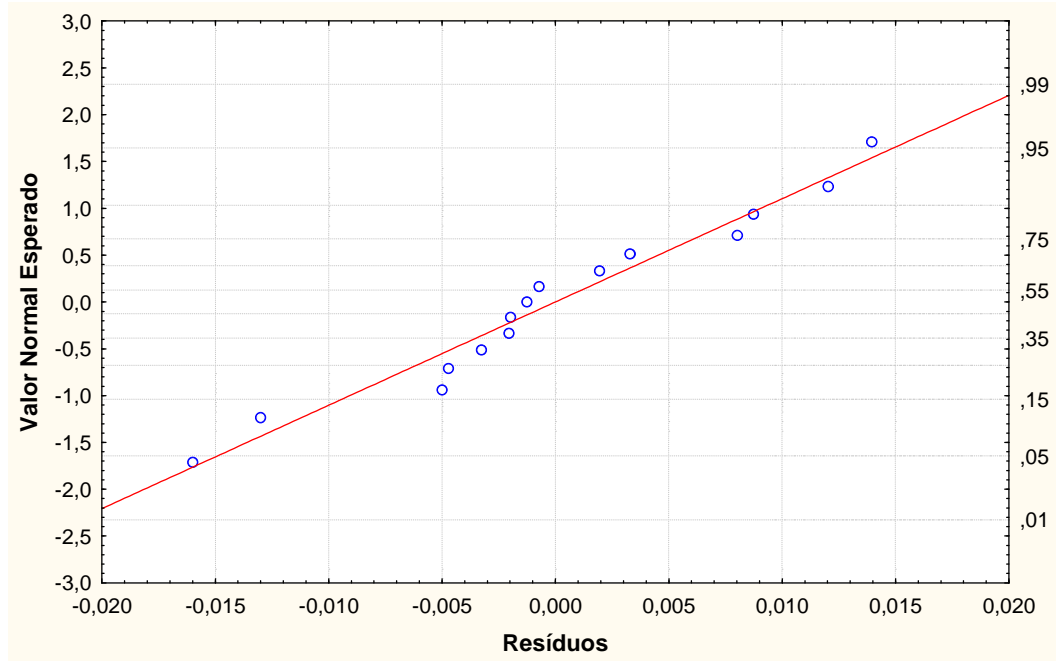


Figura 19 - Gráfico da distribuição normal dos resíduos obtidos no teste de especificidade para PT das amostras de EB *C. peltophoroides* adicionada do padrão.

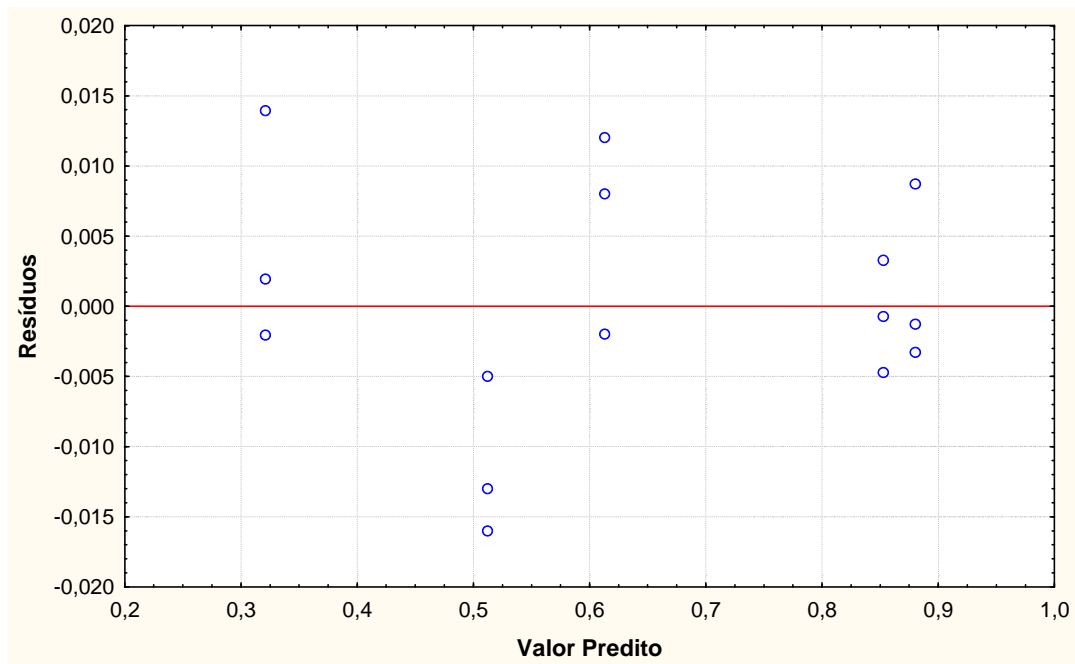


Figura 20 - Gráfico da heterogeneidade das variâncias dos resíduos obtidos no teste de especificidade das amostras de EB de *C. peltophoroides* adicionada do padrão.

A partir dos resultados da Tabela 11, verifica-se o modelo e a falta de ajuste através do teste F, sendo que o F do modelo (8757,91) é maior que o F crítico (4,667) em 95% de significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto há falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (1,81) é menor

que o F crítico (3,71), assim aceita-se a hipótese nula (não há falta de ajuste) (PIMENTEL; NETO,1996).

Tabela 11 – Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste e erro puro, onde, SQ (soma quadrática dos resíduos), gL (grau de liberdade) e SM (soma média dos quadrados).

	SQ	gL	SM	F	F crítico
Modelo	0,665191	1	0,665191	8757,91	4,667
Resíduo	0,000987	13	0,000076		
Falta de ajuste	0,000987	3	0,000076	1,81	3,71
Erro Puro	0,000422	10	0,000042		

A Figura 21 demonstra que as curvas da linearidade e da especificidade são paralelas e apresentam valores de r iguais, sendo o método considerado específico.

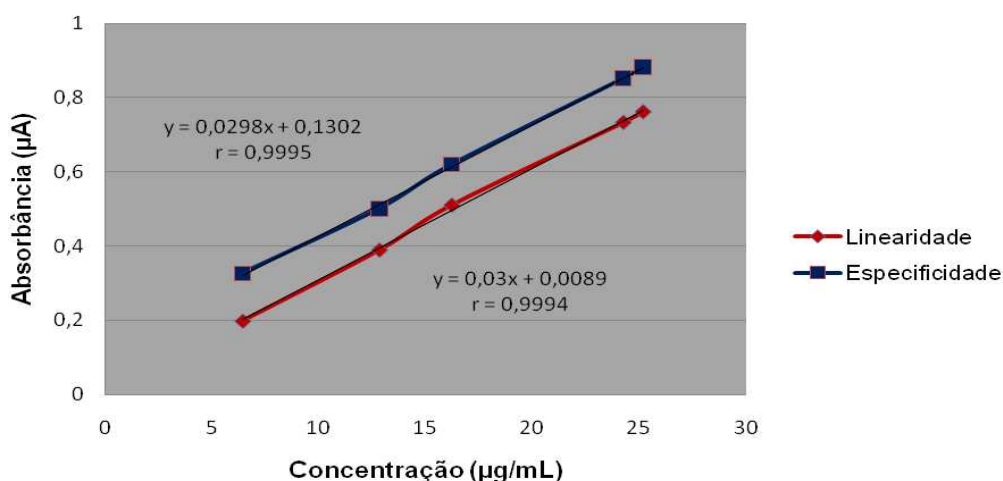


Figura 21 – Comparação entre a curva da especificidade e da linearidade do EB de *C. peltophoroides*.

No caso de matrizes complexas, onde não é possível se obter a matriz isenta da substância de interesse, pode-se realizar a adição do padrão nas concentrações da linearidade e comparar esta curva analítica com a curva da linearidade (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2010). Caso as curvas sejam paralelas, pode-se dizer que o método é seletivo (RIBANI et al., 2004).

4.2.2.7 Exatidão

A exatidão foi determinada a partir da porcentagem de recuperação do EB de sibipiruna após a adição de concentrações do padrão de pirogalol referentes às massas de

1, 2 e 3 mg na solução mãe da amostra 100% da linearidade (concentração final de extrato bruto de 16,0 µg/mL). Para se obter a recuperação, o teor de polifenóis totais esperado foi calculado com base nas curvas de calibração do EB de sibipiruna e do padrão de pirogalol, conforme a Tabela 12. A recuperação da amostra obteve variação de 98,08 a 103,21%.

Tabela 12 – Teor de polifenóis totais obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação.

	Teor PT esperado (EB+padrão) (%)	Teor PT obtido (%)	Recuperação (%)
Baixa	23,04 (21,74+1,30)	22,60±0,13 [0,57]	98,08
Média	23,40 (21,74+1,66)	24,15±0,44 [1,81]	103,21
Alta	23,77 (21,74+2,03)	23,91±0,27 [1,10]	100,60

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

A exatidão é considerada como o grau de concordância, ou seja, proximidade entre um resultado verdadeiro, da curva de calibração, e os resultados encontrados no ensaio. Um dos métodos utilizados para avaliar a exatidão é o da adição de padrão em três níveis diferentes de concentração. O método de adição de padrão é muito utilizado nos casos em que não se consegue preparar um branco da matriz, como por exemplo, no caso de extratos, onde as matrizes são complexas e desconhecidas (RIBANI et al., 2004). Os resultados obtidos na Tabela 12 permanecem entre os limites para matriz complexa (85 a 115%) recomendados pela RE nº. 899/2003 (BRASIL, 2003), garantindo que o método é exato.

4.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

4.3.1 Determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais

Após a metodologia descrita pela Farmacopeia Europeia (2007) ser validada, realizou-se o teor de polifenóis totais (PT) e taninos totais (TT) para o extrato bruto e as frações obtidas (F1 a F5; seção 3.5.1), cujos resultados estão expressos na Tabela 13.

Tabela 13 - Teor de polifenóis totais (PT) e taninos totais (TT) do EB e frações de *C. peltophoroides*.

Amostra	PT (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	TT (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
EB	22,74±0,01 [1,23]	16,80±0,37 [2,19]
FAQ	26,16±0,50 [1,81]	10,27±0,08 [0,81]
FAE	27,98±0,52 [1,98]	18,62±0,48 [2,58]
F1	42,84±0,01 [1,23]	28,23±0,30 [1,08]
F2	22,83±0,01 [1,23]	20,02±0,41 [2,04]
F3	33,78±0,52 [1,53]	30,40±0,20 [0,66]
F4	48,67±0,67 [1,38]	40,92±0,48 [1,17]
F5	31,21±0,31 [0,99]	23,05±0,41 [1,76]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Para a determinação de polifenóis utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu o qual baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (coloração amarela) pelas hidroxilas fenólicas produzindo um complexo de coloração azul que é absorvido no UV (VERZA et al., 2007). A coloração formada é controlada pelo número de hidroxilas presentes no composto ou de grupos com potencial oxidativo. Este teste não é específico para taninos, pois quantifica diferentes compostos fenólicos presentes na amostra (ANGELO; JORGE, 2007). Para se obter o teor de taninos é necessário retirá-los do meio por adsorção com substratos proteicos. Seu teor é calculado pela diferença obtida entre polifenóis totais e a fração polifenólica que não é adsorvida (VERZA et al., 2007). Por isso, para se determinar o teor de taninos totais, presente na Tabela 13, utilizou-se o método com precipitação de proteínas (pó-de-pele).

4.3.2 Atividade antioxidante

Com os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como a peroxidação lipídica, danos na estrutura do DNA e aumento na carboxilação das proteínas, é que os sistemas biológicos tiveram de desenvolver mecanismos de defesa contra estas espécies. Estes mecanismos se utilizam de substâncias antioxidantes, as quais podem ser de natureza endógena ou exógena. As defesas endógenas são mais eficientes na presença das enzimas antioxidantes: superóxido oxidase, glutathiona peroxidase e catalase. As defesas exógenas (naturais ou sintéticas) podem atuar: inativando os radicais livres, através da doação de hidrogênio ou elétron, na decomposição dos radicais oxigenados e no seqüestro de íons metálicos, formando intermediários menos danosos, mais estáveis e que possam impedir a ação do processo de iniciação (VICENTE, 2009).

De acordo com os vários caminhos seguidos pelas defesas exógenas, é que se desenvolveram metodologias para avaliar a ação antioxidante, tais como: método de formação do complexo fosfomolibdênio (NEGRI et al., 2009), doseamento por clareamento do β -caroteno (OTHMAN et al., 2007; SAKANAKA; TACHIBANA, 2007), através do poder redutor do ferro (GLISZCZYNSKA-SWIGLO, 2006), DPPH (GULÇIN et al., 2004, ANDRADE et al., 2007), dentre outros.

Um dos métodos mais utilizados é o DPPH, que avalia a atividade sequestradora do radical livre 2,2 difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) sendo reduzido a difenil-picril-hidrazina. Soluções de DPPH com coloração purpúrea são absorvidos em 517 nm. Conforme o DPPH é reduzido pelo antioxidante observa-se a mudança de coloração de purpúrea para amarela, sendo proporcional a concentração do composto com potencial antioxidante. O restante do DPPH que não foi reduzido, que permanece com coloração purpúrea, é medido em espectrofotômetro UV/Vis correspondendo a concentração inversa à atividade sequestradora do radical exercida pelo antioxidante testado (KULISIC et al., 2004). Os resultados são expressos em IC₅₀, conhecido como a concentração necessária para reduzir 50% do radical DPPH, considerando-se que quanto menor o IC₅₀ maior é a atividade antioxidante (AA) e esta é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante (ANDRADE et al., 2007; NEGRI et al., 2009).

Este foi o método de escolha para a análise da atividade antioxidante do extrato bruto e frações de *Caesalpinia peltophoroides*, pois os antioxidantes fenólicos agem como sequestradores de radicais e em algumas vezes como quelante de metais, impedindo ou minimizando o estresse oxidativo (SOUSA et al., 2007; ANDRADE et al., 2007). Este processo também gera produtos intermediários estáveis como consequência da ressonância do anel aromático presente nos compostos fenólicos (SOARES, 2002).

Inicialmente, realizou-se uma triagem com várias concentrações para se determinar o intervalo em que a análise de DPPH deveria ser realizada. As faixas de trabalho determinadas nesta triagem estão expressas na Tabela 14.

Tabela 14 – Faixa de trabalho determinada na triagem para a análise de atividade sequestradora de DPPH.

Amostra	Faixa de trabalho (µg/mL)
Trolox	1,5 - 6,0
Vitamina C	1,5 - 8,0
EB	4,0 - 8,0
FAQ	8,0 - 18,0
FAE	3,0 - 12,0
F1	0,49 - 4,0
F2	1,0 – 5,0
F3	2,0 – 8,0
F4	0,5 – 8,0
F5	1,5 – 8,0

A partir das faixas de trabalho foram realizadas as determinações da atividade antioxidante.

De acordo com a Tabela 15, pode-se observar que as frações F1, F2, F3, F4 e F5 apresentam valor de IC₅₀ menores que o extrato bruto, fração aquosa e acetato de etila, evidenciando que uma possível purificação de algumas destas frações possa chegar a um composto isolado com um alto poder de atividade antioxidante.

Tabela 15 – Capacidade antioxidante do extrato de frações de *C. peltophoroides* pela redução de DPPH.

Extrato e Frações	IC₅₀ (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
Trolox	3,97±0,04 [1,00]
Vitamina C	4,36±0,08 [1,82]
Extrato Bruto	7,40±0,10 [1,37]
Fração Aquosa	9,57±0,25 [2,58]
Fração Acetato de Etila	4,90±0,04 [0,87]
F1	2,95±0,05 [1,53]
F2	3,95±0,42 [1,06]
F3	4,10±0,07 [1,80]
F4	2,38±0,05 [2,02]
F5	4,42±0,02 [0,41]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

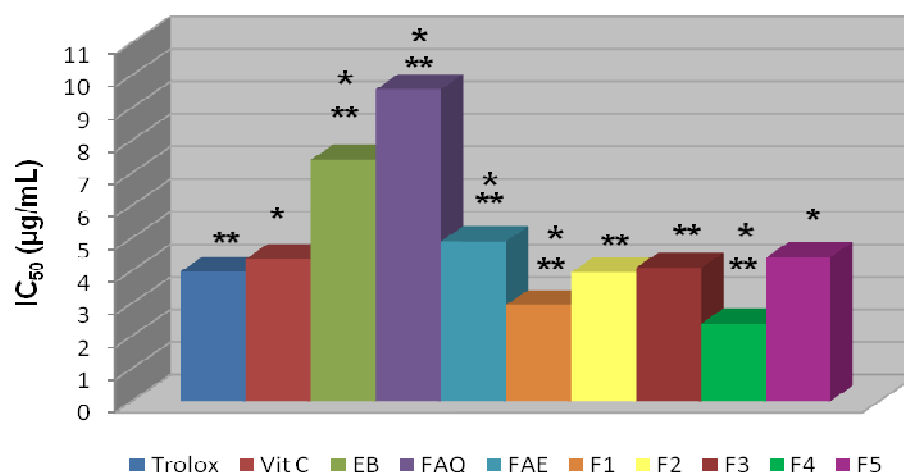


Figura 22 – Comparação entre os valores de IC₅₀ (µg/mL) do extrato bruto, frações e antioxidantes padrão realizados pelo método de DPPH, onde *(P<0,05) quando comparado com o Trolox e **(P<0,05) quando comparado à Vitamina C.

Observa-se através da Tabela 15 e Figura 22 que a F1, F2 e F4 apresentam valores de IC₅₀ menores que o antioxidante padrão Trolox. No entanto, a F1 e F4 diferem (P<0,05) estatisticamente da capacidade do Trolox. Assim, pode-se dizer que F1 e F4 apresentam atividade antioxidante cerca de 3,24 e 1,65 vezes maior que a apresentada por este padrão, respectivamente.

Quanto ao antioxidante padrão Vitamina C pode-se notar que o mesmo possui valor de IC₅₀ maior que F1, F2, F3 e F4, sendo que estas frações são estatisticamente diferentes (P<0,05) do antioxidante padrão. Elas apresentam atividade antioxidante cerca de 1,66, 0,75, 0,96 e 1,72 vezes maior que a vitamina C, respectivamente.

4.3.3 Correlação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante

De acordo com a literatura, os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante devido a sua estrutura química e às suas propriedades de oxirredução, as quais permitem com que atuem como agentes redutores, eliminadores de oxigênio singlete e como doadores de hidrogênio. Assim, quanto maior o número de hidroxilas, maior será a atividade de captura de radicais livres. Isto deve-se a presença de grupos hidroxilas, capazes de quelar metais e eliminar radicais livres (MORAIS et al., 2009).

Na Tabela 16, foram comparados os IC₅₀ (µg/mL) com a porcentagem de polifenóis totais (PT) e taninos totais (TT) presentes em cada uma das amostras testadas para se verificar se existe relação direta entre a presença de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Tabela 16 – Comparação do teor de polifenóis totais (TT) e taninos totais em relação ao IC₅₀ do extrato e frações de *C. peltophoroides*.

Amostra	PT (%)	TT (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
EB	22,74	16,80	7,40
FAQ	26,16	10,27	9,57
FAE	27,98	18,62	4,90
F1	42,84	28,23	2,95
F2	22,83	20,02	3,95
F3	33,78	30,40	4,10
F4	48,67	40,92	2,38
F5	31,21	23,05	4,42

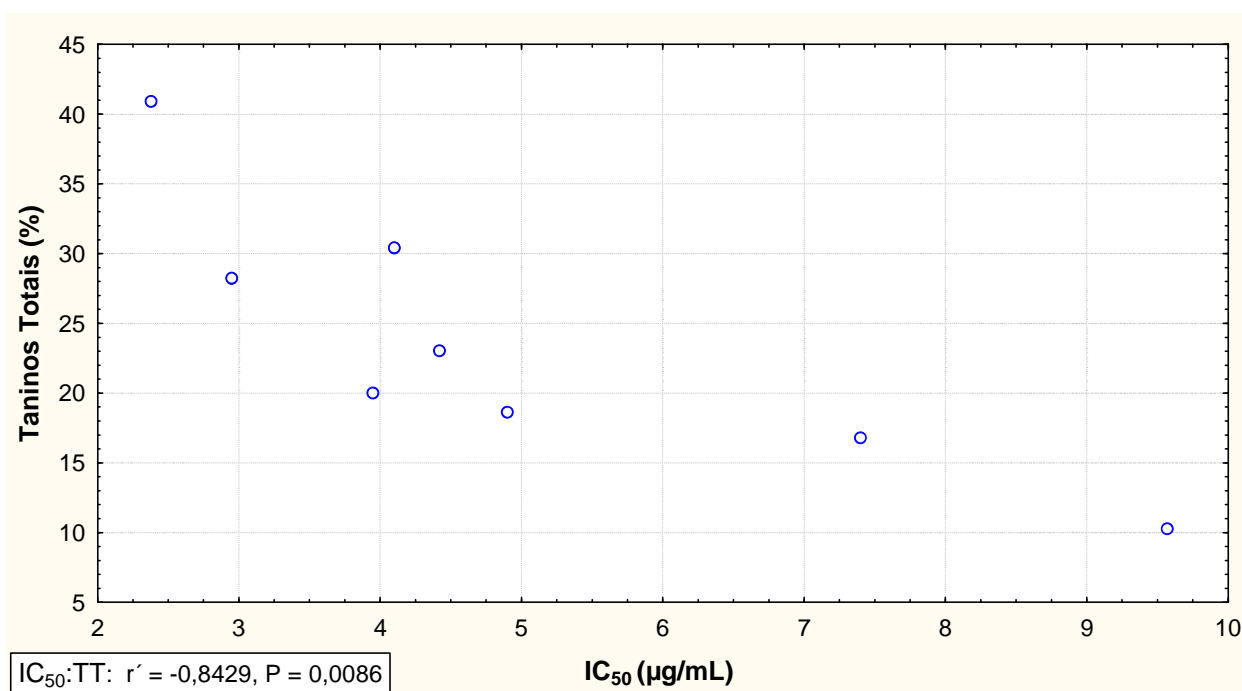


Figura 23 – Correlação de Pearson entre IC₅₀ (µg/mL) e taninos totais (%).

Valores de PT e TT maiores refletem na avaliação antioxidante apresentando um baixo valor de IC₅₀, comprovando que quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior é a capacidade antioxidante da amostra. A correlação entre a porcentagem de taninos totais e IC₅₀ (µg/mL) é comprovada pela correlação de Pearson (Figura 23), onde $P < 0,05$ ($P = 0,0086$) e r' (estatística amostral) não está próximo de zero. Portanto, estabelecer correlação entre a capacidade antioxidante de extratos e frações contendo taninos em sua composição é viável e comprova a eficiência destas substâncias no sequestro de radicais livres, como afirmam Sousa et al. (2007).

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE CICATRIZANTE

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A PELE

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 16% do peso corporal. Atua como barreira protetora contra agentes externos, o atrito e a perda de água (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; YOUNG et al., 2007). É constituída de duas porções com origens embrionárias diferentes (Figura 24): a epiderme, com origem do ectoderma e a derme, com origem do mesoderma intraembrionário. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, que não pertence à pele, mas atua como suporte para ela (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

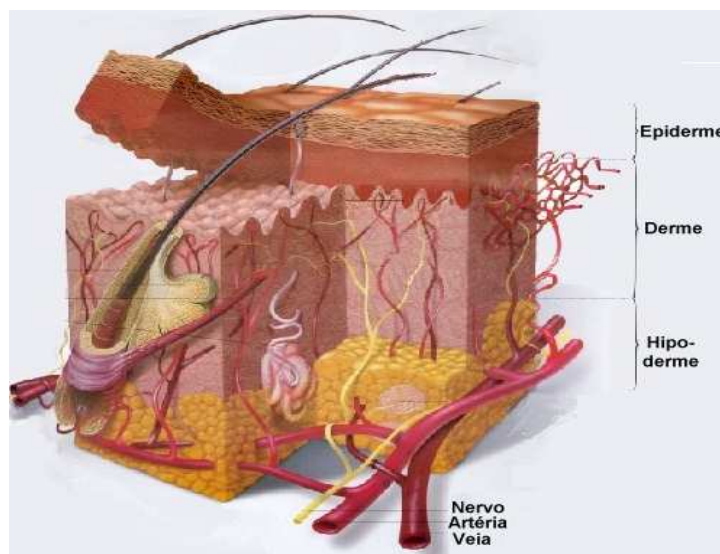


Figura 24 - Camadas da pele (Fonte: adaptado de <http://www.saudetotal.com.br/prevencao/topicos/histologia.asp> acessado em 31-05-10).

A epiderme é formada pelo epitélio estratificado pavimentoso queratinizado composto principalmente de queratinócitos (responsáveis pela coesão, renovação e barreira da epiderme), melanócitos (formadores de pigmentos), células de Langerhans (apresentadoras de antígenos) e células de Merkel (mecano receptores) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; FERREIRA et al., 2007).

A epiderme é dividida em cinco camadas: basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal encontra-se apoiada na membrana basal separando a epiderme da derme e apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela regeneração da pele. A camada espinhosa, ou supra-basal, também apresenta atividade mitótica, mas em uma intensidade menor. A camada granulosa contribui para a formação de uma barreira protetora para a pele. As camadas lúcida e córnea são ricas em queratina, sendo encontradas principalmente em peles espessas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). No processo de cicatrização os queratinócitos perdidos com a injúria são repostos através da atividade

mitótica que ocorre na camada basal formando células que migram para as camadas superiores da epiderme (BLOOW; FAWCETT, 1995 apud FERREIRA et al., 2007).

Sob a epiderme encontra-se a derme que é constituída de tecido conjuntivo contendo fibras elásticas e colágenas, responsáveis pela elasticidade e tonicidade da pele, além de vasos sanguíneos e terminações nervosas, responsáveis por nutrir e sustentar a epiderme. A derme é constituída de duas camadas: papilar (superficial) e reticular (profunda). A camada papilar é formada pelo tecido conjuntivo frouxo através das fibras colágenas tipo III, e possui macrófagos, mastócitos, fibroblastos, além de outras células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Os fibroblastos são células responsáveis pela produção de colágeno que ajuda a isolar e reparar o tecido lesado, sendo importantes na formação do tecido de granulação (BALBINO et al., 2005). A camada reticular é formada pelo tecido conjuntivo denso através das fibras colágenas tipo I, que se entrelaçam com as fibras elásticas sustentando a epiderme (FERREIRA et al., 2007).

1.2 ATIVIDADE CICATRIZANTE

1.2.1 Processo de cicatrização

A pele apresenta função de barreira protetora contra o ambiente externo, protegendo o organismo. Quaisquer danos causados a ela, seja físico, químico ou biológico, desencadeiam de imediato sinais que caracterizam o processo inflamatório. Durante a cicatrização do tecido lesado, ocorre imediatamente a migração celular de fibroblastos, queratinócitos e células epiteliais (SINGER; CLARK, 1999 apud BALBINO et al., 2005). Os fatores de crescimento liberados por estas células, juntamente com os componentes da matriz celular, são capazes de disparar sinais que iniciam e param cada um dos processos pelo qual ocorre a cicatrização. Com isso, há a produção de colágeno pelos fibroblastos (fibroplasia), deposição da matriz extracelular, formação de novos vasos (angiogênese), cicatrização e re-epitelização da região da ferida (BALBINO et al., 2005). Estes processos têm sido divididos em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem (Figura 25 e 26) (CLARK, 1996).

A fase inflamatória ocorre assim que o tecido é lesionado resultando em inchaço, rubor, calor e dor (MACKAY; MILLER, 2003). Nesta etapa, ocorre o extravasamento sanguíneo, com posterior coagulação, e a ativação e deposição de plaquetas, as quais secretam fatores de crescimento, como o derivado de plaquetas (PDGF), crescimento epidérmico (EGF), crescimento transformance- α e transformance- β (TGF- α e TGF- β) e fator de crescimento de células endoteliais (VEGF), além de tromboxanos e fator de ativação plaquetária (PAF) (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A resposta inflamatória também provoca o aumento da permeabilidade vascular com recrutamento de neutrófilos e monócitos para o tecido injuriado. Os neutrófilos atuam formando uma barreira protetora na

superfície da lesão contra os microorganismos através da fagocitose e os monócitos se transforma em macrófagos, células importantes no reparo tecidual por fagocitarem bactérias e neutrófilos que perderam a função além de sequestrarem tecidos mortos (MACKAY; MILLER, 2003).

A segunda fase, proliferativa, é responsável pela re-epitelização (recobrimento da ferida por um novo epitélio) e a formação do tecido de granulação (tecido conjuntivo vascularizado) (SINGER; CLARK, 1999 apud MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009). A re-epitelização ocorre a partir das células da camada basal onde os queratinócitos, com a lesão, iniciam o processo mitótico e proliferam em direção ao centro da ferida. A formação do tecido de granulação (por volta do quarto dia) ocorre a partir da liberação de fatores de crescimento e quimiotáticos pelas plaquetas e macrófagos, os quais estimulam a migração e ativação intensificada dos fibroblastos. Estas células são essenciais para a formação do tecido de granulação por serem responsáveis pela produção de colágeno local juntamente com a neovascularização do tecido (angiogênese), fenômeno conhecido como fibroplasia (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO et al., 2005). O tecido de granulação é formado por células tais como fibroblastos, macrófagos, componentes neovasculares e da matriz (glicosaminoglicanas, fibronectina e colágeno) (MANDELBAUM et al., 2003; GUIDUGLI-NETTO, 1992 apud BALBINO et al., 2005). É um tecido edematoso formado por vasos imaturos que se rompem facilmente.

Por volta do décimo dia a ferida encontra-se toda preenchida pelo tecido de granulação, neovascularizada e na presença de fibras colágenas, iniciando-se a última fase, de remodelamento (MANDELBAUM et al., 2003; BALBINO et al., 2005). Nesta fase, o tecido continua a ser enrijecido por mais fibras colágenas obtendo aparência de cicatriz (BALBINO et al., 2005). O colágeno é responsável pela resistência e integridade do tecido e dos novos vasos dependendo do tipo e quantidade das fibras formadas. Estas fibras são classificadas como tipo I e III de acordo com o grau de maturação, sendo a sua quantificação essencial para se comparar a reparação tecidual. A fibra colágena tipo I é considerada a fibra madura e a tipo III a fibra jovem (CUTTLE et al., 2005). A quantidade de colágeno produzida e a forma de como as fibras estão organizadas determina a resistência do novo tecido formado (MACKAY; MILLER, 2003; BALBINO et al., 2005). Ao final desta fase, os anexos da pele (folículos pilosos e glândulas) começam a aparecer na parte cicatrizada.

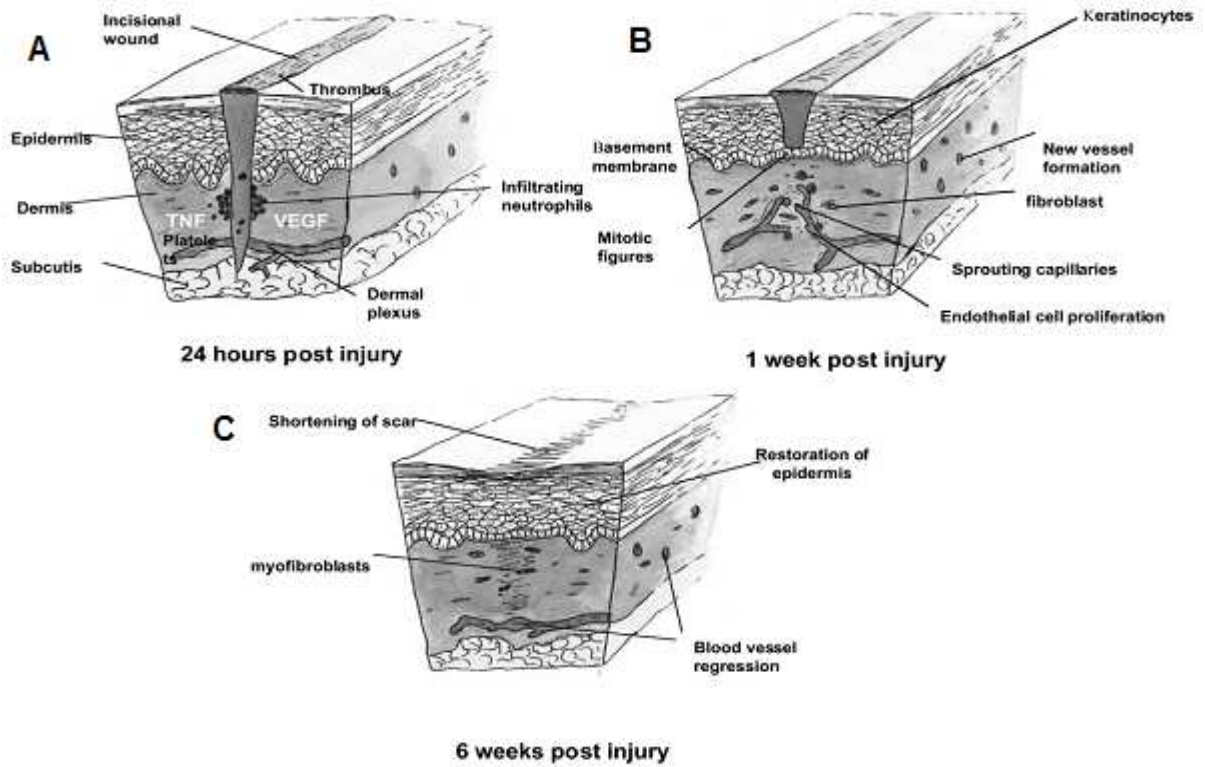


Figura 25 – Fases de cicatrização: (A) fase inflamatória, (B) fase de proliferação e (C) fase de remodelagem (BATES; JONES, 2003).

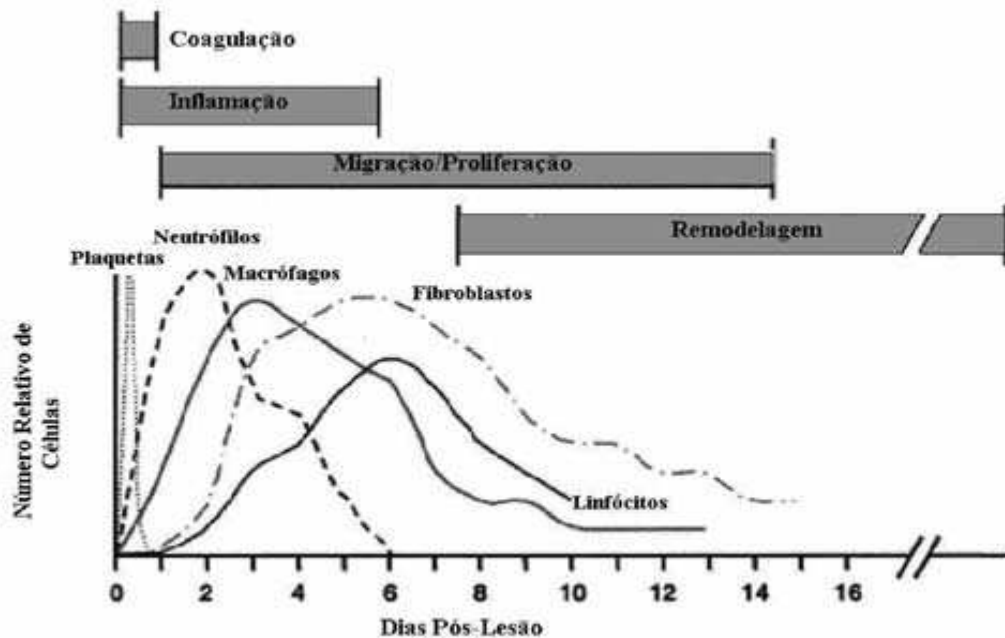


Figura 26 – Fases da cicatrização com as respectivas migrações celulares em cada etapa. (PARK; BARBUL, 2004 apud MENDONÇA; COUTINHO-NETO, 2009).

1.2.2 Permeação cutânea em espectroscopia fotoacústica

A aplicação tópica de medicamentos tem sido utilizada para o tratamento de diversos processos patológicos de pele. Para a eficácia desse tratamento é necessário que a penetração da droga, presente na formulação, consiga chegar às camadas internas da pele (derme) (BARRY, 2001). A ação terapêutica em sítios específicos do tecido epidérmico é o que se espera em uma terapia dermatológica, para isso é necessária a absorção percutânea do fármaco na pele. Os fármacos podem ser incorporados a diversas formas farmacêuticas que resultam em diferentes velocidades de absorção, tempo de início, pico e duração da penetração. A composição do fármaco utilizado, a natureza do veículo e as condições da pele influenciam na permeação dos medicamentos (ALLEN JR et al., 2007). O estudo da permeação cutânea serve para que as formulações dermatológicas sejam otimizadas permitindo assim uma maior permeação do fármaco na pele e conseqüentemente uma melhor ação terapêutica.

A técnica de Espectroscopia Fotoacústica (PAS) permite avaliar *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* a propagação e distribuição de medicamentos ou cosméticos que são aplicados topicamente. A partir dela, pode-se realizar separação espectral dos diversos constituintes das formulações através da absorção óptica, obtida no espectro total da formulação. Essa absorção óptica é dada pela interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo que comprimentos de onda diferentes transportam diferentes quantidades de energia, o que resulta em informações sobre a estrutura molecular do material analisado (ALCANTARA, 2001 apud SEHN, 2006).

A PAS é baseada no efeito fotoacústico, o qual consiste na geração de uma onda acústica que gera uma modulação na luz absorvida pelo material para uma célula contendo gás e acoplada a um microfone (Figura 27). Esta luz absorvida é transformada em energia térmica gerando uma onda de pressão no gás. Como cada substância absorve em comprimento de onda diferente e com intensidades diferentes é observado a variação de pressão, que é detectada pelo microfone e resulta em um sinal fotoacústico. Então, este sinal fotoacústico depende da frequência da modulação da luz incidente, ou seja, da intensidade do sinal (SEHN, 2006).

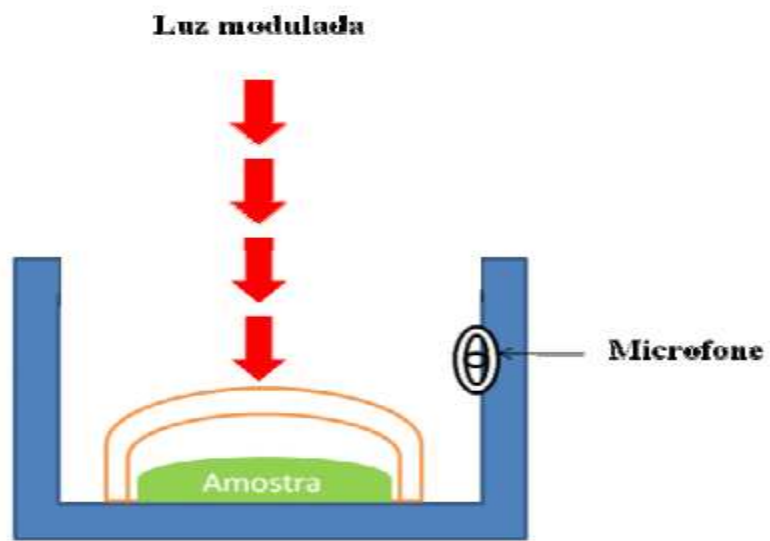


Figura 27 – Esquema de uma célula fotoacústica (FREITAS, 2009).

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Na avaliação da atividade cicatrizante do extrato bruto de *Caesalpinia peltophoroides* em comparação com o gel base, este capítulo teve por objetivo:

- Verificar o comprimento e espessura da área re-epitelizada.
- Contagem do número de metáfases bloqueadas.
- Avaliar as fibras colágenas tipo I e III.
- Avaliar a permeação cutânea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes, reagentes e soluções

Todos os solventes e reagentes empregados possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.) das marcas Mallinckrodt®, Merck®, Sigma®, Carlo Erba®, Vetec® ou Synth® e alta pureza das marcas Across®, Invitrogen®, Aldrich®, exceto quando especificado.

- Alaranjado G
- Álcool absoluto
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ácido pícrico
- Cera de abelha
- Eosina
- Eosina Amarelada
- Etanol 92,8% (p/p)
- Hematoxilina
- Ketamina
- Parafina
- Ração Nuvilab®
- Rompum
- Solução fixadora Bouin
- Xilol

3.1.2 Equipamentos

- Balança analítica AND HR-200
- Balança analítica Gehaka 2000
- Microscópio de captura de imagem Olympus BX41 UTU 0.5XC-3
- Microscópio Nikon YS29
- Micrótomo Leica RM2245
- Polarizador Attachment Nszh-KPO
- Software analizador de imagem (Image-Pro Plus versão 4.5)

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CICATRIZANTE

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 60 dias (220-240 g) provenientes do Biotério Central da UEM mantidos em condições laboratoriais padronizadas (temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de $50\pm 10\%$), e ciclo dia-noite de 12 h com livre acesso à ração e água.

3.2.2 Comitê de ética em experimentação animal

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as regras de cuidado e uso de animais de laboratório elaboradas de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá. O projeto foi submetido ao comitê e recebeu sua aprovação conforme mostra o Anexo I.

3.2.3 Obtenção do gel de carbopol para o tratamento das feridas

-Carbopol 940 NS	0,2 g
-Trietanolamina	0,2 g
-Extrato Bruto	1%
-Óleo de amêndoas	0,6 g
-Água destilada q.s.p.	20 g

Para a preparação do gel utilizou-se o carbopol 940 NS e pulverizou-o em gral de porcelana. A água destilada pesada em um béquer foi acrescentada aos poucos sobre o carbopol, sob agitação, até dissolvê-lo por completo. Após, a trietanolamina foi acrescentada diretamente no gral, com agitação constante, até obtenção de consistência de gel e em seguida foi adicionado o óleo de amêndoas. O óleo de amêndoas foi acrescentado à formulação, pois melhora a absorção devido ao seu caráter lipofílico. Então, acrescentou-se a concentração de 1% do extrato bruto liofilizado e previamente homogeneizado de *Caesalpinia peltophoroides* (sendo que 1 g do EB equivale a 227,4 mg de polifenóis totais), previamente pesada, permanecendo em agitação. O gel base foi preparado da mesma forma, no entanto excluiu-se a adição do extrato bruto (CORRÊA, 2005).

3.2.4 Avaliação da atividade cicatrizante

3.2.4.1 Preparação de feridas e tratamento dos animais

Para o processo de avaliação da atividade cicatrizante utilizaram-se 20 ratos Wistar divididos em quatro grupos correspondente a 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento. Neste período os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério setorial do Departamento de Ciências Morfológicas (DCM) em condições laboratoriais padronizadas

(temperatura de 22 ± 1 °C e umidade relativa de $50\pm 10\%$), e ciclo dia-noite de 12 h recebendo ração Nuvital e água *ad libitum*.

Para a elaboração das feridas, os animais foram analgesiados com Rompum/Ketamina 1:1 (1 mg/kg) com posterior tricotomia do dorso. Após a assepsia do local, utilizou-se um molde (punch) para marcar a área da confecção das feridas (1 cm²). Com auxílio de tesoura realizaram-se duas feridas, ou seja, com remoção da epiderme e derme, como mostra a Figura 28. O início do tratamento com os géis foi realizado 24 h da após a elaboração das feridas. A ferida da direita recebeu tratamento diário com gel base e a da esquerda com gel contendo 1% (referente a 227,4 mg de polifenóis totais em 1 g do extrato bruto) do extrato bruto das cascas de *C. peltophoroides* (gel contendo EB). Após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento, administrou-se sulfato de vincristina 0,5 mg/kg (Tecnocris® 1 mg/mL) para bloquear a proliferação mitótica (SEHN et al.; 2009). Duas horas após a administração os animais foram anestesiados com tiopental até overdose e realizou-se o exame macroscópico (visual) das feridas.

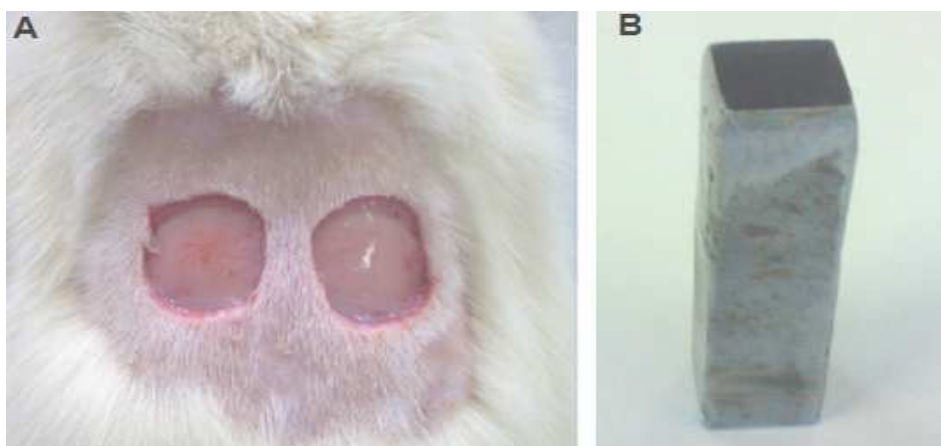


Figura 28 – (A) Feridas realizadas no dorso dos animais e (B) punch utilizado para marcação no dorso.

3.2.4.2 Preparação da pele para análise morfológica

Os fragmentos de pele dos quatro grupos de tratamento foram removidos e deixados por 24 h em solução de Bouin (ácido pícrico:ácido fórmico:ácido acético; 75:25:5; v/v) para fixação do material, sendo posteriormente emblocado. Foram realizados cortes semisseriados (6 µm) do centro da ferida, dispostos em duas lâminas, com 5 cortes cada, uma corada pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e a outra por picro-Sírius (DAYAN et al., 1989).

As lâminas coradas com a técnica HE foram avaliadas em microscópio acoplado a um sistema de captura de imagem e analisadas pelo programa Image Pro-Plus® quanto à re-epitelização (comprimento e espessura) e número de metáfases. As lâminas coradas com

a técnica picro-Sírius foram avaliadas em microscópio contendo luz polarizada para a quantificação das fibras colágenas tipo I e III através do programa Image Pro-Plus®.

3.2.4.3 Análise da re-epitelização

Aos 4 e 7 dias de tratamento foi realizada a medida do comprimento da área re-epitelizada levando-se em conta a parte superior da mesma, nos dois lados da ferida, seguindo-se até a verificação do tecido íntegro, como mostra a Figura 29. Os valores das medidas foram somados e utilizados para a comparação pelo programa de estatística Statistica® 8.0. Aos 10 e 14 dias de tratamento a ferida encontrou-se totalmente fechada sendo realizada a medida da espessura da área re-epitelizada em três pontos distintos do centro da mesma. As análises foram realizadas em 3 cortes de cada uma das lâminas. A objetiva utilizada foi de 10X.

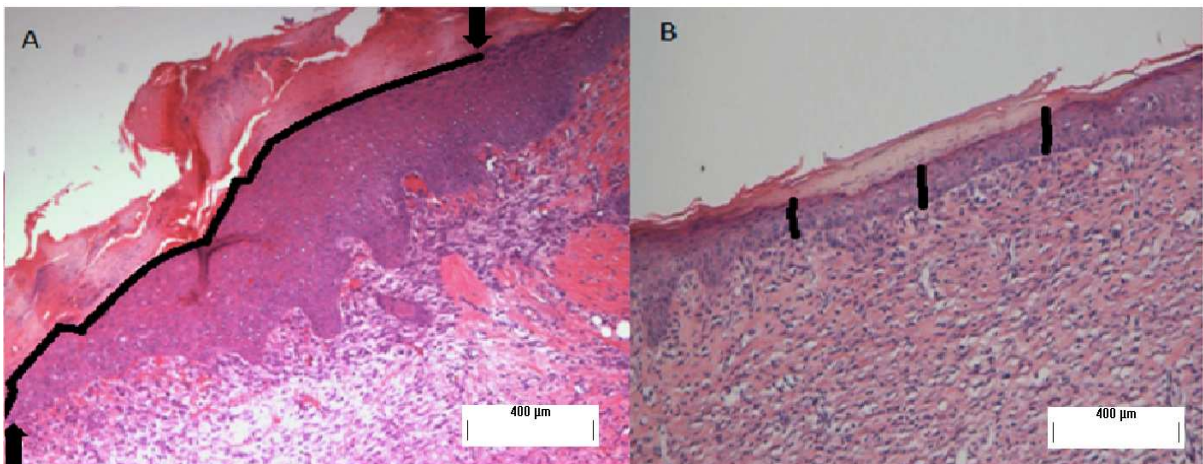


Figura 29 – Figura representativa medida do comprimento (A) e espessura (B) da área re-epitelizada. As setas indicam o início e fim da área re-epitelizada.

3.2.4.4 Contagem de metáfases

A contagem do número de metáfases foi realizada na camada basal e supra basal da área de re-epitelização, como mostra a Figura 30. Analisaram-se 5 cortes de cada lâmina com um comprimento de 10.000 µm, equivalente a 40 campos microscópicos de 250 µm cada. Foi utilizada objetiva de 40X para a contagem das metáfases e o resultado expresso em metáfases/mm.

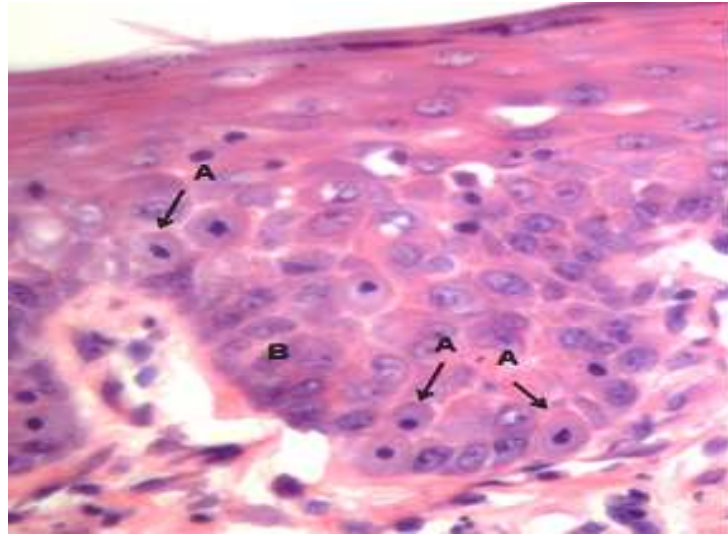


Figura 30 – Fotomicrografia das metáfases (A) presentes na camada basal/supra basal (B) da área de re-epitelização.

3.2.4.5 Análise das fibras colágenas

Para visualização das fibras colágenas através da birrefringência utilizou-se microscópio equipado com polarizador, no qual o fundo das lâminas possuem coloração preta e as fibras colágenas coloração vermelho/amarelo e verde.

A quantificação das fibras foi realizada através do programa ImagePro Plus[®], o qual calculou automaticamente a área das proteínas coradas (verde ou vermelho/amarelo). Para definir os pixels a serem contados pelo programa foram selecionados tons de vermelho, amarelo e verde. As fibras verdes foram consideradas como tipo III e as vermelhas/amarelas como tipo I, como pode ser observado na Figura 31. As análises foram realizadas em triplicada para cada lâmina e em cada corte histológico padronizou-se para a contagem o campo central e dois campos laterais da ferida da camada papilar da derme (CUTTLE et al., 2005). Foi utilizado objetiva de 20X para a quantificação das fibras.

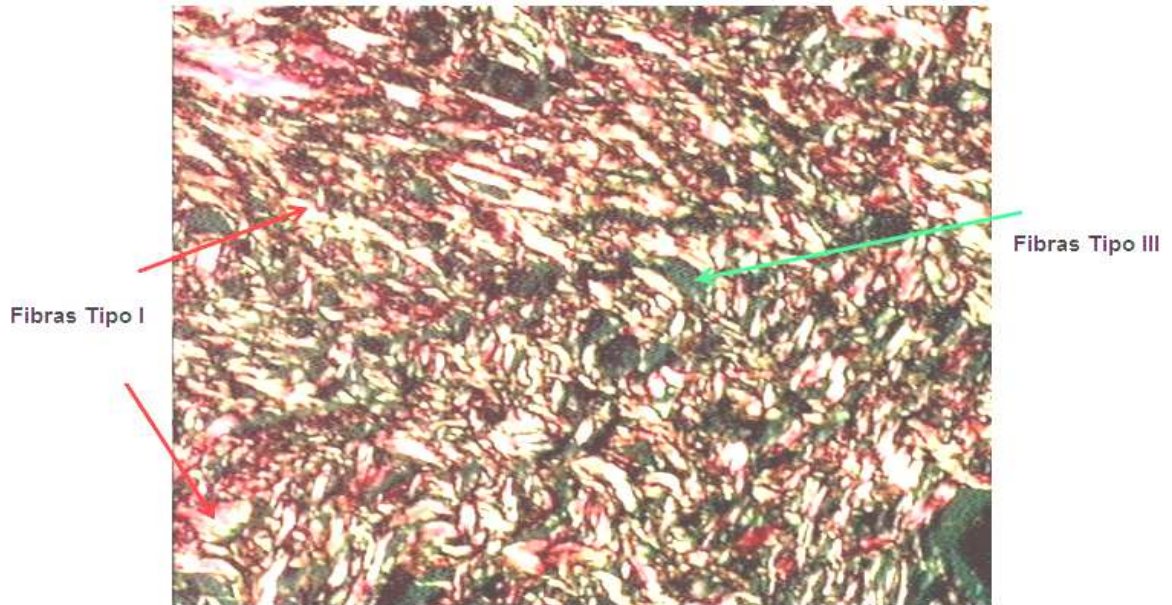


Figura 31 – Fotomicrografia birrefringência das fibras colágenas tipo I (vermelha/amarela) e III (verde) da camada papilar de pele.

3.2.4.6 Análise de permeação cutânea

A análise foi realizada utilizando-se 2 animais por grupo de tratamento, 4, 7, 10 e 14 dias, conforme a seção 3.2.4, exceto pela aplicação do sulfato de vincristina e análises histológicas. A pele foi removida e encaminhada imediatamente ao laboratório de fotoacústica para análise da permeação cutânea. As espessuras das amostras de pele foram mensuradas com um micrômetro digital.

Inicialmente, o extrato bruto de sibipiruna (em pó) e o gel contendo EB foram medidos por espectroscopia fotoacústica (Figura 32) para verificar a região espectral de absorção de seus componentes entre 200 e 800 nm. As amostras foram depositadas na cavidade do porta-amostra, dentro da câmara fotoacústica para medida de absorção. O gel base foi depositado em uma cubeta de quartzo alojada no caminho do feixe de luz, próximo ao foco, mas fora da câmara fotoacústica. Deste modo, detectou-se a absorção da substância por meio de uma medida de transmissão da luz, já que a luz que passa através da amostra é absorvida por um pó (padrão) que se encontra, dentro da célula fotoacústica.

As amostras de pele foram analisadas na porção epidermal (parte externa) e porção dermal (parte interna) da ferida. As leituras obtidas foram comparadas para verificar se houve ou não permeação do EB de sibipiruna. Para uma melhor avaliação da permeação cutânea realizou-se a subtração dos valores do espectro da porção dermal da ferida tratada com gel contendo EB e a tratada com o gel base.

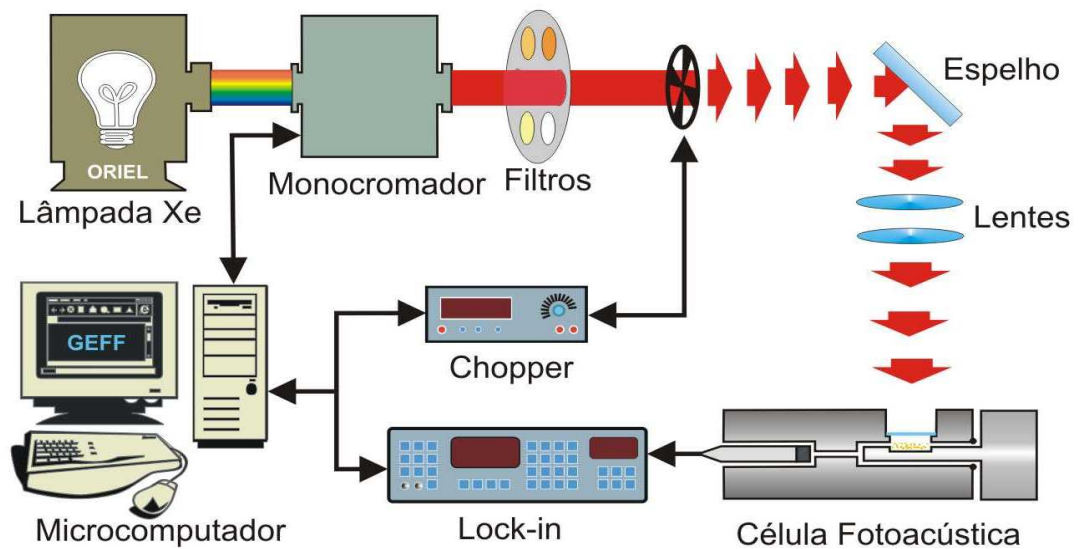


Figura 32 – Arranjo experimental da espectroscopia fotoacústica para medidas *in vitro* (PEDROCHI, 2004).

3.2.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística através do programa Statistica[®] 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007). Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão [coeficiente de variação (%)] utilizando-se análise de variância unilateral (one-way ANOVA). As diferenças significativas foram determinadas pelo teste de comparações múltiplas Tukey, sendo considerado $P < 0,05$ como critério de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das feridas iniciou-se o tratamento com o gel contendo 1% de EB e gel base. A partir do terceiro dia de tratamento pode-se observar (exame macroscópico) a fase inflamatória, sendo que a ferida tratada com gel contendo EB apresentava uma crosta mais seca e firme com menos edema que a tratada com gel base (Figura 33). Não se pode observar diferença entre o tamanho das feridas devido à presença da crosta que pode fornecer um resultado equivocado.

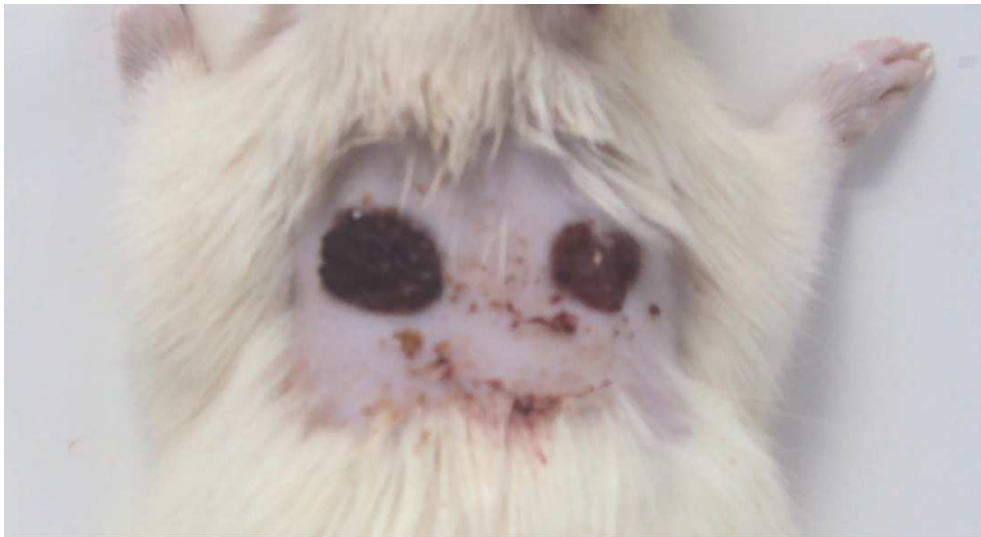


Figura 33 – Fotografia da região dorsal do animal após 4 dias de tratamento com o gel contendo EB (esquerda) e gel base (direita).

As lâminas coradas com HE foram analisadas em microscópio óptico acoplado a captura de imagem e os cortes analisados pelo programa ImagePro-Plus®. As medidas do comprimento da área re-epitelizada (Tabela 17, Figuras 34 e 35) aos 4 dias e da espessura aos 10 e 14 dias de tratamento com o gel contendo EB apresentaram-se maior do que as tratadas com gel base, respectivamente. Porém aos 7 dias o comprimento da área re-epitelizada permaneceu o mesmo que o observado aos 4 dias de tratamento com o gel contendo EB, implicando que o aumento da proliferação celular para o centro da ferida ocorreu principalmente aos 4 dias de tratamento e que aos 10 e 14 dias esta proliferação foi maior quanto a espessura da camada epidermal. Para o gel base, a re-epitelização inicia-se aos 4 dias de tratamento tendo seu ápice aos 7 dias. No entanto, aos 10 e 14 dias de tratamento observa-se que a espessura da epiderme é menor que os tratados com gel com EB. A análise estatística destes dados (ANOVA) demonstra que o gel contendo EB

apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os dias de tratamento em relação ao gel base.

Tabela 17 – Valore médios do comprimento (4 e 7 dias) e espessura (10 e 14 dias) da área re-epitelizada para as feridas tratadas com gel base e gel com EB (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base (μm) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB (μm) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
4	2572,29 \pm 222,54 [8,65]	2929,47 \pm 526,84 [17,98]
7	3703,94 \pm 723,55 [19,53]	2889,61 \pm 530,16 [18,35]
10	69,56 \pm 8,36 [12,02]	95,17 \pm 13,53 [14,22]
14	35,50 \pm 6,07 [17,10]	75,65 \pm 1,72 [2,28]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

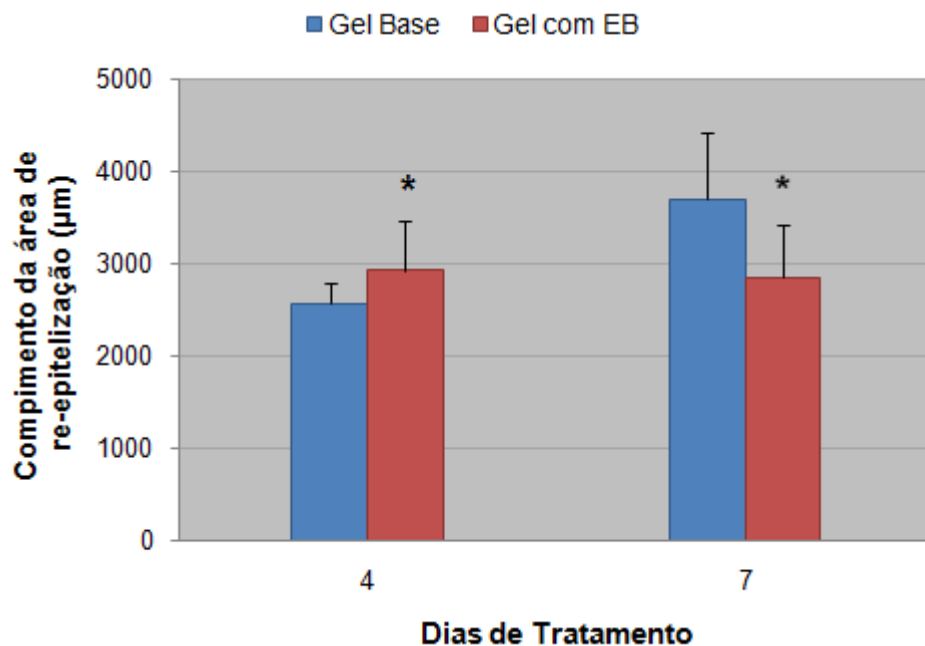


Figura 34– Representação da média \pm desvio padrão da medida do comprimento da área de re-epitelização, em μm , aos 4 e 7 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada em ANOVA com *($P < 0,05$) comparado com o gel base.

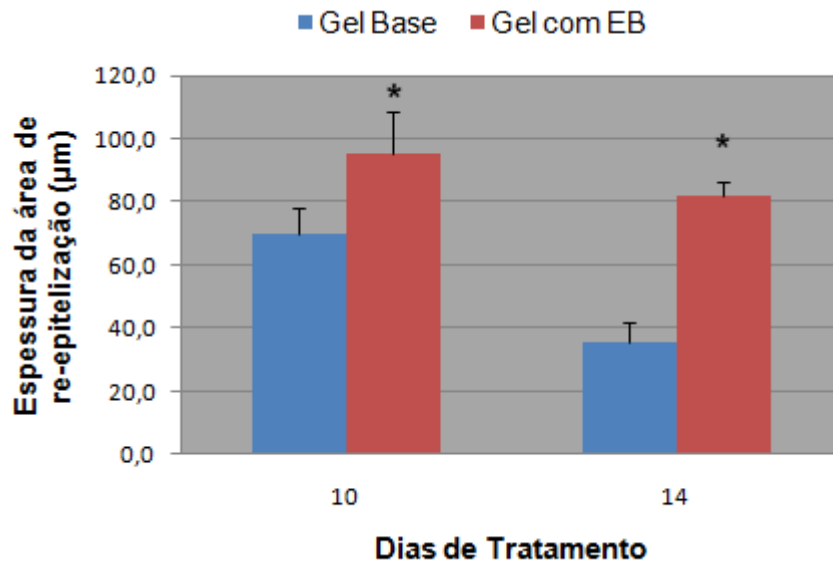


Figura 35 – Representação da média±desvio padrão da espessura da área de re-epitelização, em µm, aos 10 e 14 dias de tratamento das feridas com gel base e gel com EB (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *($P < 0,05$) comparado com o gel base.

A fase proliferativa inicia-se após a fase inflamatória e consiste em re-epitelização, fibroplasia e angiogênese, e está relacionada com o processo de re-epitelização e formação do tecido de granulação. Na Figura 36 observa-se que o processo de re-epitelização, aos 4 e 7 dias de tratamento dos animais, apresentou migração e proliferação de células (possivelmente de fibroblastos e queratinócitos) a partir da margem da ferida (término do tecido íntegro) em direção ao centro da mesma. Este fenômeno ocorreu através dos “efeitos de vizinhança livre” no qual as células pertencentes à camada basal próxima à ferida são estimuladas e adquirem atividade mitótica proliferando para o centro da lesão (MONTESANO; ORCI, 1988). Na mesma figura nota-se que aos 10 e 14 dias de tratamento as margens da ferida se encontraram e a re-epitelização começou atuar na espessura, e não mais no comprimento da epiderme, sendo a lesão totalmente recoberta por células epidermais.

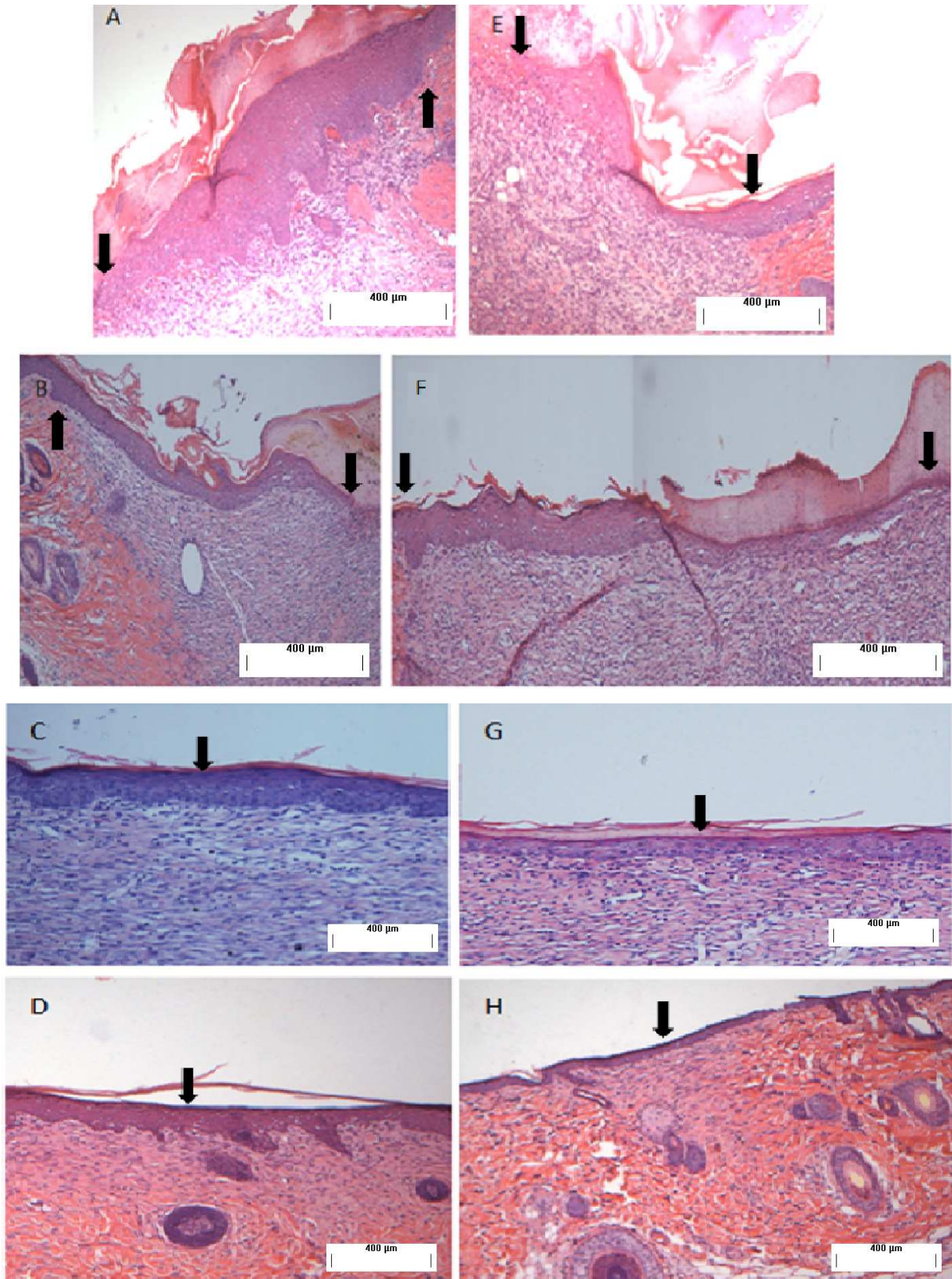


Figura 36 – Fotografia de cortes histológicos da área re-epitelizada de um dos lados das feridas tratadas e do centro das feridas tratadas com gel com EB (A, B, C e D) e com o gel base (E, F, G e H), aos 4, 7, 10 e 14 dias, respectivamente (n=5). As setas indicam o início e

fim da área re-epitelizada aos 4 e 7 dias e o centro da área aos 10 e 14 dias (HE, objetiva 10X).

As células vizinhas da camada basal quando em tecido normal encontram-se em contato umas com as outras permanecendo inibidas e apresentando um potencial mitótico latente (BALBINO et al., 2005). Assim que ocorre a lesão, este efeito inibitório desaparece e as células passam a apresentar o efeito mitótico para que possa ocorrer a re-epitelização do tecido injuriado. Uma forma de se analisar a proliferação celular é a partir da administração do sulfato de vincristina ao animal duas horas antes do sacrifício. O sulfato de vincristina é um quimioterápico que atua ligando-se à tubulina, impedindo a formação de microtúbulo, o que resulta na interrupção da mitose em metáfase (FARO et al., 2008). A quantidade de metáfases em cada tratamento é mostrada na Figura 37 e Tabela 18, na qual pode-se observar que o número de metáfases para o tratamento com o gel contendo EB e com o gel base aumenta até 7 e 10 dias, respectivamente, para então começar a diminuir. Esses dados mostram que enquanto a ferida tratada com gel contendo EB apresenta um processo mitótico acentuado aos 7 dias, o controle (gel base) mostra este resultado aos 10 dias, ou seja, cerca de 3 dias depois. Assim, pode-se dizer que a relação entre a área re-epitelizada e o número de metáfases mostra um potencial proliferativo superior em feridas tratadas com o gel contendo EB de *C. peltophoroides*. Durante o tratamento com o gel contendo EB o número de metáfases apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado com o gel base.

Tabela 18 – Número de metáfases/mm encontradas na camada basal e supra basal da área re-epitelizada para os dois tratamentos (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base $(\bar{x} \pm dp \text{ [CV\%]})$	Gel com EB $(\bar{x} \pm dp \text{ [CV\%]})$
4	1,2±0,22 [18,00]	2,5±0,46 [18,33]
7	2,08±0,34 [16,40]	4,63±0,62 [13,37]
10	4,8±0,55 [11,39]	3,00±0,50 [16,67]
14	0,60±0,10 [16,67]	1,33±0,13 [17,32]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

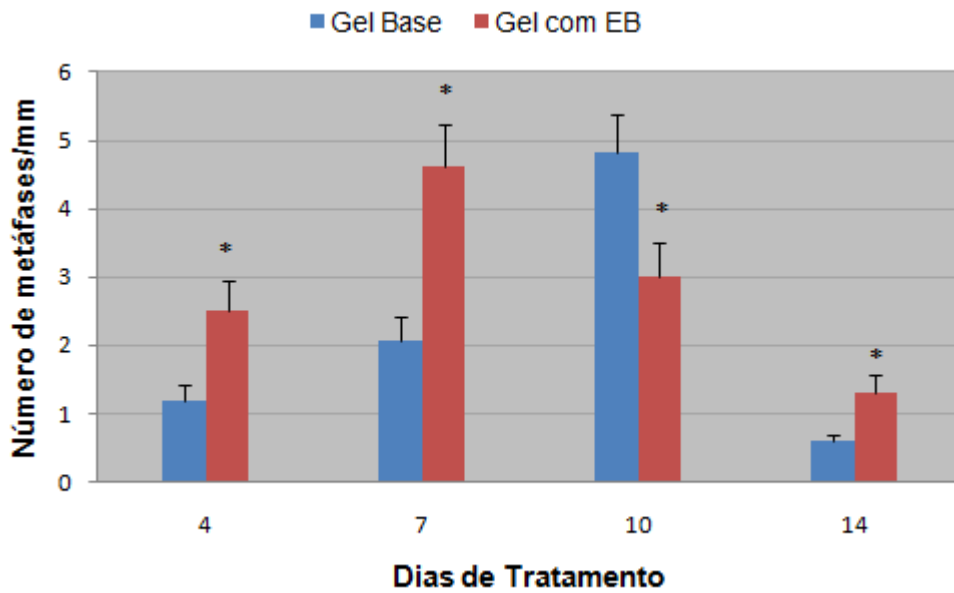


Figura 37 – Representação da média±desvio padrão do número de metáfases contadas na camada basal e suprabasal da área re-epitelizada das feridas com tratamento aos 4, 7, 10 e 14 dias (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *($P < 0,05$) comparado com o gel base.

Para a avaliação da quantidade de fibras colágenas presentes em um tecido existem diversas técnicas empregadas, como exemplo: coloração com picro-Sírius, ensaio de hidroxiprolina, coloração com tricômio de Masson, hibridização *in situ* de RNAm e a imunohistoquímica. Esta última é muito utilizada, no entanto é um processo caro pela necessidade de anticorpos específicos. Uma técnica que apresenta baixo custo, é simples e confiável é a que utiliza o corante picro-Sírius, descrita por Junqueira e colaboradores (JUNQUEIRA et al., 1978 apud CUTTLE et al., 2005). Ela é baseada na birrefringência natural que o colágeno possui, resultante do modo de disposição de suas fibras e na presença do corante picro-Sírius quando visualizado por microscopia de polarização. Esta propriedade é destacada podendo assim se diferenciar os tipos de fibras colágenas. As fibras colágenas tipo III (jovens) por serem finas e frouxas apresentam a birrefringência com coloração verde, enquanto as fibras colágenas tipo I (maduras) são compactas e espessas apresentando coloração de amarelo intenso e vermelho (MONTES; JUNQUEIRA, 1991).

Na Tabela 19 e Figuras 38 e 39 a quantidade de fibras colágenas tipo III (jovens) está presente em maior porcentagem aos 4 e 7 dias de tratamento tanto com o gel base quanto com o gel contendo EB, decrescendo nos próximos dias. Existe uma diferença significativa ($P < 0,005$) aos 10 dias de tratamento, mostrando que a formação de fibras colágenas tipo III no gel contendo EB obteve uma diminuição importante que leva, em consequência, ao aumento de fibras colágenas tipo I. Aos 4, 7 e 10 dias de tratamento nota-

se que as fibras tipo I apresentam-se em proporção estatisticamente superiores ($P < 0,05$) nas feridas tratadas com gel contendo EB quando comparado ao gel base, garantindo, assim, que a formação do tecido conjuntivo ocorre mais rapidamente na ferida tratada com o gel contendo EB. Nos demais dias de tratamento não se observou diferença significativa ($P > 0,05$) entre a quantidade de fibras colágenas presente nos cortes histológicos das feridas tratadas com gel contendo EB e gel base.

Tabela 19 – Porcentagem de fibras colágenas tipo I e III presentes no gel base e gel com EB aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5).

Dias de Tratamento	Gel Base Fibras Tipo I (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel Base Fibras Tipo III (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB Fibras Tipo I (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])	Gel com EB Fibras Tipo III (%) ($\bar{x} \pm dp$ [CV%])
4	29,80±2,65 [0,00]	50,02±1,99 [0,00]	38,86±1,45 [0,00]	53,14±9,56 [0,01]
7	28,79±1,29 [0,00]	56,32±5,61 [0,01]	34,52±2,15 [0,00]	52,23±3,69 [0,01]
10	49,63±3,69 [7,43]	42,05±2,56 [6,10]	74,20±4,27 [5,76]	21,95± 1,46 [6,66]
14	73,37±6,64 [0,21]	17,80±1,60 [0,02]	82,11±4,05 [0,01]	14,19±2,72 [0,05]

\bar{x} = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

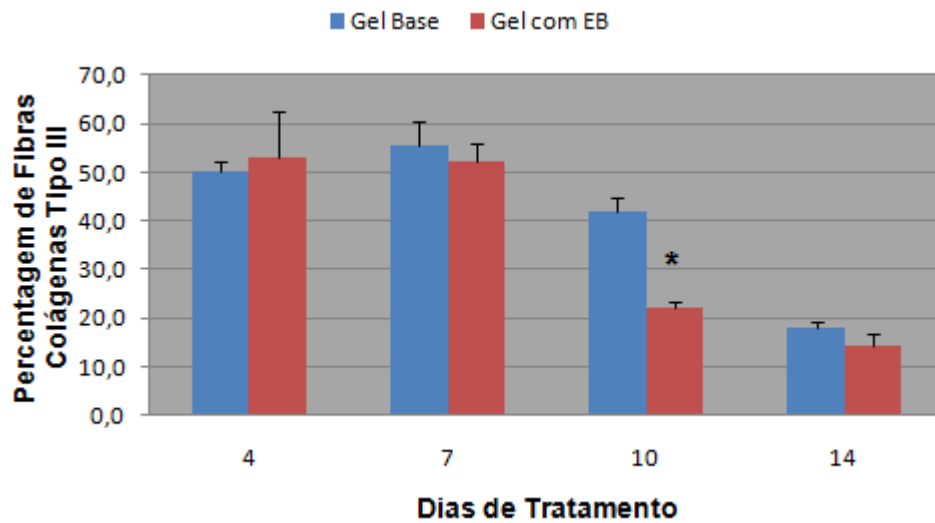


Figura 38 – Percentagem de fibras colágenas tipo III (vermelhas/amarelas) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.

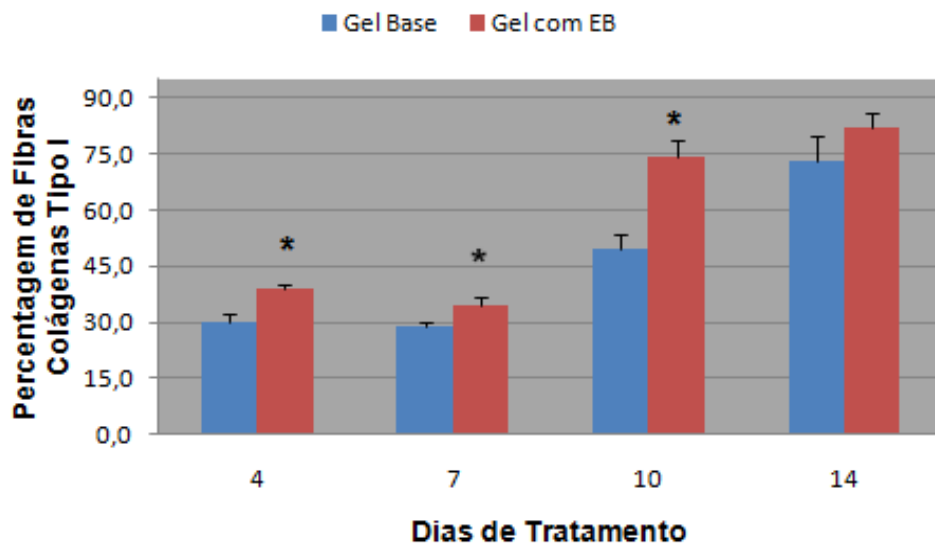


Figura 39 – Percentagem de fibras colágenas tipo I (vermelhas/amarelas) aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento (n=5). Análise estatística realizada por ANOVA com *(P<0,05) comparado com o gel base.

A formação das fibras colágenas é dependente do recrutamento de diversas células que ocorre na fase inflamatória, dentre elas os neutrófilos, monócitos e fibroblastos. Os monócitos acabam se diferenciando em macrófagos, os quais na fase proliferativa passam a liberar mediadores químicos, aumentando a migração e ativação dos fibroblastos no local da ferida. Os fibroblastos são células responsáveis pela produção de colágeno para que a matriz extracelular comece a ser substituída por um tecido conjuntivo com resistência e

elasticidade, formando o tecido de granulação (BALBINO et al., 2005). Este processo é denominado de fibroplasia e no processo de injúria do tecido encontra-se associado a produção de fibras colágenas jovens (tipo III), com posterior formação de um tecido mais vascularizado e resistente contendo fibras colágenas maduras (tipo I) (GONÇALVES et al., 2010). Esta substituição de fibras para formar um tecido conjuntivo mais denso e resistente é visualizada na Figura 40.

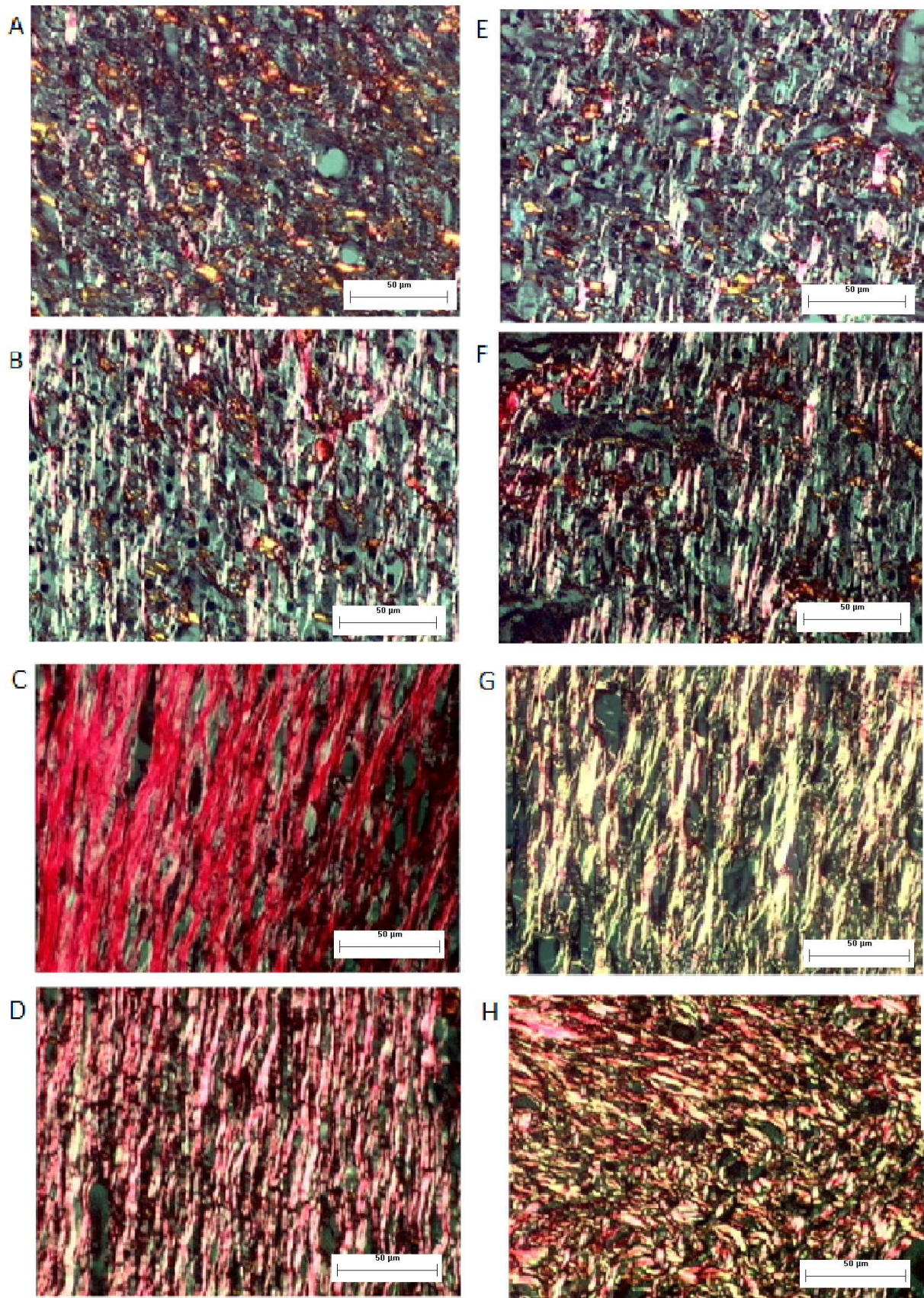


Figura 40 – Fotomicrografia da camada papilar da derme. Fibras colágenas aos 4, 7, 10 e 14 dias com gel com EB (A-D) e gel base (E-H), respectivamente (n=5) (picro-Sírius, objetiva 20X).

Para a análise da permeação cutânea através da absorção óptica em espectrofotômetro fotoacústico utilizou-se as bandas de absorção da sibipiruna que servem como indicadores na demonstração da penetração ou não da mesma ao longo das feridas. Assim, o espectro de absorção do extrato bruto de sibipiruna quando adicionado ao gel base apresenta região de absorção em aproximadamente em 280 e 370 nm, como mostrado na Figura 41.

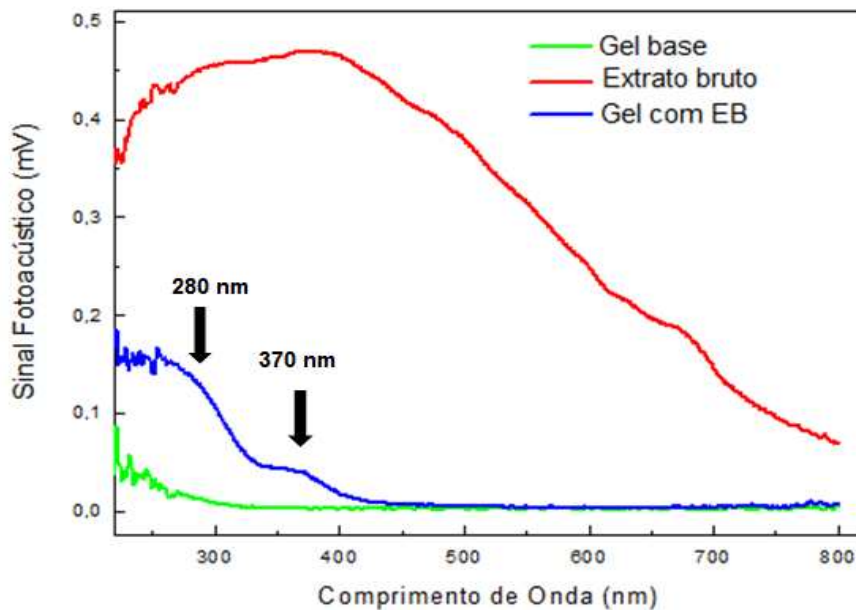


Figura 41 - Espectro de absorção óptica do gel base, EB de sibipiruna e gel contendo EB. As setas indicam a região de absorção do gel contendo EB em 280 nm e 370 nm.

Após 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento dos animais, os dados da permeação foram plotados em gráficos, referentes aos dias de tratamento, contendo a leitura da absorção do tratamento com gel base e gel contendo EB, na porção epidermal e porção dermal. Ao se comparar os espectros da Figura 41 nota-se que a absorção gerada pelo extrato bruto de sibipiruna ocorre em comprimentos de onda muito próximos àqueles onde a pele também absorve (entre 260 a 410 nm) (SEHN et al., 2010). Isto dificultou a decomposição do espectro principalmente porque a concentração do EB de sibipiruna no gel é muito pequena e assim a intensidade do espectro é determinada majoritariamente pela absorção da pele e do sangue. Além disso, a leitura dos espectros de absorção dependeu da quantidade de gel aplicada na ferida. Este critério não pôde ser estabelecido, considerando-se remoção da mesma pelo animal, que se coça e faz contato físico com as paredes da gaiola.

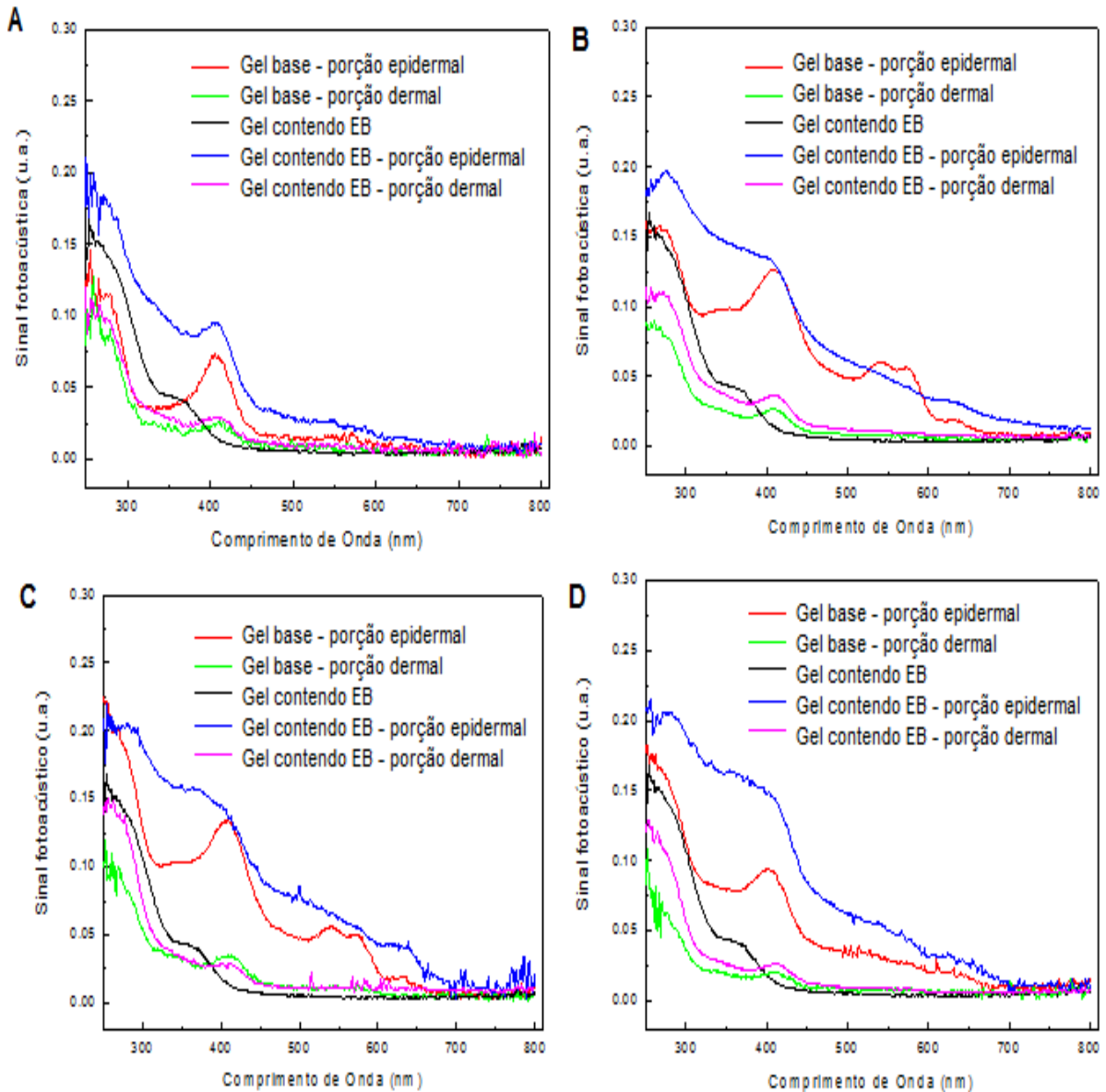


Figura 42 – Espectros de absorção aos 4, 7, 10 e 14 dias (A, B, C e D) de tratamento da ferida com o gel base e o gel contendo EB, e o do gel contendo EB, sem tratamento (n=2).

Na Figura 42 observa-se um pico de absorção em torno de 400 nm, que não foi visto no gel base, EB e gel contendo EB (Figura 41), que se refere ao sangue remanescente na área lesada (ROCHA et al., 2007). Como logo após ao processo de inflamação já inicia-se o processo de re-epitelização, visto nas Figuras 34 e 35, e a angiôgenese, acredita-se que este sangue remanescente seja devido a formação desses novos vasos. Observa-se na Figura 42 que em 4 dias de tratamento com gel contendo EB a concentração de sangue do lado de cima da ferida apresenta-se maior que o gel base, mostrando assim que há mais vasos sanguíneos formados na ferida tratada com gel contendo EB, o que está relacionado com o aumento da re-epitelização do mesmo aos 4 dias de tratamento. Estes vasos parecem ter um aumento pequeno aos 7 dias, confrontando com o processo de re-

epitelização, mantendo-se aos 10 e 14 dias, onde a re-epitelização ocorre em espessura e não mais em comprimento. Na porção dermal da ferida também é observado o sangue remanescente, indicando que a vascularização está sendo substituída no processo de cicatrização.

O pico visto na porção epidermal do gel base aos 7 e 10 dias entre 500 e 610 nm ocorre devido a presença de metahemoglobina (MARTIN et al., 2004). No gel contendo EB não se observou este pico, possivelmente devido à coloração escura observada na crosta da ferida ou o próprio gel contendo o EB pode estar formando um filme sobre a ferida que não permite a passagem da luz. Nota-se durante o tratamento que a partir do 3º dia a crosta era mais escura (marron-acastanhado), seca e firme na ferida tratada com gel contendo EB e mais umedecida e mole (amarelada) na tratada com gel base.

Através da mesma figura, nota-se a permeação do gel base e do gel contendo EB de sibipiruna na porção dermal da ferida, no entanto, observa-se que há diferença no sinal acústico entre a permeação dos géis. Assim, pode-se afirmar que o EB de *Caesalpinia peltophoroides* está permeando para o interior da pele até aos 14 dias de tratamento com o gel contendo EB.

Para melhor visualizar a permeação cutânea nos dias de tratamento utilizou-se da diminuição das curvas da porção dermal referentes ao gel base e ao gel contendo o EB de sibipiruna (Figura 43).

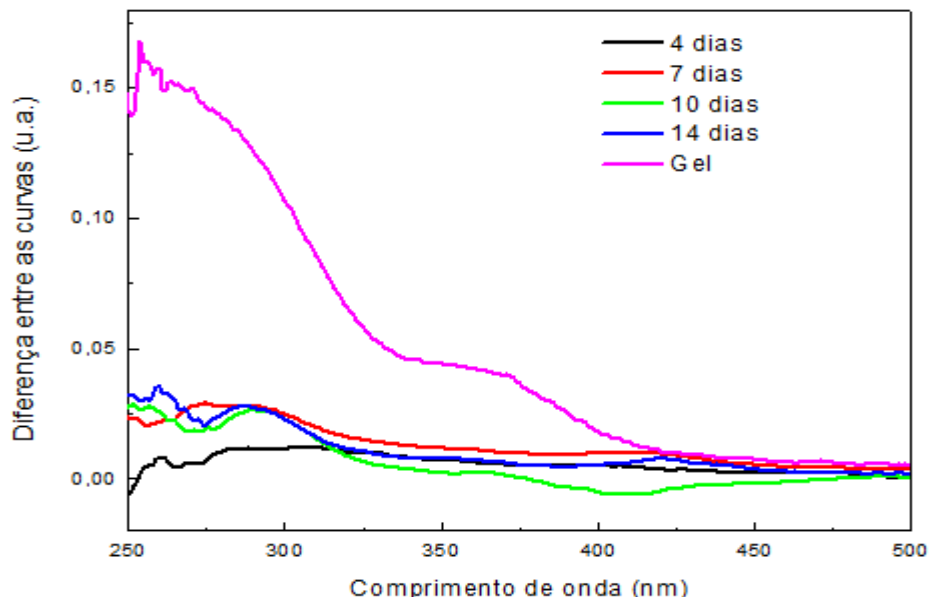


Figura 43 – Diferença dos espectros de absorção do gel contendo EB e gel base aos 4, 7, 10 e 14 dias de tratamento.

Como a pele é considerada uma barreira protetora contra o ambiente externo, qualquer ruptura em sua integridade precisa ser rápida e eficientemente reparada. Este

reparo envolve os processos já vistos, tais como: inflamação, re-epitelização (contração da ferida) e remodelação da matriz extracelular (BALBINO et al., 2005). Quando a epiderme e a derme são lesionadas há formação de um reparo temporário para que ocorra a proteção enquanto ocorre o processo cicatricial. Essa barreira temporária é formada principalmente de coágulo e fibrina, sendo denominada de crosta da ferida.

Durante a fase inflamatória há influxo de neutrófilos e macrófagos ativados na região inflamada o que aumenta a demanda de oxigênio pelos mesmos, gerando a hipóxia no tecido (BALBINO et al., 2005). Esta hipóxia é associada também a formação da crosta da ferida. Com isso há a liberação de mediadores químicos que estimulam a migração e ativação de fibroblastos no local e em paralelo ocorre a formação de novos vasos. A indução da angiogênese é dada pela baixa tensão de oxigênio que ocorre no centro dessa ferida. Com isso, capilares passam a crescer para o interior do coágulo (AGREN, 1999 apud SEHN et al., 2006). Durante a fixação e amadurecimento dos fibroblastos, que produzem células produtoras de colágenos, é que o processo de contração da ferida alcança a sua eficiência máxima. O que auxilia este processo de contração é o ressecamento da crosta superficial que durante a desidratação diminui de tamanho e arrasta o tecido a ela aderido (BALBINO et al., 2005). Este ressecamento é visível durante o tratamento principalmente próximo ao quarto dia de tratamento, pois a casca é mais firme, ou seja ressecada, na ferida tratada com o gel contendo EB.

Algumas drogas vegetais já foram avaliadas por diversos pesquisadores quanto à ação cicatrizante em ratos, com o objetivo de acelerar o processo cicatricial, sendo que cada um deles observou características diferentes deste processo (GARROS et al., 2006). Reddy et al. (2002) observaram que o extrato de *Heliotropium indicum* L. aumentou a velocidade de re-epitelização e formação de colágeno, garantindo força e resistência ao tecido. A incorporação da própolis em pomada mostrou-se eficiente na proliferação celular com quantidade de metáfases significativamente superior ao gel base aos 4, 7 e 10 dias de tratamento (SEHN et al., 2010). Priya et al. (2002) ao avaliarem o extrato de *Datura alba* Nees observaram efeito significativo quanto a reparação tecidual da ferida, menor tempo de cicatrização e aumento da formação das fibras colágenas.

Lopes et al. (2005) comprovaram que a pomada contendo extrato bruto de *Stryphnodendron obovatum* Benth. estimula a proliferação celular (re-epitelização) aos 7 e 10 dias de tratamento, e a pomada contendo extrato bruto de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. apresenta número de metáfases bloqueadas aos 4 e 7 dias de tratamento, significativamente superior que o gel base. Os autores inferiram que esta atividade pode ser devido à porcentagem de taninos presentes nestas espécies.

Assim como Lopes et al. (2005), pode-se inferir que o aumento no número de mitoses, a rápida diferenciação de fibras colágenas tipo III em tipo I e a re-epitelização

acelerada nas feridas tratadas com gel com EB de *C. peltophoroides* ocorreram devido a possível presença de taninos. O uso destes compostos polifenólicos em formulações dermatológicas deve-se à sua atividade adstringente que provoca a precipitação de proteínas, formando um revestimento protetor (SCHULZ et al., 2002; PANIZZA et al., 1998 apud ARDISSON et al., 2002). Este revestimento por sua vez causa a vasoconstrição capilar que resulta na diminuição da permeabilidade vascular e efeito anti-inflamatório local (KAPU et al., 2001; SCHULZ et al., 2002). Esta ação adstringente também atua como agente antibacteriano por desfavorecer o meio para o seu crescimento (SCHULZ et al., 2002). Durante o processo de cura da ferida ocorre o recrutamento de neutrófilos para a lesão. Estas células são importantes por atuarem na eliminação dos microrganismos através da fagocitose (BALBINO et al., 2005) e do tecido desvitalizado através de enzimas proteolíticas e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MENSAH et al., 2001). As EROs atuam como oxidantes sendo importantes no processo de cura das feridas por atuarem nos queratinócitos estimulando a expressão de VEGF local (KHANNA et al., 2001). No entanto, pode haver formação de vários oxidantes no local da ferida o que causa dano tecidual grave impedindo a cicatrização. Assim, os compostos polifenólicos que agem como potentes antioxidantes devido às suas propriedades de redução, podem atuar como bons agentes cicatrizantes (PATTANAYAK; SUNITA, 2008).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se dizer que o extrato bruto de *C. peltophoroides* mostrou um aumento da área re-epitelizada em relação ao gel base, apresentando proliferação mitótica significativa e comprovada permeação cutânea, além de atuar na maturação das fibras colágenas favorecendo o processo de cicatrização e a resistência da matriz extracelular, podendo se tornar futuramente um promissor medicamento fitoterápico com função cicatrizante.

CONCLUSÃO

As análises físico-químicas realizadas mostraram que na etapa inicial de controle de qualidade do extrato bruto das cascas de *Caesalpinia peltophoroides* os resultados obtidos cumprem as especificações estabelecidas pelas Farmacopeias.

Na padronização da metodologia analítica o pirogalol apresentou absorvidade molar mais próxima da *C. peltophoroides*, sendo o padrão de escolha para a metodologia de determinação do teor de polifenóis totais e taninos totais.

O desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação do teor de polifenóis totais com o reagente Folin-Ciocalteu para o extrato bruto de *C. peltophoroides* apresentou os requisitos mínimos aceitáveis estipulados pela RE nº 899/2003, garantindo que o método é válido para a finalidade proposta.

Ao se analisar a porcentagem de taninos totais em relação ao IC₅₀ da atividade antioxidante comprovou-se que quanto maior o número de hidroxilas presentes na amostra analisada maior é a atividade antioxidante.

As frações semipurificadas (F1 à F5) apresentaram maior quantidade de taninos totais apresentando maior atividade antioxidante que o extrato bruto e a fração acetato de etila.

O ensaio realizado para a avaliação da atividade cicatrizante mostrou que o extrato bruto de *C. peltophoroides* possui ação sobre o reparo tecidual, apresentando condições que favorecem uma cicatrização mais rápida. As condições observadas são a permeação cutânea do princípio ativo EB de *C. peltophoroides*, formação de uma maior área re-epitelizada aos 4 dias de tratamento e mais espessa ao final do tempo cicatricial analisado, com maior número de metáfases nos primeiros dias de tratamento, além na estimular a maturação das fibras colágenas.

REFERÊNCIAS

- AGREN, M. Matrix metalloproteinases (MMPs) are required for re-epithelization of cutaneous wounds. *Archives for dermatological research*, v.291, p.583-590, 1999 apud SEHN, E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- ALCANTARA, P. Jr. Espectroscopia Molecular, 2002 apud SEHN, E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- ALLEN JR, L.V.; ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G. Formas Farmacêuticas & Sistemas de Liberação Modifica de Fármacos. Ed. Artmed, 8ª ed., 2007.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, v.84, p.551-562, 2004.
- ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólicos e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyifolia* A. Cunn. Ex G.Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.231-235, 2007.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos – Uma breve revisão. *Revista Instituto Adolf Lutz*, v.66, p.232-240, 2007.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L.M.; MELLO, J.C.P. Controle de qualidade de amostras de *Paulinia cupana* H.B.K. var. *Sorbilis* (Mart.) Ducke. *Acta Farmacêutica Bonaerense*, v.23, p.383-386, 2004.
- ARDISSON, L.; GODOY, J.S.; FERREIRA, L.A.; STEHMANN, J.R.; BRANDÃO, M.G.L. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart) Coville (Barbatimão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.27-34, 2002.
- AUDI, E.A.; TOLEDO, D.P.; PERES, P.G.; KIMURA, E.; PEREIRA, W.K.V.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.; PRADO, W.A.; CUMAN, R.K.N.; AMADO, C.A.B. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, v.13, p.264-266, 1999.
- BAELMANS, R.; DEHARO, E.; BOURDY, G.; MUNOZ, V.; QUENEVO, C.; SAUVAIN, M.; GINSBURG, H. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerisation inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products? *Journal Ethnopharmacology*, v.73, p.271-275, 2000.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.
- BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. *Contribuição Efetiva do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade*. Campinas: MCT/PADCT/PGCT, 1995.
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J.M. Estrsse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, p.113-123, 2006.

- BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.14, p.101–114, 2001.
- BATES, D.O.; JONES, R.O.P. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Lower extremity wounds*, v.2, p.107-120, 2003.
- BLOOW, W.; FAWCETT, D.W. Tratado de Histologia, 10^a ed., Rio de Janeiro: Ed. Interamericana, 1975 apud FERREIRA, F.B.; BURITY, C.H.F.; PISSINATTI, A. Histologia do tegumento em *Cebus robustus* (Silva Jr., 2001) e *Cebus xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1826): cativos, *Cebidae-Primates*. *Saúde e Ambiente em revista*, v.2, p.50-67, 2007.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos - de 29 de maio de 2003. Brasília, DF. 2003.
- BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 17 – Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos - de 16 de abril de 2010. Brasília, DF. 2010.
- BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da Consulta de Validação de Fitoterápicos: Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf
Acesso em: 20 de maio de 2010.
- BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista ecotoxicologica e meio ambiente*, v.13, p.129-146, 2003.
- CARVALHO, J.C.T.; BGOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^o ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap.20, p.433-449.
- CARVALHO, E.B. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos. Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências da Universidade do Porto ao Departamento de Química. Outubro, 2007
- CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacologia*, v.18, p.314-319, 2008.
- CICCO, N.; LANORTE, M.T.; PARAGGIO, M.; VIGGIANO, M.; LATTANZIO, V. A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, v.91, p.107-110, 2009.
- CHAKRABARTI, S.; BISWAS, T.K.; SEAL, T.; ROKEYA, B.; ALI, L.; KHAN, A.K.A.; NAHAR, N.; MOSIHUZZAMAN, M.; MUKHERJEE, B. Antidiabetic activity of *Caesalpinia bonducella* F. in chronic type 2 diabetic model in Long-Evans rats and evaluation of insulin secretagogue property of its fractions on isolated islets. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.117-122, 2005.
- CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.B.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 59, p.179-186, 1998.
- CLARK, R.A. The molecular and cellular biology wound repair. New York: Plenum Press, 2nd ed., 1996.
- CORRÊA, A.D.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; QUINTAS, L.E.M. Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica. Editora Vozes, 4 ed, 2001.

- CORRÊA, N.M.; CAMARGO JÚNIOR, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Rheologic behavior of different hydrophylic gels. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.73-78, 2005.
- CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; VENTRELLA, M.C., LEITE, I.T.A.; BRAGA, J.T. Histochemical aspects of reserves mobilization of *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae) seeds during germination and seedlings early growth. *Revista Árvore*, v.32, p.641-650, 2008.
- COSTA, T.M.S.; OLIVEIRA, R.S.; LUNA, A.S. Utilização de planilha eletrônica para calibração instrumental, análise da variância e testes de significância de um método espectrométrico. *Revista Analytica*, v.21, p.46-51, 2006.
- CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M. Collagen in the sacral fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. *Wound repair and regeneration*, v.13, p.198-204, 2005.
- DAYAN, D.; HISS, Y.; HIRSHBERG, A.; BUBIS, J.J.; WOLMAN, M. Are the polarization colors of Picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, v.93, p.27-29, 1989.
- DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUNOZ, V.; RUIZ, G.; SUVAIN, M. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, p.91-98, 2001.
- DEL LAMA, M.A.; PERUQUETTI, R.C. Mortalidade de abelhas visitantes de flores de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Leguminosae) no estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, v.50, n.4, p.547-549, 2006.
- DICKSON, R.A.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J. Antibacterial and antioxidant cassane diterpenoids from *Caesalpinia benthamiana*. *Phytochemistry*, v.68, p.1436-1441, 2007.
- DUTRA, V.F.; GARCIA, F.C.P.; LIMA, H.C. Caesalpinioideae (Leguminosae) nos Campos Ruprestes do Parque Estadual do Itacolomi, MG, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.22, p.547-558, 2008.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA. Council of Europe. Determination of tannins in herbal drugs. European Directorate for the Quality of Medicines, 6^a. ed., p.A286, 2007.
- FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre, Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 263-288, 2007.
- FARMACOPEIA Brasileira, parte I. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, 4^a Ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 1988.
- FARMACOPEIA Brasileira, parte II, 5^o Fascículo. Comissão Permanente de Revisão da Farmacopeia Brasileira, 4^a ed., São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.
- FARMACOPEIA BRASILEIRA . 1^a. ed., São Paulo: Atheneu, 1959.
- FARO, A.M.; DALECK, C.R.; SANTANA, A.E.; NARDI, A.B.; MOTTA, F.R.; EURIDES, D. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida. Estudo experimental. *Ars Veterinaria*, v.24, p.001-008, 2008.
- FERREIRA, F.B.; BURITY, C.H.F.; PISSINATTI, A. Histologia do tegumento em *Cebus robustus* (Silva Jr., 2001) e *Cebus xanthosternos* (Wied-Neuwied, 1826): cativos, *Cebidae-Primates*. *Saúde e Ambiente em revista*, v.2, p.50-67, 2007.

- FREITAS, P. G. Aplicação da espectroscopia óptica para diagnóstico e análise de compostos biológicos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação de Física da Universidade Estadual de Maringá-Pr, 2009.
- FU, L.; HUANG, X.; LAI, Z.; HU, Y.; LIU, H.; CAI, X. A new 3-benzylchroman derivative from *Sappan lignum* (*Caesalpinia sappan*). *Molecules*, v.13, p.1923-1933, 2008.
- GALIANO, R.D.; TEPPER, O.M.; PELO, C.R.; BHATT, K.A.; CALLAGHAN, M.; BASTIDAS, N.; BUNTING, S.; STEINMETZ, H.G.; GURTNER, G.C. Topical vascular endothelial growth factor accelerates diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells. *American Journal of Pathology*, v.164, p.1935-1947, 2004.
- GARROS, I.C.; CAMPOS, A.C.L.; TÂMBARA, E.M.; TENÓRIO, S.B.; TORRES, J.M.; AGULHAM, M.A.; ARAÚJO, A.C.F.; SANTIS-ISOLAN, P.M.B.; OLIVEIRA, R.M.; ARRUDA, E.C.M. Extrato de *Passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.21, p.55-65, 2006.
- GLASL, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung. 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v. 123, p. 1979-1983, 1983.
- GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays. *Food Chemistry*, v.96, p.131-136, 2006.
- GONÇALVES, R.V.; MEZÊNCIO, J.M.S.; BENEVIDES, G.P.; MATTA, S.L.P.; SARANDY, M.M.; VILELA, E.F. 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*, v.43, p.350-355, 2010.
- GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.1, p.13-28.
- GUIDUGLI-NETO, J. The effect of roentgen radiation on the capillary sprouts on superficial loops of granulation tissue II: ultrastructural aspects. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*, v.6, p.66-71, 1992 apud BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURTI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.
- GÜLÇİN, I.; SAT, I.G.; BEYDEMİR, Ş.; ELMASTAS, M.; KÜFREVIÖĞLU, Ö.I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) buds and lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chemistry*, v.87, p.393-400, 2004.
- GÜLÇİN, I.; HUYUT, Z.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of acid. *Arabian Journal of Chemistry*, v.3, p.43-53, 2010.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *Journal of Natural Products*, v.59, p.205-215, 1996.
- HASLAM, E. Practical Polyphenolics from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1.ed., 1998, p.10-83.
- HOLETZ, F.B.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.100, n.4, p.397-401, 2005.

- ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.58, p.942-949, 2006.
- ISHIDA, K.; ROZEMAL, S.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on grown, capsule size and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v.5, n.29, 2009.
- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, p.428-430, 2002.
- JUNIOR, N.L.N.; RIBEIRO, J.E.G.; RODRIGUES, A.G. O programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. In: AMARAL, A.C.F.; RODRIGUES, A.G.; RIBEIRO, J.E.G.; SANTOS, M.G.; JUNIOR, N.L.N. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: Ed. Ideal, 2006, cap.2, p.29-116.
- JUNQUEIRA, L.C.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum*, v.41, p.267-274, 1978 apud CUTTLE, L.; NATAATMADJA, M.; FRASER, J.F.; KEMPF, M.; KIMBLE, R.M.; HAYES, M. Collagen in the sacresless fetal skin wound: Detection with Picrosirius-polarization. *Wound repair and regeneration*, v.13, p.198-204, 2005.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*, 11^a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.
- KALAUNI, S.K.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; BANSKOTA, A.H.; LINN, T.Z.; KADOTA, S. Cassane- and norcassane-typediterpenes of *Caesalpinia crista* from Myanmar. *Journal of Natural Products*, v.67, p.1859-1863, 2004.
- KAPU, S.D.; NGWAI, Y.B.; KAYODE, O.; AKAH, P.A.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Anti-inflammatory, analgesic and anti-lymphocytic activities of the aqueous extract of *Crinum giganteum*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.78, p.7-13, 2007.
- KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D. et al. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine*, v.31; p.38-42, 2001.
- KIM, K.; YU, H.; JEONG, S.; CHA, J.; KIM, S.; YOU, Y. Inhibitory effects of *Caesalpinia sappan* on growth and invasion of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.91, p.81-87, 2004.
- KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, v.85, p.633-640, 2004
- LENZ, G. Métodos Fotométricos. Biofísica, 1997. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biofis/Bio10003/Metfoto.pdf>. Acesso em: 22 de maio de 2010.
- LIMA, J.C.S.; MARTINS, D.T.O.; SOUZA, P.T.Jr. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phytotherapy Research*, v.12, p.218-220, 1998.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.99, p.265-272, 2005.

- LOPES, G.C.; MACHADO, F.A.V.; TOLEDO, C.E.M.; SAKURAGUI, C.M.; MELLO, J.C.P. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, p.925-931, 2009.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa – São Paulo. Ed. Instituto Plantarum, 2002, p.13-33.
- MACKAY, D.; MILLER, A.L. Nutritional support for wound healing. *Alternative Medicine Review*, v.8, p.359-377, 2003.
- MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M. H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I. Anais Brasileiros de Dermatologia, v.78, p.393-410, 2003.
- MARTIN, F.A.; ROJAS-DIAZ, D.; LUIS-GARCIA, L.; GONZALEZ-MORA, J.L.; CASTELLANO, M.A. Simultaneous monitoring of nitric oxide, oxyhemoglobin and deoxyhemoglobin from small areas of the rat brain by in vivo visible spectroscopy and least-square approach. *Journal of Neuroscience Methods*, v.140, 75-80, 2004.
- MATSUMOTO, R.L.T. Atividade antioxidante do chá mate (*Ilex paraguayensis*). Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Universidade de Saúde Pública, São Paulo, 103 p, 2008.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. review. *Phytochemistry*, v.24, p.639-652, 1985.
- MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry*, v.41, n.3, p.807-812, 1996.
- MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.84, p.257-262, 2009.
- MENSAH, A.Y.; SAMPSON, J.; HOUGHTON, P.J.; HYLANDS, P.J.; WESTBROOK, J.; DUNN, M.; HUDGES, M.A.; CHERRY, G.W. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. *Journal of Ethnopharmacology*, v.77, p.219-226, 2001.
- MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v.28, p.892-896, 2005.
- MONTES, G.S.; JUNQUEIRA, L.C. The use of Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.86, p.1-11, 1991.
- MONTESANO, R.; ORCI, L. Transforming growth factor b stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, v.85, p.4894-4897, 1988.
- MORAIS, S.M.; CAVALCANTI, E.S.B.; COSTA, S.O.; AGUIAR, L.A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.315-320, 2009.
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DIMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUNEZ, J.; PARAIO, J.C. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, v.72, p.145-171, 2001.
- NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa – *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.553-556, 2009.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v.52, p.1-31, 1989.

- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v.32, p.507-521, 1993.
- OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T. Potencialidades da utilização de taninos na conservação de forragens e nutrição de ruminantes – revisão. *Archives of Veterinary Science*, v.12, p.1-9, 2007.
- OTHMAN, A.; ISMAIL, A.; GHANI, N.A.; ADENAN, I. Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, v.100, p.1523-1530, 2007.
- PANSERA, M.R.; SANTOS, A.C.A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L.D.; PAULETTI, G.F.; SERAFINI, L.A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, p.17-22, 2003.
- PAPADOPOULOU, A.; FRAZIER, R.A. Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p.186-190, 2004.
- PARK, J.E.; BARBUL, A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *The American Journal of Surgery*, v.187, p.11S-16S, 2004 apud MENDONÇA, R.J.; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.84, p.257-262, 2009.
- PATIL, A.D.; FREYER, A.J.; WEBB, R.L.; ZUBER, G.; REICHWEIN, R.; BEAN, M.F.; FAUCETTE, L.; JOHNSON, R.K. Pulcherrimins A-D, novel diterpene dibenzoates from *Caesalpinia pulcherrima* with selective activity against DNA repair-deficient yeast mutants. *Tetrahedron*, v.53, p.1583-1592, 1997.
- PATTANAYAK, S.P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potencial of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. *Journal of Ethnopharmacology*, v.120, p.241-247, 2008.
- PEDROCHI, F. Estudo de sistemas biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*” utilizando a Espectroscopia Fotoacústica. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá-Pr, 2004.
- PELILLO, M.; CUVELIER, M.E.; BIGUZZI, B.; TOSCHI, T.G.; BERSET, C.; LERCKER, G. Calculation of the molar absorptivity of polyphenols by using liquid chromatography with diode array detection; the case of carnosic acid. *Journal of Chromatography A*, v.1023, p.225-229, 2004.
- PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, v.19, p.268-277, 1996.
- PONTES, C.A.; CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; SILVA, A.G.; BORGES, C.G. Influência da temperatura de armazenamento na qualidade das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Sibipiruna). *Revista Árvore*, v.30, p.43-48, 2006.
- PRIYA, K.S.; GNANAMANI, A.; RADHAKRISHMAN, N.; BABU, M. Healing potential of *Datura alba* on burn wounds in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.83, p.193-199, 2002.
- QUEIROZ, C.R.A.A.; MORAIS, S.A.L.; NASCIMENTO, E.A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta. (*Myracrodruon urundeuva*). *Revista Árvore*, v.26, p.485-492, 2002.
- RAO, Y.K.; FANG, S.; TZENG, Y. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.249-253, 2005.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v.29, p.755-760, 2006.

- RATMAN, D.V.; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHARA, D.K.; KUMAR, M.N.V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of controlled release*, v.113, p.189-207, 2006.
- REIS, M.S. dos; MARIOT, A; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.3, p.45-74.
- RENZ, S.V. Seminário apresentado na disciplina de Bioquímica do Tecido Animal, no programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS no primeiro semestre de 2003. Disponível em: www.ufrgs.br/bioquimica. Acesso em: 6 de fevereiro de 2007 apud OLDONI, T.L.C. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação ESALQ/USP, Universidade de São Paulo, 104 p, Piracicaba, 2007.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, p.771-780, 2004.
- RIBEIRO, F.A.L.; FERREIRA, M.M.C.; MORANO, S.C.; SILVA, L.R.S.; SCHNEIDER, R.P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, v.31, p.164-171, 2008.
- ROACH, J.S.; REYNOLDS, W.F.; TINTO, W.F. Cassane diterpenoids of *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Natural Products*, v. 66, p.1378-1381, 2003.
- ROCHA, J.C.B.; PEDROCHI, F.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P.; BAESSO, M.L. *Ex vivo* evaluation of the percutaneous penetration of proanthocyanidin extracts from *Guazuma ulmifolia* using photoacoustic spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, v. 587, p.132-136, 2007.
- RODRIGUES, A.G.; SANTOS, M.G.; AMARAL, A.C.F. Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos. In: AMARAL, A.C.F.; RODRIGUES, A.G.; RIBEIRO, J.E.G.; SANTOS, M.G.; JUNIOR, N.L.N. *A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos*. Brasília: Ed. Ideal, 2006, cap.1, p.9-28.
- SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, n.1, p.1-7, 2005.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.24, p.517-544.
- SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, v.95, p.243-249, 2006.
- SCHOLZ, E. Pflanzliche Gerbstoffe: Pharmakologie und Toxicologie. *Deutsche Apotheker Zeitung*, v.134, n.34, p.3167-3179, 1994.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p.21-40, 2001.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. *Fitoterapia Racional – Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*, 4th, São Paulo: Ed. Manole, 2004.
- SEIFRIED, H.E.; ANDERSON, D.E.; FISHER, E.I.; MILNER, J.A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v.18, p.567-579, 2007.

- SEHN, E. Utilização da espectroscopia fotoacústica na determinação de formulações de uso tópico utilizadas para a cicatrização de feridas da pele de ratos. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física da Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.
- SEHN, E.; HERNANDES, L.; FRANCO, S.L.; GONÇALVES, C.C.M.; BAESSO, M.L. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. *Analytica Chimica Acta*, v.635, p.115-120, 2009.
- SHERRAT, J.A.; DALLON, J.C. Theoretical models of wound healing: past successes and future challenges. *Comptes Rendus Biologies*, v.325, p.557-564, 2002.
- SHUKLA, S.; MEHTA, A.; JOHN, J.; MEHTA, P.; VYAS, S.P.; SHUKLA, S. Immunomodulatory activities of the ethanolic extract of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, v.125, p.252-256, 2009.
- SILVA, M.G.; OLIVEIRA, F.S.; DINIZ, M.F.F.M.; TAKEMURA, O.S. Atividade antiinflamatória do extrato etanólico de *Conocliniopsis prasiifolia* R.M. King & H. Robison na resposta celular de neutrófilos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.569-572, 2008.
- SILVA, G.D.; SILVA, S.R.S.; BARBOSA, L.C.A.; DUARTE, L.; RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, J.H.; FILHO, S.A.V.; OLIVEIRA, M.L.R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.530-536, 2009.
- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*, v.341, p.738-746, 1999 apud BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.27-51, 2005.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrate and oxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p.152-178, 1999 apud NENADIS, N.; LAZARIDOU, O.; TSIMIDOU, M.Z. Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, p.5452-5460, 2007.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v.15, p.71-81, 2002.
- SOBRINHO, T.J.S.P.; SILVA, C.H.T.P.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIN, E.L.C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilanth* (Bongard) Steudel. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.4, p. 683-689, 2008.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, p.351-355, 2007.
- SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.O.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; FILHO, J.M.B., VIANA, G.S.B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p.642-654, 2008.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1º ed., São Paulo: Ed. Instituto Plantarium, 2005.
- SRINIVAS, K.V.N.S.; RAO, Y.K.; MAHENDER, I.; DAS, B.; KRISHNA, K.V.S.R.; KISHORE, H.; MURTY, U.S.N. Flavanoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry*, v.63, p.789-793, 2003.

- TAWAHA, K.; ALALI, F.Q.; GHARAIBEH, M.; MOHAMMAD, M. EL-ELIMAT, T. Antioxidant activity and total content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, v.104, p.1372-1378, 2007.
- TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.O.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. *Revista Lecta*, v.21, p.7-13, 2003.
- TURKMEN, N.; SARI, F. VELIOGLU, Y.S. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food Chemistry*, v.99, p.835-841, 2006.
- USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B.B.; TREMEA, CATARINE; POTT, A.; POTT, V.J.; BUENO, N.R.; CASTILHO, R.O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, p.805-813, 2009.
- VERZA, S.G.; KREINECKER, M.T.; REIS, V.; HENRIQUES, A.T.; ORTEGA, G.G. Avaliação das variáveis analíticas do métodos de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.
- VICENTE, S.J.V. Caracterização antioxidante do café (*Coffea arabica*, L.) e efeitos da sua administração oral em ratos. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2009.
- VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia de DPPH. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, p.384-387, 2007.
- YADAV, P.P.; ARORA, A.; BID, H.K.; KONWAR, R.R.; KANOJIYA, S. New cassane butenolide hemiketal diterpenes from the marine creeper *Caesalpinia bonduc* and the antiproliferative activity. *Tetrahedron Letters*, v.48, p.7194-7198, 2007.
- YOUNG, B.; LOWE, J.S.; STEVENS, A.; HEATH, J.W. Wheather Histologia Funcional: texto e atlas em cores. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. *Química Nova*, v.24, p.147-152, 2001.

ANEXO I



Parecer emitido após reunião realizada em: 2 / 2 / 2010

Parecer nº 141/2010

Pesquisador: João Carlos Palazzo de Mello

Setor: DFF

Título:

Protocolo nº 056/2009

Caesalpinia peltophoroides e Stryphnodendron adstringens: Análise fitoquímica, tecnológica e biológica in vitro e in vivo

Entrada: 18/11/2009

Início: 1/12/2009

Término: 30/11/2011

Situação do Projeto: **Aprovado**

Relatório Final: **Aguarda finalização do projeto**

ATENÇÃO: este parecer, quando a situação do projeto constar "aprovado", autoriza os proponentes a executarem o protocolo em questão. O certificado será emitido após apreciação e a p r o v a ç ã o d o r e l a t ó r i o f i n a l .

Considerações e Parecer:

Em 16.12.2009 foi protocolado a resposta a este parecer (119/2009-CEAE).

Considerando que os autores esclarecem todas as dúvidas, sou de parecer favorável a aprovação do mesmo.



Dr. Vânia Antunes
Presidente do CEAE/UEM

Artigo 10 da Resolução nº 032/2006-CEP: Os projetos analisados serão enquadrados em uma das seguintes categorias:

I - aprovado;

II - pendente, quando o CEAE considerar o protocolo e o projeto como aceitáveis, porém com problemas no protocolo, no projeto ou em ambos, e houver recomendação de uma revisão específica, ou solicitação de modificação ou informação relevante, que deverá ser atendida em até 60 dias, após o recebimento da comunicação, pelo coordenador do projeto;

III - arquivado, quando o protocolo permanecer pendente, transcorridos 30 dias, após o prazo previsto no Inciso II do recebimento da comunicação;

IV - não aprovado