



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ELISA GOMES LANNA**

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE *Bryophyllum Pinnatum***  
**(Lam.) Oken COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

**JUIZ DE FORA**

**2015**

**ELISA GOMES LANNA**

**COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE *Bryophyllum Pinnatum*  
(Lam.) Oken COM  $\beta$ -CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai  
Co-orientador: Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa

**JUIZ DE FORA**

**2015**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Gomes Lanna, Elisa.  
COMPOSIÇÕES NANOESTRUTURADAS DE Bryophyllum Pinnatum (Lam.)  
Oken COM B-CICLODEXTRINA / Elisa Gomes Lanna. -- 2015.  
161 f.

Orientador: Ângelo Márcio Leite Denadai  
Coorientador: Orlando Vieira de Sousa  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2015.

1. Bryophyllum pinnatum. 2. Flavonóides. 3. Beta-ciclodextrina. 4. Nanotecnologia. 5. Atividade anti-inflamatória tópica. I. Márcio Leite Denadai, Ângelo, orient. II. Vieira de Sousa, Orlando, coorient. III. Título.

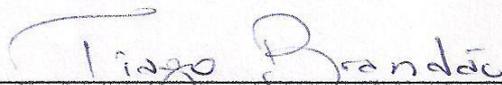
**Composições nanoestruturadas de *Bryophyllum Pinnatum*  
(Lam.) Oken com  $\beta$ -ciclodextrina**

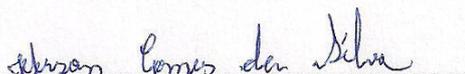
**Elisa Gomes Lanna**

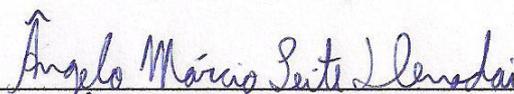
**ORIENTADOR (A): Ângelo Márcio Leite Denadai**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17/07/2015

  
\_\_\_\_\_  
Tiago Antônio da Silva Brandão

  
\_\_\_\_\_  
Jeferson Gomes da Silva

  
\_\_\_\_\_  
Ângelo Márcio Leite Denadai

Dedico, aos meus pais, meu tudo, Renilda Gomes Lanna e Elysio Trivellato Lanna

## AGRADECIMENTOS

À Deus, não só por mais essa conquista, mas por tudo que tenho e por todas as pessoas que colocou em vida!

Ao meu orientador, Ângelo Márcio Leite Denadai, meu muito obrigado por esses dois anos de mestrado! Por toda orientação frente ao desconhecido! Por fazer o esquema Orientador em Valadares e orientanda em Juiz da Fora dar certo! Agradeço também pela confiança e paciência.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Orlando Vieira de Sousa, que se dispôs a me ajudar mesmo em meio a tanto compromissos! Obrigado pela participação e colaboração efetiva na realização do meu trabalho!

Aos meus pais, Renilda e Elysio, meus maiores exemplos de superação e amor. Por acreditarem sempre nos meus sonhos e por sempre fazerem de tudo por mim e pelas minhas irmãs! Amo muito vocês! Muito Obrigado!

As minhas irmãs, Carol e Alda. A Carol, minha primeira e única companheira de “república”, por ser o Pink e eu o Cérebro, e pela convivência diária. A Alda (Dinha), minha saudade, pelos momentos divertidos, mesmo que rápidos! Final do ano é você, Doutora!

À toda minha família, uns mais de longe outro mais de perto, por todo carinho. Em especial a minha Tia Eloisa, pelas palavras sempre carinhosas e de incentivo! E ao meu primo Victor, por toda a loucura e, também pela ajuda quando eu precisei!

Ao meu bem, Gláuber, por ser parte desses dois anos e por ter feito os meus dias os melhores! Obrigado por me incentivar e me apoiar sempre! E também a sua família, por me fazer sentir em casa aqui em Juiz de Fora!

As meninas, Tirza, Duda, Raquel e Tamara, por serem sempre tão presentes mesmo com a distância!

Aos IC's do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, William Lucas Ferreira da Silva, Pedro Henrique Santos de Freitas e Bruna Celeida Silva Santos (hoje também mestranda!), por toda ajuda, apoio e explicações nos experimentos.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Jésus de Paula Sarmiento e Éder Luis Tostes, por sempre estarem atentos as nossas necessidades e dispostos em ajudar!

À toda a turma do Laboratório de Nanotecnologia dos Fluidos Complexos e dos Sistemas Supramoleculares, Anna Isabel, Vanessa, Bolivar, Letícia e Juliano, por todo o auxílio em Valadares. E em especial, a Ana Maria e a Vanessa Bittencourt, por toda a ajuda nos experimentos, pelos dias nos laboratórios, por me receberem tão bem nas minhas idas a Valadares! Vocês foram muito importantes!

Ao Prof. Dr. Jéferson Gomes da Silva, por sempre estar disposto a ajudar, sempre com muito bom-humor!

Aos novos amigos que fiz no mestrado, Milene Minateli, Rafael Pimentel e Fabrini Almeida, por compartilharem comigo momentos de dúvidas, desespero com prazos, e alegrias nesses dois anos! Vocês foram essenciais não só nos experimentos! Não perderemos contato!

Aos colaboradores do Laboratório de Genética e Biotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas, em especial à Aryane Campos Reis, por toda a atenção dispensada e por ser sempre tão solícita quando necessário.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, na pessoa da coordenadora Prof. Dra. Maria Silvana Alves.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelo amparo e oportunidade de conquistar mais esse objetivo. Agradeço também ao secretário do programa, Arlem, por toda paciência e solicitude sempre que necessário.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

À Universidade Federal de Juiz de Fora (Campus Juiz de Fora e Campus Governador Valadares), pela oportunidade e infraestrutura para realização dos trabalhos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com colaboração e amizade, tornando assim tudo um pouco mais fácil! Hoje eu não “Mestrei” sozinha, nós “Mestramos” juntos!

"Ao infinito... e além!"

("To infinity... and beyond!")

Buzz Lightyear (Tim Allen), "Toy story", 1995

## RESUMO

A *Bryophyllum pinnatum*(Lam.) Oken (Crassulaceae) é conhecida popularmente como folhada-fortuna, courona, courona-vermelha, coirama e saião-roxo. Popularmente é usada como agente antimicrobiano (antifúngico e antibacteriano) e para o tratamento de úlceras gástricas, diarreia, vômito, queimaduras e doenças inflamatórias. O objetivo do presente trabalho foi potencializar a bioatividade do seu extrato etanólico através do desenvolvimento de uma composição nanoestruturada, usando  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) como matriz hospedeira, seguida de sua incorporação em formulação semissólida para uso como anti-inflamatório tópico. Inicialmente, o material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com etanol seguida de partição, obtendo-se as frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica. Para o nanoencapsulamento do extrato/frações com  $\beta$ CD, quantidades iguais de extrato/frações e  $\beta$ CD foram pesados e solubilizados em etanol e a solução foi submetida à secagem (40° C) sob agitação. Caracterizações físico-químicas foram realizadas no intuito de mostrar a formação de compostos de inclusão entre a  $\beta$ CD e constituintes do extrato e, identificar suas propriedades. Classes de constituintes do extrato/frações foram identificadas através das espectroscopias de UV-Vis e IR. A identificação dos nanoagregados e a avaliação da estabilidade coloidal foram feitas por medidas de espalhamento de luz dinâmico, potencial zeta e condutividade. Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA) foram usadas para comprovar o aumento da estabilidade térmica enquanto que ensaios de solubilização foram realizados para mostrar o aumento da solubilidade na presença de  $\beta$ CD. Os experimentos de atividade antioxidante do extrato/frações avaliada pelos ensaios com radical DPPH, do poder de redução do  $Fe^{3+}$  e do sistema de cooxidação $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, permitiram mostrar que a  $\beta$ CD foi capaz de melhorar significativamente a atividade antioxidante do extrato etanólico ( $P < 0,005$ ), fração acetato de etila ( $P < 0,005$ ) e fração hexânica ( $P < 0,005$ ), se comparado com o extrato/fração puro. A atividade anti-inflamatória tópica foi avaliada através do modelo de edema de orelha induzida aplicação tópica de óleo de cróton, com posterior análise histológica e ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Quando avaliado a atividade anti-inflamatória das formulações semissólidas contendo o composto de inclusão com  $\beta$ CD, percebeu-se uma melhora da atividade quando comparado com as formulações que continham o extrato etanólico na forma livre, mostrando que a complexação dos componentes do extrato com a  $\beta$ CD é uma importante estratégia a ser considerada para o desenvolvimento de formulação para uso tópico.

**Palavras-Chave:** *Bryophyllum pinnatum*, flavonoides, atividade antioxidante, atividade anti-inflamatório, beta-ciclodextrina, nanotecnologia.

## ABSTRACT

The *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken (Crassulaceae) is popularly known as “folha-da-fortuna”, “courona”, “courona-vermelha”, “coirama” and “saião-roxo”. It is popularly used as antimicrobial (antifungal and antibacterial) and for treatment of gastric ulcers, diarrhea, vomiting, burns and inflammatory diseases. The goal of this study was to enhance the bioactivity of the ethanolic extract by developing nanostructured compositions, using  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD) as host matrix, followed by its incorporation into semisolid formulation for use as anti-inflammatory topic. Initially, the dried and powdered plant material was subjected to maceration with ethanol followed by partition to obtain the hexanic, dichloromethanic, ethyl acetate and butanolic fractions. For the nanoencapsulation of the extract/fractions with  $\beta$ CD, equal amounts of extract/fractions and  $\beta$ CD were weighed and solubilized in ethanol and the solution was subjected to drying (40 °C) under stirring. Physicochemical characterizations were carried out in order to show the formation of inclusion compounds between  $\beta$ CD and constituents of the extract/fraction and, identify their properties. Constituents of the extract/fractions were identified by UV-Vis and IR spectroscopies. The identification of nanoclusters and the evaluation of the colloidal stability was made by dynamic light scattering measurements, zeta potential and conductivity. Differential thermal analysis (DTA) and thermogravimetry (TGA) were used to demonstrate the increase in thermal stability while solubilization tests were performed to show increased solubility in the presence of  $\beta$ CD. The antioxidant activity of the extract/fractions was evaluated by trials with DPPH radical, power reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  and  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, allowed to show that  $\beta$ CD was able to significantly improve the antioxidant activity of ethanol extract ( $P < 0.005$ ), ethyl acetate fraction ( $P < 0.005$ ) and hexane fraction ( $P < 0.005$ ), compared with the extract/fraction pure. The topical anti-inflammatory activity was evaluated through ear edema model induced by croton oil, with subsequent histological analysis and assay of myeloperoxidase activity (MPO). When evaluated the anti-inflammatory activity of semisolid formulations containing the inclusion compound with  $\beta$ CD, it was noticed an improvement in activity when compared to the formulations containing the ethanol extract in the free form, proving that the complexation of the extract components with  $\beta$ CD is an important strategy to consider for the formulation development for topical use.

**Keywords:** *Bryophyllum pinnatum*, flavonoids, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, beta-cyclodextrin, nanotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b>	Número de patentes com ciclodextrinas em formulações farmacêuticas..	2
<b>FIGURA 2</b>	Folhas e flores de <i>Bryophyllum pinnatum</i> .....	3
<b>FIGURA 3</b>	Reação química entre o radical DPPH e a quercetina.....	17
<b>FIGURA 4</b>	Reação de redução do complexo férrico $[(Fe^{+3} - (TPTZ)_2)]^{+3}$ para um complexo ferroso $[(Fe^{+2} - (TPTZ)_2)]^{+2}$ .....	18
<b>FIGURA 5</b>	Sistema de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico na presença de um antioxidante.....	18
<b>FIGURA 6</b>	Perfil de biodisponibilidade de um fármaco convencional.....	20
<b>FIGURA 7</b>	Perfil de biodisponibilidade de um fármaco a partir de um sistema de liberação controlada.....	21
<b>FIGURA 8</b>	Fórmula estrutural de uma ciclodextrina ( $\beta$ CD).....	23
<b>FIGURA 9</b>	Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica na conformação em cadeira.....	23
<b>FIGURA 10</b>	Estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado.....	23
<b>FIGURA 11</b>	Fluxograma do processo de extração e fracionamento.....	28
<b>FIGURA 12</b>	Processo de incorporação dos extratos em $\beta$ CD.....	29
<b>FIGURA 13</b>	Preparação das amostras puras para leitura em espectrofotômetro UV-Vis.....	30
<b>FIGURA 14</b>	Preparo das soluções dos compostos de inclusão para as leituras espectrofotométricas no UV-Vis.....	30
<b>FIGURA 15</b>	Preparo das amostras para realização dos experimentos de IR.....	31
<b>FIGURA 16</b>	Leitura das amostras por Fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	32
<b>FIGURA 17</b>	Dimensões da sonda reológica DIN 53 019.....	36
<b>FIGURA 18</b>	Montagem do sistema reológico.....	36
<b>FIGURA 19</b>	Espectro eletrônico do extrato etanólico puro.....	48
<b>FIGURA 20</b>	Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.....	49
<b>FIGURA 21</b>	Espectros eletrônicos das frações: A) hexânica, B) diclorometânica, C) em acetato de etila e D) butanólica livre.....	50
<b>FIGURA 22</b>	Espectros eletrônicos de UV-vis do extrato etanólico e extrato etanólico na presença de $\beta$ CD. A) Espectro completo. B), C) e D) diferentes regiões.....	51
<b>FIGURA 23</b>	Comparação entre os espectros de UV-Vis das diversas frações, na ausência e na presença de $\beta$ CD.....	53
<b>FIGURA 24</b>	Espectro IR do extrato etanólico das folhas de <i>B. pinnatum</i> , $\beta$ CD e complexo de inclusão.....	55
<b>FIGURA 25</b>	Espectro IR da fração hexânica das folhas de <i>B. pinnatum</i> , $\beta$ CD e complexo de inclusão.....	56
<b>FIGURA 26</b>	Espectro IR da fração diclorometânicadas folhas de <i>B. pinnatum</i> , $\beta$ CD e complexo de inclusão.....	57

<b>FIGURA 27</b>	Espectro IR da fração de acetato de etila das folhas de <i>B. pinnatum</i> , $\beta$ CD e complexo de inclusão.....	59
<b>FIGURA 28</b>	Espectro IR da fração butanólica das folhas de <i>B. pinnatum</i> , $\beta$ CD e complexo de inclusão.....	60
<b>FIGURA 29</b>	Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos de soluções etanólicas de extrato e frações de <i>Bryophyllum pinnatum</i> livre e encapsulado com $\beta$ CD.....	62
<b>FIGURA 30</b>	Estrutura de uma molécula de clorofila.....	63
<b>FIGURA 31</b>	Valores médios de condutividade elétrica de soluções etanólicas de extrato e frações de <i>Bryophyllum pinnatum</i> livre e encapsulado com $\beta$ CD.....	65
<b>FIGURA 32</b>	Esquema de uma dupla camada elétrica de uma nanopartícula de carga positiva.....	66
<b>FIGURA 33</b>	Valores médios de potencial zeta de soluções etanólicas de extrato e frações de <i>Bryophyllum pinnatum</i> livre e encapsulado com $\beta$ CD.....	67
<b>FIGURA 34</b>	TGA termograma para extrato etanólico, $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 0 e 700°C.....	69
<b>FIGURA 35</b>	TGA termograma para extrato etanólico, $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 30 e 300°C.....	69
<b>FIGURA 36</b>	DTA termograma para extrato etanólico, $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 50 e 800°C.....	70
<b>FIGURA 37</b>	DTA termograma para extrato etanólico, $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 30 e 300°C.....	70
<b>FIGURA 38</b>	Perfil de solubilização extrato etanólico livre e extrato etanólico + $\beta$ CD, A) flavonóide e B) clorofila 374 nm e 400 nm, picos correspondentes aos cromóforos flavonóides e clorofila.....	72
<b>FIGURA 39</b>	Representação esquemática da interação de moléculas livre e na forma de complexo de inclusão com a água. Os pequenos círculos representam as moléculas de água.....	72
<b>FIGURA 40</b>	Comportamento de fluidos quanto ao cisalhamento.....	74
<b>FIGURA 41</b>	Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de $\beta$ CD ( $100 \leq \varphi \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).....	75
<b>FIGURA 42</b>	Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de Extrato puro ( $100 \leq \varphi \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).....	75
<b>FIGURA 43</b>	Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de $\beta$ CD ( $100 \leq \varphi \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).....	76

<b>FIGURA 44</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do sequestro do radical DPPH. ....	78
<b>FIGURA 45</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	80
<b>FIGURA 46</b>	Decaimento da absorbância em função do tempo para <b>A)</b> extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> , <b>B)</b> controles positivo e negativo, pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	81
<b>FIGURA 47</b>	Estrutura química básica de flavonoides e sistema de numeração para diferenciação da posição dos carbonos.....	82
<b>FIGURA 48</b>	Estrutura química da quercetina com destaque as características estruturais que determinam a atividade antioxidante dos flavonoides.....	83
<b>FIGURA 49</b>	Esquema representando as principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.....	84
<b>FIGURA 50</b>	Atividade antioxidante do EE/BCD e frações/ $\beta$ CD pelo método do sequestro do radical DPPH.....	86
<b>FIGURA 51</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações/ $\beta$ CD das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	88
<b>FIGURA 52</b>	Decaimento da absorbância em função do tempo para o extrato etanólico e frações + $\beta$ CD das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método da cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.....	89
<b>FIGURA 53</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. <b>A.</b> Diferença de massa entre as orelhas (mg), <b>B.</b> Diferença de espessura entre as orelhas (mm).....	95
<b>FIGURA 54</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> + $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. <b>A.</b> Diferença de massa entre as orelhas (mg), <b>B.</b> Diferença de espessura entre as orelhas (mm).....	96
<b>FIGURA 55</b>	Comparação do efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> na forma livre e encapsulado com $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	97
<b>FIGURA 56</b>	Efeito da base creme lanette pura e base creme lanette com $\beta$ CD. <b>A.</b> Diferença de massa entre as orelhas (mg). <b>B.</b> Diferença de espessura entre as orelhas (mm).....	98
<b>FIGURA 57</b>	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito de formulação semissólida com extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> na forma livre sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).....	100
<b>FIGURA 58</b>	Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito de formulação semissólida com extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> na forma livre e encapsulado sobre vasodilatação e infiltração de leucócitos.....	102
<b>FIGURA 59</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	107

<b>FIGURA 60</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> + $\beta$ CD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	108
<b>FIGURA 61</b>	Comparação do efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> livre com o extrato etanólico + $\beta$ CD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	109

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Dimensões geométricas das ciclodextrinas mais comuns.....	24
<b>TABELA 2</b>	Formulação de base semissólida com cera Lanette®.....	34
<b>TABELA 3</b>	Diluições das soluções estoques para o método do DPPH.....	38
<b>TABELA 4</b>	Diluições das soluções estoques para o método do poder de redução.....	40
<b>TABELA 5</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de <i>B.pinnatum</i> pelo método do sequestro do radical DPPH.....	78
<b>TABELA 6</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	79
<b>TABELA 7</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	81
<b>TABELA 8</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações + $\beta$ CD das folhas de <i>B.pinnatum</i> pelo método do sequestro do radical DPPH.....	85
<b>TABELA 9</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com $\beta$ CD pelo método do sequestro do radical DPPH.....	87
<b>TABELA 10</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações + $\beta$ CD das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	87
<b>TABELA 11</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com $\beta$ CD das folhas de <i>B.pinnatum</i> pelo método do poder de redução.....	88
<b>TABELA 12</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações + $\beta$ CD das folhas de <i>B. pinnatum</i> pelo método de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	90
<b>TABELA 13</b>	Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com $\beta$ CD das folhas de <i>B.pinnatum</i> pelo método de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	90
<b>TABELA 14</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	95
<b>TABELA 15</b>	Efeito do extrato etanólico + $\beta$ CD de <i>B. pinnatum</i> sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	96
<b>TABELA 16</b>	Efeito do extrato etanólico livre e encapsulado com $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	97
<b>TABELA 17</b>	Efeito do veículo (base lanette) e do excipiente ( $\beta$ CD) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	98
<b>TABELA 18</b>	Efeito do tratamento com formulações semissólidas com o extrato etanólico na forma livre e encapsulada com $\beta$ CD sobre o tamanho do edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	104
<b>TABELA 19</b>	Efeito do extrato etanólico de <i>B. pinnatum</i> sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	108
<b>TABELA 20</b>	Efeito do extrato etanólico + $\beta$ CD de <i>B. pinnatum</i> sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	109
<b>TABELA 21</b>	Efeito do extrato etanólico livre e encapsulado com $\beta$ CD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).....	110

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Aceleração
AA	Ácido araquidônico
ABTS• <sup>+</sup>	[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazole-6-sulfonato)]
AIES	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Fator de transcrição
$\alpha$ CD	Alfa-ciclodextrina
$\beta$ CD	Beta-ciclodextrina
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BPF	Boas Práticas de Fabricação
COX	Ciclooxigenase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva para eliminar 50% dos radicais livres presente
CCl <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	Ácido tricloroacético
CDs	Ciclodextrinas
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CEEA	Comitê de Ética na Experimentação Animal
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
Cl <sub>2</sub>	Íons cloro
<i>C<sub>d</sub></i>	Coefficiente de difusão
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
Dh	Diâmetro hidrodinâmico
DTA	Análise térmica diferencial
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DPPH-H	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
DM- $\beta$ -CD	Dimetil-betaciclodextrina
<i>d</i>	Diâmetro do copo
D	Diâmetro do cilindro

DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
DTA / $\mu\text{V}$	Potência térmica
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EE	Extrato Etanólico
ED	Edema/espessamento de derme
E.P.M.	Erro Padrão Médio
FH	Fração Hexânica
FDCM	Fração Diclorometânica
FAE	Fração em Acetato de Etila
FB	Fração Butanólica
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
$[\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}]$	Complexo férrico/ferrocianeto
$[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$	Complexo ferroso
$\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]^-$	Complexo azul prussiano de Perl
$\text{FeCl}_3$	Cloreto Férrico
IR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com transformada de Fourier
HP- $\beta$ -CD	Hidroxipropil-betaciclodextrina
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
h	Altura do cilindro
HTBA	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ITC	Calorimetria Isotérmica de Titulação
IV	Infravermelho
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
$[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Ferrocianeto de potássio
LC	Leucócitos
LPO	Lipoperoxidação

LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
LOX	Lipoxigenase
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
NS	Não significativo
NO	Óxido nítrico
NF-κB	Fator de Necrose Tumoral κB
MM	Mistura mecânica
MPO	Mieloperoxidase
-OH	Hidroxila
•OH	Radical hidroxil
PMN	Leucócitos polimorfonucleares
PKC	Proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROO•	Radical peroxil
SLCs	Sistemas de liberação controlada fármacos e correlatos
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
TRAP	Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter Assay
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TPTZ-Fe <sup>3+</sup>	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TGA	Termogravimetria
τ	Tensão de cisalhamento
TPA	13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV-Vis	Ultravioleta-visível
VD	Vasodilatação
V	Volume do copo
φ	Taxa de cisalhamento
η <sub>obs</sub>	Viscosidade aparente
%AA	Porcentagem de Atividade Antioxidante
%I	Porcentagem de inibição da peroxidação lipídica

$\%m/m_0$	Porcentagem de massa
$\eta$	Viscosidade
$\varphi$	Gradiente de velocidade
$\gamma$ CD	Gama-ciclodextrina
5-LOX	5-lipoxigenase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1	<i>BRYOPHYLLUM PINNATUM</i> (LAM.) OKEN.....	3
2.2	PLANTAS MEDICINAIS E O DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS.....	7
2.3	TERAPIA ANTIINFLAMATÓRIA E PRODUTOS NATURAIS.....	11
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PRODUTOS NATURAIS.....	13
2.5	NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS.....	19
2.6	CICLODEXTRINAS E PERSPECTIVAS DE USO COM OS EXTRATOS.....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	27
4.1.1	Material Vegetal.....	27
4.1.2	Processo de Extração e Fracionamento.....	28
4.2	INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS EM $\beta$ CD.....	28
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	29
4.3.1	Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.....	29
4.3.2	Espectroscopia eletrônica na região do IR.....	31
4.3.3	Determinação do tamanho, na ausência e na presença de $\beta$ CD, por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	32
4.3.4	Determinação da condutividade elétrica e do potencial zeta, na ausência e na presença de $\beta$ cd, por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	33
4.3.5	Análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA).....	33
4.3.6	Solubilidade dos complexos de inclusão EE/ $\beta$ CD.....	33
4.4.	INCORPORÇÃO DO EXTRATO PURO E DO EXTRATO/ $\beta$ CD EM BASE CREME LANETTE.....	34
4.4.1	Preparação da base creme lanette.....	34
4.4.2	Incorporação do extrato etanólico e do extrato etanólico/ $\beta$ CD em creme lanette.....	35
4.5	CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DAS FORMULAÇÃO EM BASE LANETTE.....	35
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES LIVRE E EXTRATO E FRAÇÕES/ $\beta$ CD.....	37
4.6.1	Método do Sequestro do radical DPPH.....	37
4.6.2	Método do Poder de Redução do Ferro.....	39
4.6.3	Método de cooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	41

4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FORMULAÇÕES COM EXTRATO ETANÓLICO LIVRE E EXTRATO ETANÓLICO/ $\beta$ CD.....	42
4.7.1	Animais.....	42
4.7.2	Avaliação da atividade antiinflamatória tópica.....	42
4.7.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO).....	43
4.7.3.1	Obtenção do sobrenadante.....	43
4.7.3.2	Dosagem de proteínas totais.....	43
4.7.3.3	Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	44
4.7.4	ANÁLISE HISTÓLOGICA.....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO: EXTRATO E FRAÇÕES/ $\beta$ CD.....	46
5.1.1.	Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis.....	47
5.1.1.1	Identificação de cromóforos majoritários.....	48
5.1.1.2	Caracterização dos compostos de inclusão.....	51
5.1.2	Espectroscopia eletrônica na região do IR.....	54
5.1.3	Diâmetro hidrodinâmico por DLS - $\langle D_h \rangle$ .....	61
5.1.4	Condutividade elétrica.....	64
5.1.5	Potencial Zeta.....	65
5.1.6	Estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA).....	68
5.1.7	Solubilização.....	71
5.2	CARACTERIZAÇÃ REOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES EM BASE LANETTE.....	73
5.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES LIVRE E EXTRATOS E FRAÇÕES/ $\beta$ CD.....	77
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FORMULAÇÕES COM EXTRATO ETANÓLICO LIVRE E EXTRATO ETANÓLICO/ $\beta$ CD.....	92
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>112</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que possui a maior biodiversidade do planeta. Isso inclui as plantas medicinais que são utilizadas como matérias-primas para a produção de fitoterápicos e outras classes de medicamentos. Esta rica biodiversidade possui uma longa aceitação de uso fundamentada no conhecimento tradicional, sendo que atualmente quase 48% dos medicamentos mundialmente empregados na terapêutica são originados direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais (CARVALHO et al., 2007; MACEDO et al., 2009).

A identificação dos componentes ativos presentes nas plantas e seus possíveis mecanismos de ação vêm sendo um dos maiores desafios para a bioquímica, toxicologia, química farmacêutica e farmacologia. Desse modo, a busca por novas moléculas com propriedades farmacológicas importantes para o tratamento de enfermidades, é uma área de interesse contínuo e crescente, tanto em pesquisas como para as indústrias farmacêuticas em todo o mundo (JÄGER et al., 2012; RUBIO-MORAGA et al., 2013).

A maioria dos fármacos é veiculada em formas farmacêuticas ditas convencionais, onde é comum o fato de não conseguirem atingir concentrações apreciáveis no sítio alvo dos organismos porque, entre o local de administração e o alvo onde deve exercer o seu efeito farmacológico, existe uma série de barreiras biológicas, as quais expõem os tecidos normais do organismo aos efeitos potencialmente tóxicos dos fármacos (DAMASCENO et al., 2011).

Nesse sentido, várias abordagens têm sido utilizadas para melhorar as propriedades terapêuticas dos medicamentos, incluindo, por exemplo, o emprego dos sistemas de liberação controlada (MENEZES et al., 2012). Nesses sistemas, as ciclodextrinas (molécula hospedeira) têm recebido destaque pela sua capacidade de formação de complexos de inclusão com os fármacos e moléculas bioativas em geral (moléculas hóspedes).

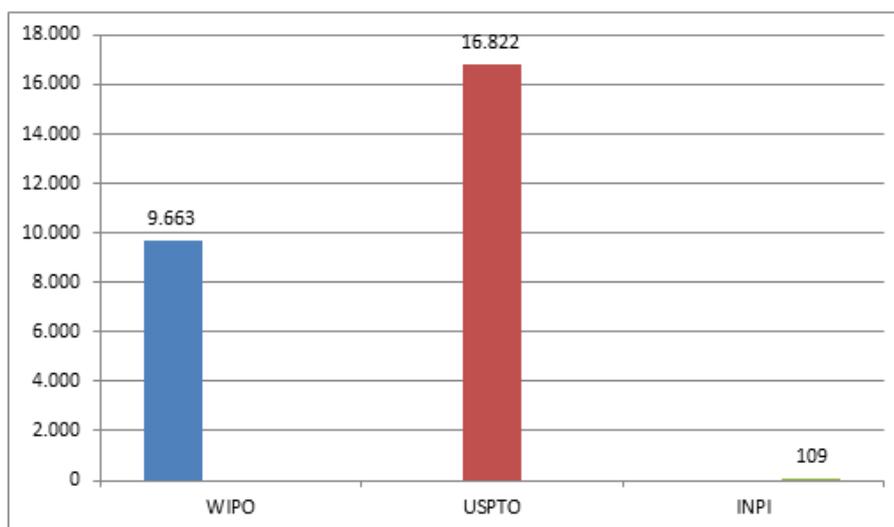
Os compostos de inclusão são geralmente preparados com a finalidade de melhorar as propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes, tais como estabilidade, solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade; modificando assim o perfil de liberação dos fármacos no meio biológico, com conseqüente redução de irritações (gástrica, dérmica ou ocular), toxicidade, e odores ou sabores desagradáveis (RASHEED, et al., 2009; WALECZEK, et al., 2003).

A utilização das ciclodextrinas em sistemas farmacêuticos é uma prática que cada vez mais vem ganhando espaço na indústria farmacêutica. As associações com ciclodextrinas já foram estudadas com 515 princípios ativos, melhorando diversas propriedades físico-químicas

através da formação de complexos de inclusão reversíveis em água. Atualmente, pelo menos 30 medicamentos comercializados no mercado mundial contém esse excipiente em suas fórmulas enquanto que centenas de patentes reivindicando o uso de ciclodextrinas nas mais diversas aplicações já foram depositadas (Figura 1) (LOFTSSON et al., 2007; NITALIKAR et al., 2012).

Além disso, a microencapsulação com  $\beta$ CD tem sido aplicada com sucesso com compostos bioativos isolados de vegetais, como alcalóides (ROCKS et al., 2012), compostos fenólicos (ZHAO et al., 2010; MONTI et al., 2011; CELIK et al., 2011; DIVAKAR et al., 1997), compostos polifenólicos (LI et al., 2011; FOLCH-CANO et al., 2013; ZHOU et al., 2013; CHAKRABORTY et al., 2010) e misturas complexas, como por exemplo extrato de folha de oliva (MOURTZINOS et al., 2007), bálsamo de própolis (KALOGEROPOULOS et al., 2009), extrato de hibisco rico em antocianina (MOURTZINOS et al., 2008), extrato enriquecido de flavonóides (KALOGEROPOULOS et al., 2010).

**Figura 1.** Número de patentes com ciclodextrinas em formulações farmacêuticas



**Fonte:** WIPO, 2014; USPTO, 2014; INPI, 2014.

Nesse sentido, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de agregar valor aos extrato/frações das folhas de *Bryophyllum pinnatum* que apresenta atividades farmacológicas comprovadas (AFZAL et al., 2012b; GUPTA et al., 2011; UMEBESE et al., 2013), destacando, ainda a importância da utilização de metodologias que melhorem as propriedades dos extratos para sua incorporação em formulações farmacêuticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *BRYOPHYLLUM PINNATUM* (LAM.) OKEN

A *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken, da família das Crassulaceae, nativa de Madagascar, ocorre subespontaneamente em variadas regiões temperadas e tropicais do planeta, como Austrália, Havaí, Nigéria, África do Sul e Brasil. Trata-se de uma espécie polimórfica, com propriedades medicinais, muito cultivada em todo o mundo, o que justifica seu grande número de sinônimos, como *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Persoon, *Bryophyllum calycinum* Salisb, *Cotyledon pinnata* (Lam.) e *Verea pinnata* (Lam.) Spreng (AFZAL et al., 2012a; SOBREIRA, 2013).

Popularmente, a *Bryophyllum pinnatum* é conhecida como: folha-da-fortuna, courona, courona-vermelha, coirama e saião-roxo (LORENZI et al., 2008). É uma planta herbácea ou sublenhosa, ereta e perene, pouco ramificada, que pode atingir de 1 a 1,5 metro de altura, sobretudo durante a floração (OKWU et al., 2011a). Possui caule avermelhado com manchas brancas quando jovem e ligeiramente colorida quando mais velha. Suas folhas são opostas, suculentas, ovaladas e de margem crenada com 10 a 20 cm de comprimento. Normalmente as folhas inferiores são simples, enquanto as superiores são compostas por 3 a 7 folíolos, longopeciouladas. Suas flores medem cerca de 5 cm de comprimento, são púrpuras avermelhadas, pendentes e dispostas em cachos. Os frutos são membranáceos e as sementes elipsoides (Figura 2) (BISWAS et al., 2011; KAMBOJ et al., 2009).

**Figura 2.** Folhas e flores de *Bryophyllum pinnatum*.



**Fonte:** [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)

*Bryophyllum pinnatum* é largamente utilizada na medicina tradicional em todo o mundo devido à ampla gama de atividades biológicas. Popularmente é usada como agente antimicrobiano (antifúngico e antibacteriano) e para o tratamento de úlceras gástricas, diarreia, vômito, queimaduras, picadas de insetos, dores no corpo e doenças inflamatórias. (GUPTA et al., 2010; OKWU et al., 2011b). No Brasil, o suco das folhas é utilizado para o tratamento local de quelite, doença periodontal, rachadura dos lábios em crianças, contusões, furúnculos e feridas; no Sri Lanka e na Índia para picadas de insetos; na Nigéria para disenteria e infecção no ouvido, na África e na Ásia em casos de febre, abscessos, tosse, doenças de pele e urinária, úlceras e artrite. Nas Guianas, as folhas são usadas para o tratamento de tosses e feridas, como inflamatórias e antissépticas (EL ABDELLAOUI et al., 2010; MILAD et al., 2014).

Várias substâncias já foram isoladas e identificadas em diferentes extratos e frações e possuem potencial farmacológico (AFZAL et al., 2012a; OKWU et al., 2011a). O estudo fitoquímico de *B. pinnatum* revelou a presença de alcalóides, flavonóides, cardenólídeos, esteróides, taninos, saponinas, bufadienólídeos e lipídeos (KAMBOJ et al., 2009; UMEBESE et al., 2013). Os extratos de clorofórmio e éter de petróleo de folhas e caules de *Bryophyllum pinnatum* mostram a presença de terpenóides e esteróides. O extrato de acetato de etila foi positivo para os testes correspondente a esteróides, terpenóides, taninos e compostos fenólicos (MAJAZ et al., 2011).

Estudos farmacológicos realizados com as folhas da *B. pinnatum* reportam atividade antidiabética (OJEWOLE, 2005), antimicrobiana (AKINPELU et al., 2000; EL ABDELLAOUI et al., 2010), anti-fúngica (UMEBESE et al., 2013), anti-hipertensiva (OJEWOLE, 2002), antiinflamatória e analgésica (AFZAL et al., 2012b; GUPTA et al., 2010), anti-úlceras (ADESANWO et al., 2007), anti-asmática (OZOLUA et al., 2010), citotóxica (EL ABDELLAOUI et al., 2010), antiurolítica (YASIR et al., 2011), antioxidante (GUPTA et al., 2011), cicatrizante (NAYAK et al., 2010), cardio-protetora (WACHTER et al., 2011), neurosedativa e relaxante muscular (YEMITAM et al., 2005), os quais algumas destas atividades estão relatadas abaixo.

- **ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA**

Vários são os trabalhos publicados demonstrando atividade anti-inflamatória de *B. pinnatum* (OJEWOLE, 2005; SOUSA et al., 2005; AFZAL et al., 2012b). Extratos/frações obtidos das folhas de *B. pinnatum* foram testados em modelos animais em que o processo inflamatório foi quimicamente induzido. Estudos com extratos/frações demonstraram

atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda de edema de pata induzida por formaldeído. O extrato metanólico foi o que apresentou maior potencial anti-inflamatório (FRIDOVICH, 1970). Em um trabalho recente, AFZAL e outros (2012a) isolaram cinco substâncias das folhas de *B. pinnatum*, sendo uma delas inédita na época, a estigmast-4,20(21),23-trien-3-ona. Em testes realizados com essa substância, um derivado esteroideal e, com extrato aquoso, constatou-se que a mesma possui atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação aguda de edema de pata induzida por carragenina. A atividade anti-inflamatória das folhas da espécie estudada pode ser atribuída a essa substância e a outros componentes químicos, como os flavonóides: quercetina, canferol, rutina e luteolina e o triterpeno  $\alpha$ -amirina (COUTINHO et al., 2009). Além dos flavonóides, vários derivados flavonoídicos tem atividade anti-inflamatória descrita em literatura como as flavonas (como a apigenina, luteolina e crisina) e a isoflavonagenisteína, que exercem o efeito anti-inflamatório devido à inibição das vias ciclooxigenase e lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, com consequente aumento da permeabilidade capilar, inibição da exsudação de proteínas e migração de leucócitos (COUTINHO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013).

- **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Os estudos que comprovam a atividade antioxidante mostram que o extrato metanólico é aquele que possui a melhor capacidade sequestrante de radicais livres (GUPTA et al., 2011). No estudo realizado por Gupta e outros (2009), o extrato metanólico obtido a partir das folhas de *B. pinnatum* apresentou atividade antioxidante expressiva (64%) quando comparada com o padrão butil hidroxitolueno (BHT). E no estudo conduzido com Majaz, et al. (2011), o extrato metanólico produziu atividade sequestrante de radicais livres de 73%, em comparação com o ácido ascórbico. Essa atividade antioxidante da espécie é atribuída principalmente aos diversos flavonóides exemplificados por quercitrina, quercetina, luteolina, rutina e canferol (CORREIA et al., 2013).

- **ATIVIDADE CICATRIZANTE**

A atividade cicatrizante do extrato etanólico de folhas de *B. pinnatum* foi testada em modelo animal através de incisão no dorso. De acordo com os pesquisadores que desenvolveram o estudo, a atividade cicatrizante exercida pelo extrato pode ser atribuída à atividade antioxidante dos compostos fenólicos. Foi destacada ainda a importância de se realizar estudos seguintes para a investigação do papel dos bufadienolídeos nesse processo,

uma classe de metabólitos encontrada na espécie, para a verificação de uma possível relação com a atividade biológica observada (NAYAK et al., 2010).

- **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Vários estudos utilizando as folhas de *B. pinnatum* foram realizados para a verificação da atividade antimicrobiana (BISWAS et al., 2011; EL ABDELLAOUI et al., 2010).

Em trabalho realizado por El Abdellaoui et al (2010) foi observada uma inibição expressiva do crescimento de microorganismos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*) do extrato metanólico das folhas de *B. pinnatum*. Resultado semelhante foi encontrado também por Akinpelu (2000), mas este não verificou a inibição das bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como, para o fungo *Candida albicans*. Biswas et al (2011) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da espécie em questão. O extrato foi mais efetivo na inibição da *Escherichia coli*, resultado que justifica o uso desta espécie na medicina tradicional contra disenteria, diarreia e outras desordens gastrointestinais.

Em outro estudo realizado por Tatsimi et al (2012), concluiu-se que a fração de acetato de etila é a mais ativa contra determinados microorganismos (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*) quando comparada com a ação das frações metanólica e hexânica. A partir da fração acetato de etila, foi isolado o flavonóide  $\alpha$ -ramnoisorobina que apresentou atividade antimicrobiana mais eficiente do que os antibióticos nistatina e ciprofloxacino. A partir do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum* foi possível isolar um alcalóide fenantrênico, o etanamino-7-Hex-1-in-5-ona fenantreno. Este metabólito promoveu inibição de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (OKWU et al., 2011b).

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS E O DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICOS

Produtos naturais, sejam eles de origem vegetal ou animal, tem sido usados desde os primórdios da humanidade visando o alívio e cura de enfermidades, sendo a ingestão de ervas e folhas uma das primeiras formas de utilização desses produtos. No desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental, em especial, no contexto das civilizações Chinesa, Egípcia e Greco-romana, são fartos os exemplos do uso de recursos naturais na medicina, no controle de pragas, como odorizantes, corantes, em técnicas de defesa bélica, além do uso como entorpecentes e calmantes (VIEGAS JR et al., 2006). Apesar do crescimento expressivo da indústria farmacêutica mundial nos séculos XIX e XX, as oportunidades para o desenvolvimento de medicamentos de origem natural emergem novamente no cenário mundial em decorrência da crescente instabilidade da indústria farmacêutica nos últimos anos, que entre outros fatores, pode ser justificado pelas novas políticas públicas relacionadas aos medicamentos que acabam pressionando a redução do preço dos medicamentos e, em parte, devido à sua própria natureza, baseada em crescimento e tecnologia rápida. Nesse novo cenário, as possibilidades foram rediscutidas e o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos seria uma das opções para a constituição da nova demanda da indústria farmacêutica mundial. Com o intuito de aumentar a eficácia e diminuir custos; novas tecnologias foram desenvolvidas para o processo de inovação desses medicamentos (VILLAS BÔAS et al., 2007).

A definição de fitoterápico não é a mesma para todos os países, dependendo das particularidades de cada legislação. Com isso os fitoterápicos podem ser classificados como medicamentos ou suplementos alimentares e podem ser constituídos por uma, duas ou mais espécies de plantas medicinais (FUKUMASU et al., 2008). No Brasil, os fitoterápicos são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como medicamentos usados para diagnóstico, cura, tratamento e prevenção de doenças ou melhora na qualidade de vida (BRUNING et al., 2012).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26/2014 da ANVISA (Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos) o medicamento fitoterápico é aquele obtido a partir de plantas medicinais, utilizando obrigatoriamente derivados de droga vegetal (extrato, óleo, cera, tintura, suco, exsudato e outros), não sendo possível o registro da planta medicinal ou de suas partes, após processo de coleta, estabilização e secagem, íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada como medicamento fitoterápico (BRASIL, 2014).

Apesar da falta de homogeneidade a nível mundial quanto à definição específica de fitoterápico, é consenso que essa classe de produtos constituem uma modalidade de terapia alternativa ou complementar em saúde, cujo uso têm sido cada vez mais expressivo (CARVALHO et al., 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008). O objetivo da introdução da fitoterapia na medicina tradicional não é substituir os medicamentos alopáticos já registrados e comercializados, mas sim aumentar as alternativas terapêuticas dos profissionais de saúde disponibilizando medicamentos equivalentes, também registrados, na maior parte das vezes mais baratos, com espectro de ação mais adequados e com indicações terapêuticas complementares às aquelas existentes (MARLIÉRE et al., 2008; ROSA et al., 2011).

O apoio para a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação baseado na biodiversidade brasileira, de acordo com as necessidades epidemiológicas da população, é um desafio de para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (MACEDO et al., 2009). O desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos envolvem várias áreas do conhecimento, como a etnobotânica, botânica, agronomia, ecologia, química, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, biotecnologia e tecnologia farmacêutica (TOLEDO et al., 2003). O desenvolvimento padronizado de fitoterápicos agrega valor tecnológico no desenvolvimento da forma farmacêutica contendo plantas medicinais, destacando-se em relação às aquelas formas farmacêuticas que contém apenas o material vegetal moído, além de garantir a qualidade e a eficácia do medicamento (KLEIN et al., 2009).

O processo de validação de um fitoterápico tem como ponto de partida as informações etnobotânicas e etnofarmacológicas, etapa relacionada com identificação do material em estudo, feita através de um levantamento bibliográfico na literatura científica e popular com foco nas propriedades químicas e farmacológicas. Através desse levantamento bibliográfico pode-se selecionar uma espécie vegetal através da pesquisa quimiotaxonômica. Paralelamente, pode-se desenvolver um estudo etnobotânico, a qual explora a observação do uso popular de plantas para fins terapêuticos nas diferentes sociedades (TOLEDO et al., 2003). Em sequência, coleta-se um espécime da planta prepara-se uma exsiccata e faz-se a identificação botânica e o registro em herbário oficial (COLEGATE et al., 2008).

A próxima etapa é a realização dos estudos botânicos que tem por objetivo a identificação das espécies, levando em consideração as características morfológicas externas e as anatômicas. Para o estabelecimento de características botânicas comparativas que possibilitem a detecção, durante o controle de qualidade, a presença de drogas ou espécies adulterantes (SIMÕES et al., 2002). Os estudos agrônômicos visam à otimização da produção de biomassa e de constituintes ativos através de estudos edafo-climáticos, de

micropropagação, inter-relações ecológicas, densidade de plantio, de melhoramento genético da espécie, além de aspectos sanitários de manejo e beneficiamento da espécie (SONAGLIO et al., 2007).

Os estudos fitoquímicos são constituídos pelas etapas de isolamento, elucidação estrutural e identificação dos constituintes vegetais, principalmente aqueles originários do metabolismo secundário, relacionados, ou não, com a ação biológica (KLEIN et al., 2009).

É de extrema importância o reconhecimento dos marcadores químicos, que são substâncias químicas características de uma determinada espécie vegetal, indispensáveis ao planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica, assim como para os estudos de estabilidade dos produtos intermediários e finais (BESSA et al., 2013).

A etapa seguinte é a avaliação da atividade biológica que inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica do extrato, frações obtidas e substâncias isoladas da droga vegetal. O conhecimento desses dados é essencial para a transformação de uma planta medicinal em medicamento fitoterápico, havendo a necessidade de estudos de desenvolvimento tecnológico, no qual a validação dos processos tecnológicos utilizados no desenvolvimento do fitoterápico exige a conservação da composição química e, principalmente, da atividade farmacológica que está sendo explorada (MACIEL et al., 2002). Nessa etapa do desenvolvimento de fitoterápicos ressalta-se a importância da avaliação do teor de substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse, produtos intermediários e produto final existentes na matéria-prima vegetal, através de testes espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos ou químicos, os quais devem ter algumas características essenciais: especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica, para que possam ser utilizados em estudos de estabilidade, permitindo até mesmo a identificação de produtos oriundos da degradação de substâncias ativas e marcadores químicos (PELOZO et al., 2008; LOPES et al., 2009).

Assim como qualquer outro medicamento, aqueles que são baseados em plantas devem comprovar sua eficácia e segurança para uso, exigindo que procedimento de controle de qualidade sejam desenvolvidos em toda a sua cadeia produtiva, desde o seu plantio até a droga vegetal ou fitoterápico pronto para comercialização. Para o controle de qualidade de tal material, não é suficiente somente o uso de metodologias químicas, é necessário também estudos de aspectos botânicos para a identificação da espécie, análise de fraudes e de contaminações grosseiras além de metodologias que permitam o desenvolvimento do controle de qualidade microbiológico, analisando a contaminação por microorganismos que são considerados patogênicos ou que podem resultar na degradação do material vegetal

diminuindo, desse modo, a sua eficácia e segurança (SOUZA-MOREIRA et al., 2010).

O registro de fitoterápicos é tratado pela legislação brasileira com a mesma seriedade aplicada à legislação dos medicamentos sintéticos. Entretanto, ainda existem muitas dificuldades para a realização do controle de qualidade e a comprovação da eficácia e segurança dos fitoterápicos devido à complexidade química dos derivados de drogas vegetais (NETTO et al., 2006).

Em 2004 o governo brasileiro através da ANVISA propôs a primeira legislação que tratava do registro dos medicamentos fitoterápicos, a RDC nº 48 de 16 de março de 2004, e com as diversas evoluções sofrida com o passar do tempo, essa resolução foi substituída pela RDC nº 26 de 13 de maio de 2014, que estabelece os requisitos necessário para a concessão do registro de tais medicamentos, os quais são baseados na garantia de sua qualidade. As avaliações abrangem a matéria-prima de origem vegetal; os derivados da droga vegetal com a determinação de um marcador químico, componente ou uma classe de compostos químicos presente na matéria-prima vegetal, preferencialmente o próprio princípio ativo e, que tenha correlação com o efeito terapêutico. A referida RDC ainda prevê em seu anexo, a possibilidade de registro para algumas plantas como medicamento fitoterápico tradicional, e que o uso estaria fundamentado na tradição popular, sem evidências, conhecidas ou informadas, de risco à saúde do usuário, sendo a eficácia validada por meio de estudos etnofarmacológicos de utilização ou outras documentações tecnocientíficas (BRASIL, 2014). Tal possibilidade não exclui a obrigatoriedade do certificado de Boas Práticas de Fabricação (BPF), que valida os processos de produção, assim como não soluciona a maior parte dos problemas de impossibilidade de registro, uma vez que uma parte dos medicamentos não se encaixa nesse perfil (KLEIN et al., 2009).

O Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006, dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006), o objetivo desse decreto é garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos, incentivando o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, aumentando as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, na ótica da integralidade da atenção à saúde, levando em conta o conhecimento tradicional sobre as plantas medicinais (BRASIL, 2007).

O referido decreto ainda incentiva o cultivo, a formação técnico-científica, a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, criar estratégias de comunicação para a

divulgação do setor de plantas medicinais e fitoterápicos. Para atingir tais objetivos, deve-se promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e organizações não-governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos (BRASIL, 2006).

### 2.3 TERAPIA ANTIINFLAMATÓRIA E PRODUTOS NATURAIS

Apesar do mecanismo de inflamação ser indispensável para manutenção da homeostase corporal, o desconforto gerado por essa resposta, em alguns casos, exige o uso de medicamentos, minimizando os danos e proporcionando mais conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios utilizados são os glicocorticóides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIES) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (RANG; DALE, 2012).

Os glicocorticóides são esteróides lipofílicos e esta classe de medicamento possui um amplo espectro de usos terapêuticos, sendo normalmente utilizado devido as suas propriedades anti-inflamatória e imunomodulatória. Estes fármacos inibem os fenômenos iniciais do processo inflamatório como a formação do edema, deposição de fibrina, migração leucocitária, atividade fagocitária e dilatação capilar. Também limita as manifestações tardias do processo inflamatório, como a proliferação fibrocapilar, acúmulo de colágeno e cicatrização (LONGUI, 2007; TREML, 2010).

Os AINES representam uma classe heterogênea de medicamentos, que na maior parte dos casos são ácidos orgânicos com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. Estes medicamentos são compostos que conseguem inibir, de maneira específica ou não, a atividade das ciclo-oxigenases (COX). Os AINES, na sua maioria, agem sobre os canais hidrofóbicos das enzimas ciclo-oxigenase 1 (COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), com conseqüente diminuição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos (CARNEIRO et al., 2014; HILÁRIO et al., 2006).

Esses medicamentos possuem ação eficaz sobre a inflamação, mas o uso prolongado destas drogas pode levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais que chegam a impossibilitar alguns tratamentos. Os efeitos colaterais relacionados ao uso de AINES também são correlacionados com o tempo de uso de tais medicamentos, em que o uso crônico pode levar ao desenvolvimento de quadros de esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal (LONGUI, 2007; HILÁRIO et al., 2006). Entretanto, a grande incidência de efeitos colaterais causados pelos AINES estimula a procura de novas alternativas terapêuticas,

através da busca de novas moléculas, mais seguras, eficazes e com menos efeitos colaterais (CARVALHO et al., 2014).

A descoberta dessas novas moléculas é relacionada principalmente com substâncias isoladas de plantas, que são utilizadas clinicamente ou então servem como protótipos para a síntese de novos fármacos. Acredita-se que 40% dos medicamentos disponíveis atualmente na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (BALUNAS et al., 2005; FABRICANT et al., 2001; NEWMAN, et al., 2007).

Um exemplo recente de desenvolvimento de novo fármaco a partir de recursos exclusivamente vegetais, é o anti-inflamatório tópico Acheflan<sup>®</sup>. É um produto oriundo de pesquisas 100% nacionais, podendo ser encontrado nas formas farmacêuticas de aerossol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno  $\alpha$ -humuleno (revistapesquisa.fapesp.br).

No que diz respeito às inflamações, as principais classes de metabólitos secundários que agem sobre esse processo são sintetizadas através da via do ácido chiquímico: fenóis simples, ácidos fenolcarboxílicos, derivados fenilpropanoídicos, cumarinas, taninos e flavonóides; além de terpenos, esteróides, saponinas, lignanas e alcalóides (COUTINHO et al., 2009). Entre esses metabólitos os flavonóides ocupam uma posição de destaque quando se trata da ação antiinflamatória. Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar a ação antiinflamatória dos flavonóides, incluindo a modulação de células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibição da proliferação de linfócitos T), inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1), modulação da atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como a fosfolipase A<sub>2</sub>, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (BENAVENTE-GARCIA et al., 2008; GARCIA-LAFUENTE et al., 2009; MOTTA et al., 2013).

Na maior parte das vezes, o uso de plantas como tratamento ocorre de maneira empírica. Como exemplo, pode-se citar o uso de 35 espécies pela população no nordeste brasileiro para processos inflamatórios e outras doenças, sendo que somente 12 delas apresentam comprovação científica através de ensaios pré-clínicos (OLIVEIRA et al., 2010).

Diante disso, vários grupos de pesquisas brasileiros vem se dedicando cada vez mais ao estudo das atividades de plantas medicinais e várias plantas utilizadas na medicina tradicional demonstraram a capacidade de inibir a resposta inflamatória tópica *in vivo*, sendo que algumas delas tiveram os compostos responsáveis por tal atividade isolados e

caracterizados, sendo portanto alternativas para o desenvolvimento de novas formulações para tratamento do processo inflamatório tópico.

#### 2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PRODUTOS NATURAIS

Espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecidas como radicais livres, são compostos produzidos pelos processos metabólicos normais em todos os organismos que utilizam o oxigênio. Tais espécies desempenham diversas funções no meio biológico e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Todavia, a produção excessiva de EROs pode superar as defesas celulares antioxidantes e levar a uma condição de desequilíbrio chamada de estresse oxidativo, em que os radicais livres dão início a reações em cadeia, podendo causar danos ou morte celular.

Os radicais livres são espécies que possuem elétrons desemparelhados e são, por esse motivo, altamente reativas, eles podem exercer duas funções distintas: agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons. A produção excessiva de radicais livres é conhecida como uma das principais causas de doenças crônicas e degenerativas como o envelhecimento precoce, doença cardíaca, inflamação, acidente vascular cerebral, diabetes mellitus e câncer; podendo provocar lesões celulares e iniciar a peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados nas membranas biológicas (AGRAWAL et al., 2011; BARREIROS et al., 2006; BAGHIANI et al., 2011, PEREIRA et a., 2009; SILVA et al., 2012; NETO et al., 2013).

Durante o processo evolutivo, os sistemas biológicos se adaptaram e desenvolveram um sistema bioquímico natural responsável pelo controle de agentes antioxidantes, o qual é composto por compostos de natureza química diversa: lipossolúveis, hidrossolúveis e enzimáticos. Entretanto, em situações críticas como hábitos de vida inadequados, como a ingestão de álcool, dieta desequilibrada e fumo; condições ambientais inapropriadas, tais como a exposição à radiação gama e ultravioleta, a poluição, a alta umidade relativa do ar e a temperatura elevada; os estados psicológicos que levam a estresse emocional, o envelhecimento, exercício físico intenso onde a produção é exagerada, se faz necessário, o uso de antioxidantes exógenos, obtidos através de uma dieta rica em antioxidantes naturais, como frutas e vegetais (DRÖGE, 2002; ELSAYED, 2001; RIBEIRO et al., 2005; DAMODARAN et al., 2010).

Desse modo, os agentes antioxidantes podem ser definidos como: “substância que,

presente em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, é capaz de regenerar ou prevenir de modo eficaz a oxidação desse substrato” (ALI et al., 2008; VICENTINO et al., 2007; LI et al., 2012; SOSA et al., 2013).

O mecanismo clássico de ação antioxidante consiste na capacidade que as substâncias possuem de neutralizar os radicais livres já formados, reagindo preferencialmente em relação a biomoléculas, impedindo que os mesmos exerçam seu efeito oxidativo. De modo geral, tem-se o seguinte mecanismo:



Onde AH representa o antioxidante e  $\text{RL}\bullet$  o radical livre (contendo elétron(s) desemparelhados),  $\text{A}\bullet$  o agente oxidante “na forma oxidada” e RLH, a espécie RLH na forma reduzida.

Essa neutralização, ou sequestro de radicais livres, pode ocorrer de diferentes formas, como através da doação de elétrons, sendo representada pela reação (1) que não abrange todos os fatores que determinam a atividade antioxidante de uma substância, dentre os quais a reatividade do antioxidante frente o radical, a estequiometria da reação, a lipossolubilidade da substância e a ocorrência de reações secundárias (LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, os antioxidantes atuam contra o estresse oxidativo através de outros mecanismos como: prevenção da formação de radicais livres e das cadeias de autooxidação, complexação de metais, atuando sinergicamente com outros agentes antioxidantes, inibindo enzimas pró-oxidantes e reparando dos danos provocados às células (LI et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2008; VALKO et al., 2007).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados nos últimos anos são o butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT). Em estudo com modelos animais observou-se que o consumo desses compostos tem levado ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, como os de próstata, mama e estômago (GUNDUC et al., 2003; SILVA et al., 2004). Isso tem levado a uma diminuição do uso de tais compostos além de incentivar a pesquisa por outras substâncias que não tenham elevado potencial tóxico, colocando em evidência o uso de produtos naturais com essa finalidade (GUNDUC et al., 2003; SILVA et al., 2004; KRISHNAIAH et al., 2011; SOUSA et al., 2014).

As classes de compostos naturais com efeito antioxidante promissor são os ácidos fenólicos, flavonóides e compostos polifenólicos (GHASEMZADEH et al., 2011). Entre os compostos de origem vegetal, o ácido ascórbico (vitamina C) é uma substância muito utilizada devido a sua reconhecida atividade antioxidante, por estar disponível para uma oxidação

energeticamente favorável. Como ele é facilmente oxidado pelo ar, este sofre a oxidação em preferência a formulação, preservando a sua qualidade. De maneira geral os compostos fenólicos apresentam a característica de serem multifuncionais como antioxidantes, visto que atuam através de diversos mecanismos, como por exemplo: 1) através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) da sua estrutura aromática, que por sua vez tem a capacidade de suportar um elétron desemparelhado no sistema  $\pi$  da molécula, levando a formação de radicais estáveis; 2) quelando os metais de transição, como o  $\text{Fe}^{+2}$  e o  $\text{Cu}^{+}$ ; 3) cessando a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica; 4) alterando o potencial redox do ambiente, através do aumento da disponibilidade de elétrons para o meio; 5) reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres, através da eliminação de danos das moléculas de DNA e reconstituição das membranas celulares atacadas (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI et al., 2008).

Dentre a classe dos flavonoides, vários tipos possuem atividade antioxidante: estilbenos (p.ex.: resveratrol); chalconas (p.ex.: naringenina-chalcona); flavanonas (p.ex.: naringenina); flavonas (p.ex.: apigenina e luteolina); flavonóis (p.ex.: canferol e quercetina); flavonoides heterosídeos (p.ex.: rutina e naringina); biflavonóides; isoflavonóides e antocianidinas (p.ex.: cianidina e sua forma 3-glicosilada); catequinas, antraquinonas e antranas (AKTUMSEK et al., 2013; BARREIROS et al., 2006; CAO et al., 1997; CORREIA et al., 2013; DEWICK, 2009; GONTIJO et al., 2012; SADIK et al., 2003; SUN et al., 2011; YEN et al., 2000).

Considerando a importância científica e tecnológica quanto ao desenvolvimento de novos agentes antioxidantes, tem sido desenvolvidos vários métodos com a finalidade de avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais ou substâncias sintéticas.

Entretanto, o mecanismo de ação, as espécies-alvo, as condições do meio reacional e a maneira como os resultados são expressos variam entre as diferentes metodologias, de modo que não existe um procedimento universal para comparação dos resultados entre os diferentes métodos (OLIVEIRA et al., 2009). Assim, para a escolha dos ensaios a serem realizados, é muito importante o conhecimento das características da amostra a ser analisada e dos fundamentos químicos e/ou biológico envolvidos no ensaio (MAGALHÃES et al., 2008; MOON et al., 2009).

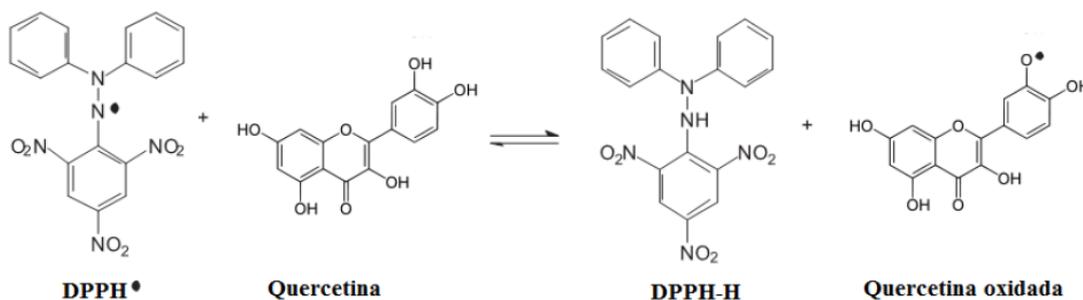
As metodologias para avaliação do potencial antioxidante podem ser agrupadas em dois grupos principais: ensaios químicos (*in vitro*) e biológicos (cultura de célula e *in vivo*). Os ensaios químicos podem ser separados em quatro tipos principais, de acordo com o mecanismo antioxidante avaliado:

- 1) Sequestro de radicais livres estáveis, como DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila) e o cátion radicalar ABTS $\bullet^+$  [2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiazole-6-sulfonato)];
- 2) Poder de redução de íons metálicos – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), como Fe $^{3+}$  e Cu $^{2+}$ ;
- 3) Métodos competitivos (utilização de sondas), como o ensaio de Índice de Potencial Antioxidante Reativo Total – TRAP (*Total Peroxyl Radical-trapping Antioxidant Parameter Assay*);
- 4) Método de inibição da oxidação lipídica, usando o ácido tiobarbitúrico (TBA) como oxidante; e ou usando o  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico como oxidante (ALVES et al., 2010; HUANG et al., 2005; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013; MOON et al., 2009).

Dos diversos métodos utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais e substâncias isoladas, o ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH $\bullet$ ) é um dos mais usados. Do ponto de vista metodológico, é um método fácil, preciso e reprodutivo de avaliação da atividade antioxidante de suco de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, como flavonóides e terpenóides (GARCIA et al., 2012; ZHANG et al., 2011; ALVES et al., 2010).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Essa deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção característica em cerca de  $\lambda = 520$  nm. Este ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância/grupo de substância em sequestrar o radical DPPH (Figura 3), reduzindo-o a hidrazina (DPPH-H). Quando uma determinada substância que age como doadora de hidrogênio radicalar é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido, o que permite o monitoramento da atividade antioxidante através de técnicas espectrofotométricas pelo decaimento da absorvância (ALVES et al., 2010; TIRZITIS et al., 2010; CLARKE et al., 2013; PYRZYNKAS et al., 2013; XIE et al., 2014).

**Figura 3.** Reação química entre o radical DPPH e a quercetina



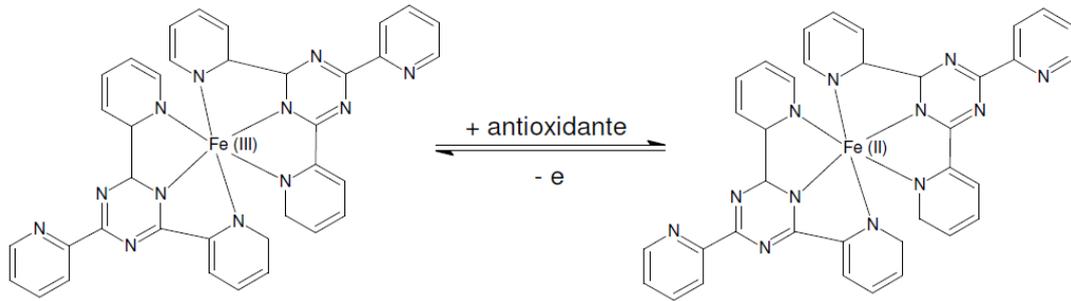
**Fonte:** ALVES et al., 2010

Outro teste antioxidante envolve o ensaio FRAP (poder antioxidante de redução de ferro) é caracterizado pela redução do complexo férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ) ao estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) pela ação de compostos antioxidantes, em meio ácido (pH ~ 3,6) para manter a solubilidade do ferro (Figura 4) (HUANG et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2008).

Oyaizu (1986) propôs um ensaio para avaliação do FRAP em que o ferro da reação é proveniente do ferrocianeto de potássio [ $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (amarelo). Nesse ensaio, a coloração amarela inicial da solução muda para diferentes tons de verde/azul, dependendo da capacidade redutora da amostra. Essa alteração na cor ocorre à medida que o complexo férrico/ferrocianeto [ $\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]<sup>3-</sup> é reduzido à forma ferrosa [ $\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]<sup>4-</sup> que, ao sofrer adição de  $\text{Fe}^{+3}$  (proveniente do  $\text{FeCl}_3$ ) dá origem ao complexo azul prussiano de Perl,  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , que possui forte absorção no comprimento de onda de 700 nm. Quanto maior o FRAP, maior será a absorbância da solução (CHUNG et al., 2002; GULÇIN et al., 2006; GULÇIN et al., 2007; PHOSRITHONG et al., 2012).

Nesse ensaio, um complexo de ferro usualmente utilizado como sonda para ensaios antioxidantes é o TPTZ- $\text{Fe}^{3+}$  (2,4,6-tripiridil-s-triazina), que é reduzido a um complexo TPTZ- $\text{Fe}^{2+}$  segundo a reação descrita na Figura 4. Segundo esta equação, quanto maior for a capacidade antioxidante da amostra, maior será a produção de TPTZ- $\text{Fe}^{2+}$ , podendo ser monitorada através da leitura da absorbância a um comprimento de onda de 593 nm. A redução do complexo férrico causa um aumento da absorbância devido à formação do complexo ferroso de cor azul intensa (HUANG et al., 2005; PRIOR et al., 2005; APAK et al., 2007).

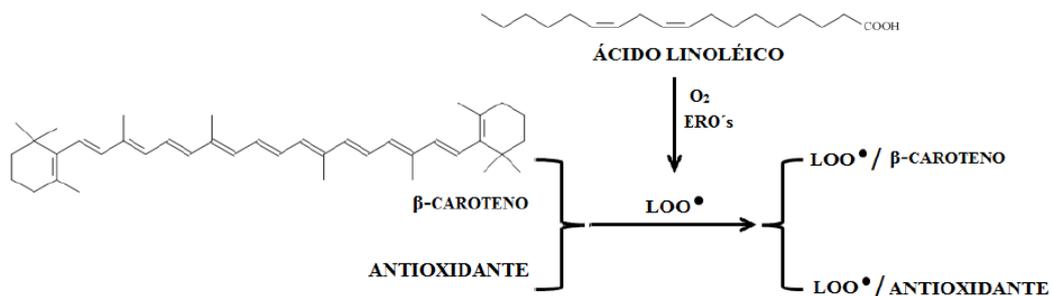
**Figura 4.** Reação de redução do complexo férrico  $[(\text{Fe}^{+3} - (\text{TPTZ})_2)^{+3}]$  para um complexo ferroso  $[(\text{Fe}^{+2} - (\text{TPTZ})_2)^{+2}]$



**Fonte:** HUANG et al., 2005

O método de avaliação da atividade antioxidante através da metodologia de cooxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é realizado em meio emulsionado, através da técnica de cooxidação de substratos. É um método colorimétrico, desenvolvido em comprimento de onda de 470 nm, baseado na leitura espectrofotométrica referente à descoloração da solução preparada com  $\beta$ -caroteno e ácido linoleico, em meio aquoso. A descoloração da solução ocorre em função das estruturas radiculares formadas pela oxidação lipídica do ácido linoléico, que atacam as duplas ligações do  $\beta$ -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado, característico da solução. A presença de compostos antioxidantes no sistema inibe a oxidação do ácido linoleico (peroxidação lipídica), inibindo a formação dos radicais livres durante esse processo (Figura 5) (ALVES et al., 2010; MOON et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

**Figura 5.** Sistema de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico na presença de um antioxidante



**Fonte:** ALVES et al., 2010

## 2.5 NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

No cenário científico recente consta um grande número de estudos e publicações relacionadas à nanotecnologia. O interesse na criação e desenvolvimento de nanopartículas é devido principalmente às propriedades físicas inexploradas, assim como as propriedades intrínsecas dos materiais que são aprimoradas principalmente com base em características específicas, como: tamanho, distribuição, morfologia, composição, cristalinidade e estrutura (ALBRECHT et al., 2006).

A nanotecnologia farmacêutica é uma área das ciências farmacêuticas envolvida no desenvolvimento, caracterização e aplicação de sistemas terapêuticos em escala nanométrica. A aplicação da nanotecnologia para o tratamento, diagnóstico, monitoramento e controle de sistemas biológicos foi designada “Nanomedicina” pelo *National Institute of Health* nos Estados Unidos (MOGHIMI et al., 2005). Estudos de tais sistemas têm sido realizados intensamente em todo o mundo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos (SAKATA et al., 2007). O limite máximo de tamanho de uma nanoestrutura frequentemente é cerca de 1000 nm, embora as nanopartículas comumente utilizadas na área farmacêutica possuam diâmetros compreendidos entre 50 e 300 nm (SCHAFFAZICK et al., 2003). Quando os materiais encontram-se na escala nanométrica os mesmos apresentam novas propriedades que acarretam em propriedades não percebidas na escala macroscópica.<sup>1</sup>

O principal efeito da redução de tamanho é o aumento da área superficial com o consequente aumento da concentração de átomos e moléculas expostos à superfície de um material. Na superfície, esses átomos e moléculas se comportam de maneira diferente dos que não estão expostos, aumentando as possibilidades de formação de interações intermoleculares com o ambiente, potencializando as forças eletrostáticas e de van der Waals (SCHMALTZ et al., 2005). Dentre as consequências desses efeitos, vale a pena citar:

- 1) Aumento da estabilidade coloidal: maior dispersão pode ser alcançada em virtude do aumento da interação com o meio e da redução da força de arraste gravitacional. Assim, a taxa de sedimentação diminui.
- 2) Maior adesão a estruturas biológicas: com um maior número de átomos expostos à superfície, há uma maior diversidade de interações e uma maior probabilidade da nanoestrutura interagir com biomoléculas e membranas.

---

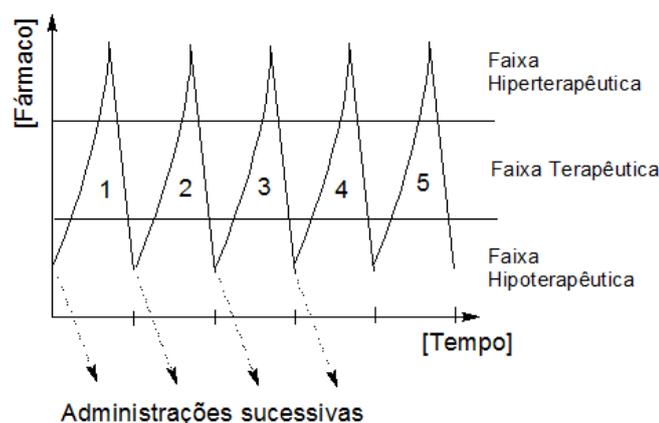
<sup>1</sup>Entende-se aqui por “escala macroscópica” sistemas cuja ordem de grandeza dos tamanhos de partículas é superior aos micrômetros. Ex: pós, cristais, grãos, corpos de prova, etc.

- 3) Redução de atrito hidrodinâmico: com a redução do tamanho de partículas, é de se esperar uma redução do atrito partícula-partícula, com uma consequente redução da viscosidade de dispersões. Tal redução facilita o processamento industrial e a difusão de materiais no meio biológico.

A nanotecnologia tem um amplo espectro de aplicações, em especial, nos sistemas de liberação controlada fármacos e correlatos (SLCs). Tais sistemas oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros métodos de administração convencionais pelo fato de permitirem a retenção de um determinado princípio ativo numa matriz de encapsulamento, levando a uma liberação lenta no local de interesse, seja no meio biológico ou meio ambiente. (SCHAFFAZICK et al., 2003)

Nas composições farmacêuticas convencionais (spray, comprimidos, injeções, cápsulas, pílulas) a biodisponibilidade de um fármaco apresenta um perfil como descrito na Figura 6. Após a 1ª administração, a concentração plasmática do fármaco aumenta, atingindo um pico máximo e então, em virtude de processos metabólicos que levam a biotransformações e excreções, sua concentração declina, e com isso o tempo de duração do efeito farmacológico é relativamente curto, sendo necessário uma nova dosagem. Desse modo, é comum que a concentração das substâncias nas formas farmacêuticas seja alta o suficiente para que sua concentração plasmática esteja na faixa hiperterapêutica, quando apresenta efeitos tóxicos. Por outro lado, baixas concentrações implicam em baixa efetividade, ou seja, o fármaco permanece na faixa hipoterapêutica.

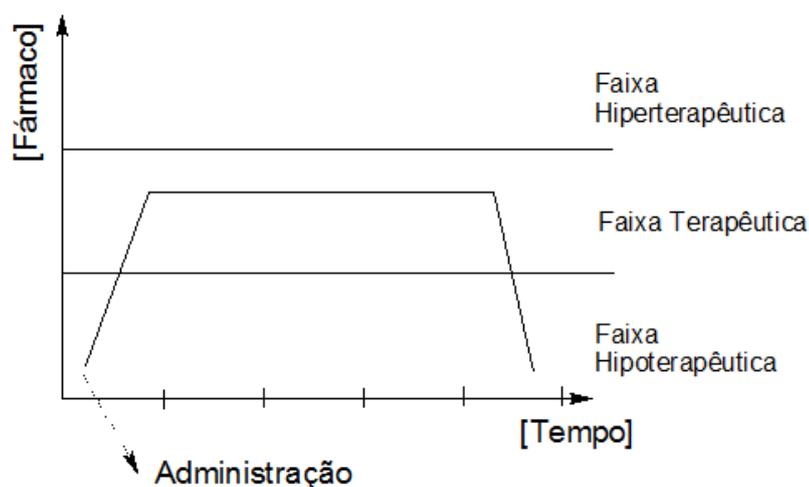
**Figura 6.** Perfil de biodisponibilidade de um fármaco convencional



**Fonte:** Adaptado, GHANDEHARI, 2014.

O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem (DASH et al., 1998). A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser melhor visualizado na Figura 7, onde, numa situação ideal, uma única administração seria suficiente para manter o princípio ativo dentro da faixa terapêutica por um máximo intervalo de tempo.

**Figura 7.** Perfil de biodisponibilidade de um fármaco a partir de um sistema de liberação controlada



**Fonte:** Adaptado, GHANDEHARI, 2014.

## 2.6 CICLODEXTRINAS E PERSPECTIVAS DE USO COM OS EXTRATOS

A pele é uma via de destaque (não invasiva) para a administração de medicamentos e correlatos não somente para terapia local, mas também para fármacos consigam desencadear efeitos sistêmicos (BONINA et al., 2001). A maior limitação dos fármacos para liberação transdérmica é a própria pele, em especial, a camada mais superficial (estrato córneo) que acaba sendo uma barreira que impede tanto a entrada de moléculas estranhas quanto a saída de substâncias endógenas (KALIA et al., 2001; MORGANTI et al., 2001; MOSER et al., 2001).

O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas tem sido a estratégia tecnológica de maior destaque para aumentar a permanência dos fármacos através da pele. A eficácia terapêutica de um fármaco aplicado na pele é diretamente correlacionada com a sua habilidade de penetração (FELIPPI, 2008).

O desenvolvimento de formulações transdérmicas é uma estratégia importante para o transporte de várias classes de fármacos, tanto os lipofílicos como os hidrofílicos,

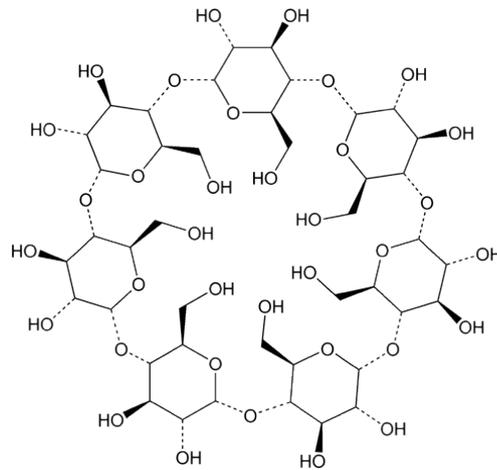
representando uma alternativa para transpor aspectos relacionados às características farmacodinâmicas e farmacocinéticas de vários medicamentos quando utilizados por outras vias de administração (TEICHMANN et al., 2007). Nesse contexto, a aplicação de nanoestruturas via cutânea é uma área muito estudada.

As nanoestruturas possuem características vantajosas para a aplicação tópica, já que o pequeno tamanho das partículas garante um contato intenso com o estrato córneo, expandindo conseqüentemente a quantidade de agente encapsulado capaz de penetrar na pele viável (JENNING et al., 2000). As nanoestruturas normalmente são obtidas em suspensão aquosa de baixa viscosidade, razão pela qual grupos de pesquisadores têm se dedicado a incorporação dessas em veículos semissólidos para que a aplicação cutânea seja favorecida (PAESE et al., 2009).

O uso das ciclodextrinas (CDs) em sistemas farmacêuticos constitui uma realidade consolidada no mercado farmacêutico. De acordo com dados estatísticos, as associações com CDs foram estudadas com 515 princípios ativos, otimizando sua biodisponibilidade, estabilidade e segurança por meio da formação de complexos de inclusão reversíveis em água (SZEJTLI, 2005). Mais de 30 medicamentos comercializados no mercado mundial possuem esse excipiente em suas fórmulas (LOFTSSON et al., 2007).

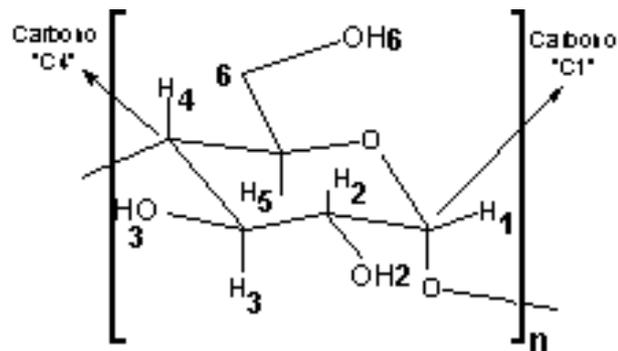
As ciclodextrinas (Figuras 8, 9 e 10) são oligossacarídeos, obtidos através da degradação enzimática do amido pela enzima ciclodextrinaglicosiltransferase, sintetizada por vários microorganismos, como o *Bacillus macerans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alcalofílico*, *B. subtilis*, *Micrococcus varians*, *M. luteus* e *Klebsiella pneumoniae* (VEIGA, et al. 2006). As mais comuns são as  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 ou 8 unidades de  $\alpha$ -D-glicopirranose.

**Figura 8.** Fórmula estrutural de uma ciclodextrina ( $\beta$ CD)



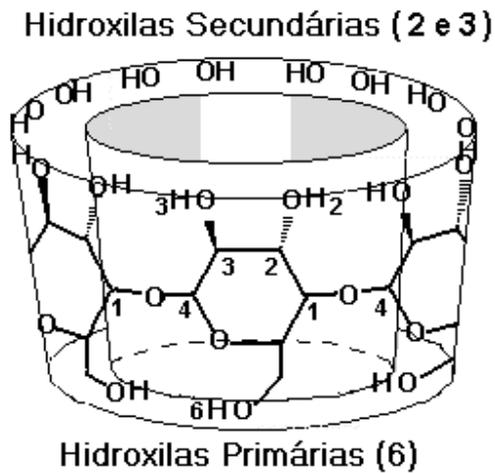
**Fonte:** PINHO et al., 2014

**Figura 9.** Fórmula estrutural de uma unidade glicosídica na conformação em cadeira



**Fonte:** PINHO et al., 2014

**Figura 10.** Estrutura da ciclodextrina na forma de um cone truncado



**Fonte:** PINHO et al., 2014

As CDs possuem estrutura quase rígida, devido à limitada flexibilidade das ligações C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>. Isto faz com que as ciclodextrinas não sejam perfeitamente cilíndricas, mas se assemelhem a um cone truncado oco com grupos hidroxilas primárias e secundários voltados para a borda externa, assegurando certa hidrofília na superfície externa, enquanto a cavidade da molécula é hidrofóbica (SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997).

Analisando a Tabela 1, pode-se observar que a altura do cone é de aproximadamente 7,9 Å para qualquer ciclodextrina, enquanto que o diâmetro da cavidade varia em função do número de unidades glicosídicas (SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997).

**Tabela 1.** Dimensões geométricas das ciclodextrinas mais comuns

CD	Nº de monômeros	Altura da molécula (Å)	Diâmetro interno da borda superior (Å)	Diâmetro externo da borda superior (Å)	Massa Molar (g/mol)	Solubilidade (mmol/L)
αCD	6	7,9	5,7	13,7	972,8	149,2
βCD	7	7,9	7,8	15,3	1135,0	16,3
γCD	8	7,9	9,5	16,9	1297,1	178,8

**Fonte:** SAENGER, 1980; THOMPSON, 1997.

De todas as ciclodextrinas, a β-CD é a mais utilizada, pois sua cavidade tem a capacidade de hospedar moléculas ou grupos de moléculas de massa molecular entre 100 e 400 g/mol, faixa molecular da maioria das moléculas de interesse. Além disso, esta ciclodextrina possui a melhor relação custo-benefício quando comparada com outras disponíveis comercialmente (NITALIKAR et al., 2012).

A complexação de um fármaco em CDs promove modificações vantajosas em suas propriedades físico-químicas, como: transformação de compostos líquidos em complexos cristalinos (permitindo a ingestão oral); inibição do sabor e odor desagradável de alguns fármacos; redução da higroscopicidade, melhora na estabilidade química (proteção contra oxidação pelo ar, fotodegradação, biodegradação); diminuição da perda por evaporação de compostos voláteis; aumento da solubilidade aquosa e da taxa de dissolução. Todos esses fatores contribuem para um aumento da biodisponibilidade dos fármacos, contribuindo assim para uma redução de efeitos colaterais e um aumento da qualidade de vida dos pacientes (RODINELLI, 2005; CUNHA-FILHO et al., 2007).

A utilização das ciclodextrinas em medicamentos é relativamente recente e por isso ainda não existe um consenso quanto ao seu papel nas formulações farmacêuticas. Atualmente ela é considerada como um excipiente, mas existem observações científicas que consideram

que as mesmas desempenham um papel importante na terapêutica farmacológica (FALCÃO et al., 2011). Todavia, as indústrias farmacêuticas detentoras das patentes e produtoras de ciclodextrinas têm investido muitos recursos na elaboração de estudos técnicos de segurança, com foco principal na administração parenteral das ciclodextrinas modificadas (CUNHA-FILHO et al., 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Diante da possibilidade de potencialização da atividade sinérgica dos componentes do extrato através da estratégia de nanoencapsulamento molecular, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de composições semissólidas, de uso tópico, contendo extrato etanólico de *Bryophyllum pinnatum* incorporados em  $\beta$ CD. Através dessa estratégia é possível aumentar a solubilidade aquosa, a capacidade de permeação o tempo de liberação, a estabilidade química e conseqüentemente, a biodisponibilidade e atividade farmacológica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar classes de constituintes dos extratos por espectroscopia na região do Ultravioleta-visível (UV-vis) e na região do Infravermelho (IR);
- Verificar a ocorrência da formação de complexos de inclusão entre os constituintes do extrato/frações da *B. pinnatum* e a  $\beta$ -ciclodextrina e caracterizar as associações obtidas;
- Comprovar o aumento da estabilidade térmica dos complexos de inclusão para o extrato etanólico através da análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA);
- Avaliar o efeito da  $\beta$ -ciclodextrina na solubilidade dos componentes do extrato etanólico;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações de *B. pinnatum* na ausência e na presença de  $\beta$ -ciclodextrina.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da formulação com o complexo de inclusão em modelo animal.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

#### 4.1.1 Material vegetal

*Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken foi coletada no Horto Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais (21° 46' 10", 46013 S e 43° 21' 49", 88313 W). A coleta do material vegetal foi realizada no período de março a maio/2014, sempre pela manhã. Uma exsicata (CESJ nº 46.575) encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

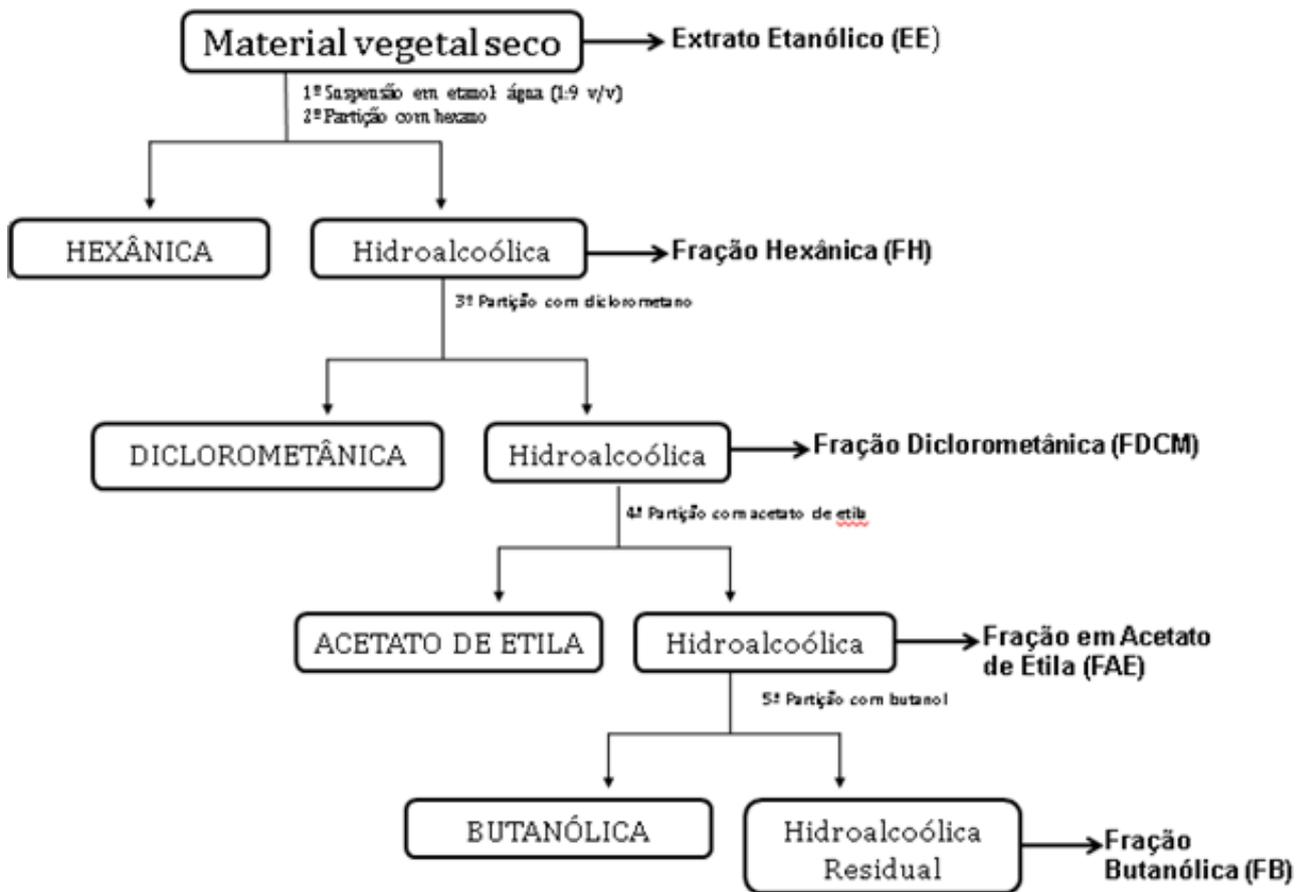
Para preparo do extrato, as folhas de *B. pinnatum* foram submetidas à secagem sob ventilação forçada até perda da umidade de 90 a 96%. Após secagem, o material foi pulverizado em moinho com granulação definida (tamise nº 20) para realização posterior de extração dos constituintes.

#### 4.1.2 Processo de extração e fracionamento

O material vegetal seco e pulverizado (droga vegetal) foi submetido à extração por maceração estática em etanol P.A., com renovação do solvente (remaceração), à temperatura ambiente, até o seu esgotamento (3 meses). O extrato foi filtrado e concentrado a pressão reduzida utilizando rota-evaporador rotatório (BUCHI®, R II) para obtenção do extrato etanólico bruto. Parte do extrato etanólico obtido ( $\approx$  50 g) foi ressuspenso em mistura etanol:água (1:9) e submetido a um processo de semipurificação ou fracionamento através de partição líquido-líquido (extração em batelada) em funil de separação, com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol (Figura 11).

Com o objetivo de extrair o máximo de constituintes a maceração é realizada com solvente(s) de propriedade extrativas menos seletivas, como misturas hidroalcoólicas, etanol ou metanol, obtendo assim extratos de constituição complexa denominados extratos brutos (FALKEBERG et al., 2003; FILHO et al., 1997). A partir do extrato bruto pode-se realizar um método sistemático de estudo, visando a semi-purificação do extrato, através do seu fracionamento, ou seja, pela separação de seus constituintes em diferentes frações com solventes de polaridade crescente (FILHO et al., 1997).

**Figura 11.** Fluxograma do processo de extração e fracionamento.



**Fonte:** O autor (2014).

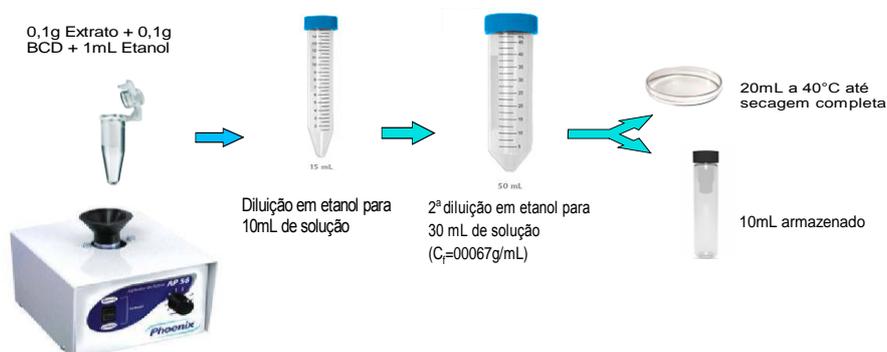
#### 4.2 INCORPORAÇÃO DOS EXTRATOS EM $\beta$ CD

O extrato etanólico (EE) e as quatro frações, sendo elas: Fração Hexânica (FH), Diclorometano (FDCM), em Acetato de Etila (FAE) e Butanólica (FB), foram submetidas ao processo de nanoencapsulamento com  $\beta$ CD segundo os procedimentos descritos abaixo (Figura 12).

Inicialmente foi pesado 0,1 g de extrato etanólico em tubo de microcentrífuga de 1,7 mL de capacidade previamente tarado. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol e sob agitação constante em vortex, adicionou-se 0,1g de  $\beta$ CD. A amostra obtida foi diluída para 10 mL de solução (etanol) obtendo-se uma concentração de 0,02 g/mL. Uma segunda diluição foi realizada adicionando-se 20 mL de etanol e submetendo a agitação em vortex. Desta forma, a concentração final foi de 0,0067 g/mL. A amostra foi dividida em duas partes. Uma parte foi transferida para uma placa de petri e submetida à temperatura próxima a 40 °C até secagem completa e a outra foi armazenada em tubos de ensaio. O mesmo procedimento foi adotado

para as demais frações. Tanto as amostras puras como incorporadas em  $\beta$ CD foram submetidas aos métodos de caracterização físico-química.

**Figura 12.** Processo de incorporação dos extratos em  $\beta$ CD.



**Fonte:** O autor (2014).

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

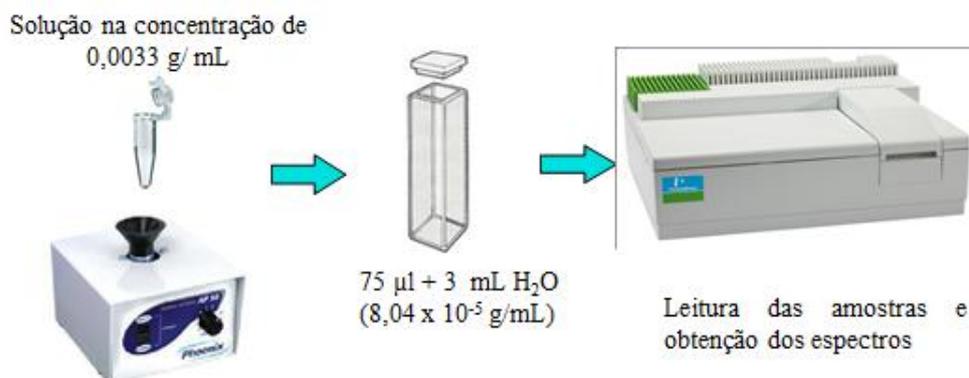
#### 4.3.1 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-Vis

A identificação das principais classes de cromóforos nas amostras, bem como a investigação das interações entre esses cromóforos com a  $\beta$ CD foram realizadas em solução aquosa por espectroscopia eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-vis). Os espectros eletrônicos do extrato etanólico e das outras quatro frações, na ausência e na presença de  $\beta$ CD, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, contendo acessório de troca automática para oito amostras, acoplado a um banho termostático peltier (20 °C – 60 °C) e gerenciado pelo software UV WinLab. Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0<sup>®</sup>.

As amostras submetidas à avaliação no espectrofotômetro UV-Visível foram preparadas da seguinte forma:

- *Solução com Extrato puro:* foram preparadas soluções do extrato puro e das quatro frações na concentração de 0,0033 g/mL em etanol. Em seguida, foi retirado 75  $\mu$ L de cada amostra (EE, FH, FDCM, FAE e FB) que foram transferidos para as respectivas cubetas e então adicionados 3 mL de água destilada de modo a se alcançar a concentração final de  $8,04 \times 10^{-5}$  g/mL. A água destilada foi usada como branco (Figura 13).

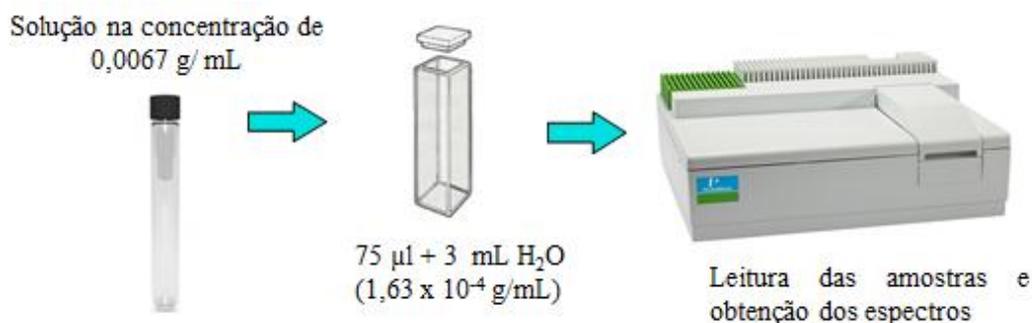
**Figura 13.** Preparação das amostras puras para leitura em espectrofotômetro UV-Vis.



**Fonte:** O autor (2014).

- *Compostos de inclusão Extrato/βCD ou Fração/βCD:* Para o preparo dessas soluções, 0,04 g dos compostos de inclusão (0,02 g de extrato + 0,02 g de βCD) foram pesados e dissolvidos previamente em etanol como descrito anteriormente, obtendo-se uma solução etanólica a uma concentração de 0,0067g/mL (1:1). De cada uma das soluções resultantes (EE/βCD; FH/βCD; FDCM./βCD, FAE/βCD e FB/βCD) foram retirados 75 µL e adicionados 3mL de água destilada em cubeta de quartzo, obtendo-se uma solução aquosa uma concentração final de 1,63 x 10<sup>-4</sup> g/mL (8,04 x 10<sup>-5</sup> g/mL de extrato ou fração + 8,04 x 10<sup>-5</sup> g/mL de βCD) Este procedimento está esquematizado na Figura 14.

**Figura 14.** Preparo das soluções dos compostos de inclusão para as leituras espectrofotométricas no UV-Vis.



**Fonte:** O autor (2014).

#### 4.3.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO IR

A identificação das principais classes de constituintes presentes nas amostras e a investigação das interações entre esses compostos com a  $\beta$ CD foram também realizadas no estado sólido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IR). Os espectros dos extratos/frações puros e com  $\beta$ CD foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho médio da Perkin Elmer, com transformada de Fourier, modelo Spectrum Two™. Os espectros foram obtidos em acessório de refletância total atenuada (ATR) da marca PIKE acoplado ao espectrômetro. Após a aplicação direta de cada amostra, pura ou combinada com  $\beta$ CD, sobre a superfície de diamante do modulo de ATR, os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de  $2\text{ cm}^{-1}$  e adquiridos em um intervalo de número de onda  $4000\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$ . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram então exportados para o Microcal Origin 8.0® para edição. Este procedimento está esquematizado na Figura 15.

**Figura 15.** Preparo das amostras para realização dos experimentos de IR.



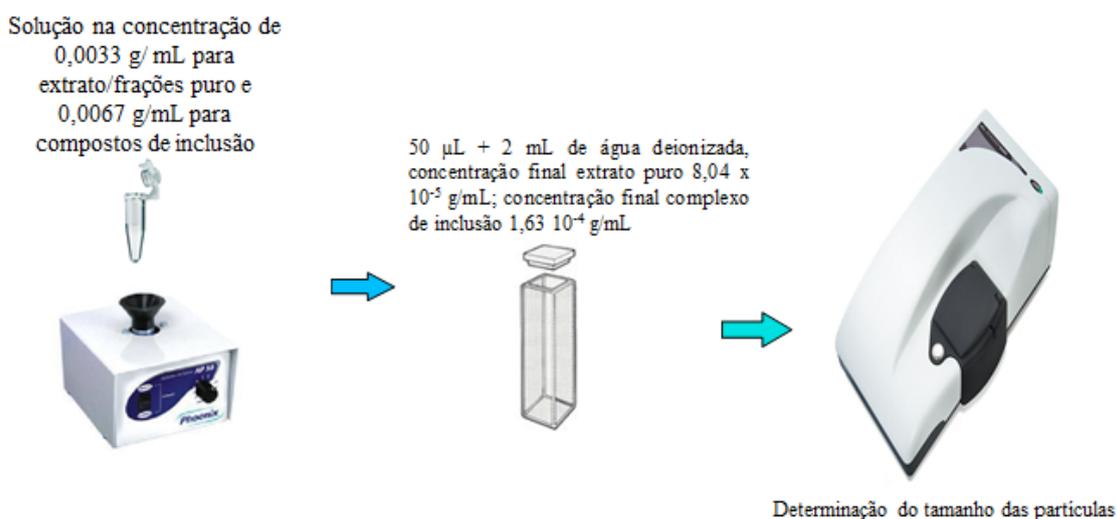
**Fonte:** O autor (2014).

#### 4.3.3 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS DISPERSÕES, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE $\beta$ CD, POR FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

O caráter nanométrico das amostras foi avaliado por medidas de tamanho de partículas (diâmetro hidrodinâmico –  $D_h$ ) por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS, Zetasizer Nano ZS90 da Malvern, a 25°C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm), com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. O Diâmetro hidrodinâmico ( $D_h$ ) foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens.

Para os experimentos, foram preparadas inicialmente soluções etanólicas a 0,0033 g/mL (no caso dos extratos puros) ou 0,0067 g/mL de composto de inclusão (extrato/ $\beta$ CD ou fração/ $\beta$ CD). 50  $\mu$ L de cada uma dessas soluções foram aplicados na cubeta de polietileno e então foi acrescentado 2 mL de água deionizada, obtendo uma solução final de extrato puro a  $8,04 \times 10^{-5}$  g/mL e solução final de composto de inclusão a  $1,63 \times 10^{-4}$  g/mL. Este procedimento está esquematizado na Figura 16.

**Figura 16.** Leitura das amostras por Fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS).



**Fonte:** O autor (2014).

#### 4.3.4 DETERMINAÇÃO DA CONDUTIVIDADE ELÉTRICA E DO POTENCIAL ZETA, NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE $\beta$ CD

A energia potencial normalizada pela carga superficial das partículas (potencial zeta) bem como a condutividade elétrica das soluções foram determinadas com a finalidade de avaliar a estabilidade coloidal das nanoestruturas. Para determinação desses parâmetros, as mesmas amostras usadas nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico foram utilizadas.

O potencial zeta das nanoestruturas foi determinado no módulo Zetasizer Nano-ZS90 através da técnica de micro-eletoforese Doppler, com ângulo de espalhamento de luz a  $173^\circ$  e DDP alternada 10 V, a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski. As amostras foram inseridas em célula capilar de polietileno DPS1060. O valor final de potencial zeta foi calculado como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada.

#### 4.3.5 ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA) E TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

Análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas em atmosfera oxidante (ar) a 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  para o EE,  $\beta$ CD, composto de inclusão (EE/ $\beta$ CD) e mistura mecânica (MM). Durante os experimentos, foram utilizado cadinhos de platina e massa aproximada de 13 mg para cada amostra.

#### 4.3.6 SOLUBILIDADE DOS COMPLEXOS DE INCLUSÃO EE/ $\beta$ CD

Para os experimentos, foram pesados 0,0005 g de EE e 0,0010 g de EE/ $\beta$ CD em cubetas de quartzo, em seguida adicionou-se 2000  $\mu\text{L}$  de tampão universal. As leituras de absorvância foram realizadas em dois comprimentos de onda, 374 nm e 400 nm, picos correspondentes aos cromóforos flavonóides e clorofila, respectivamente, por um período de 730 minutos com intervalos de 10 minutos entre cada leitura.

Os espectros eletrônicos do extrato etanólico e do complexo de inclusão para construção dos gráficos de solubilidade, foram obtidos utilizando-se um espectrofotômetro UV-vis, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 25, contendo acessório de troca automática para oito amostras, acoplado a um banho termostático peltier ( $20^\circ\text{C} - 60^\circ\text{C}$ ) e gerenciado pelo software UV WinLab. O branco utilizado foi tampão universal e todas as medidas foram realizadas à  $36,5^\circ\text{C}$ . Após a obtenção dos espectros, os dados foram transferidos e editados no programa Microcal Origin 8.0<sup>®</sup>.

#### 4.4 INCORPORAÇÃO DO EXTRATO PURO E DO EXTRATO/ $\beta$ CD EM BASE CREME LANETTE

##### 4.4.1 PREPARAÇÃO DA BASE CREME LANETTE

A formulação foi desenvolvida a partir do excipiente clássico, cera Lanette N<sup>®</sup> (cera auto-emulsionante aniônica composta por alquilssulfato e álcool cetearílico). A base foi preparada seguindo técnica usual de preparo. Os componentes da fase oleosa (fase A) e os componentes da fase aquosa (fase B) foram aquecidos separadamente em um béquer até a temperatura de 75 °C. Quando ambas as fases atingiram a temperatura de 75 °C, a fase aquosa foi vertida lentamente sob a fase oleosa, permanecendo sob agitação e aquecimento por 5 minutos. Em seguida foi retirada do aquecimento mantendo-se a agitação até a temperatura de 40°C (Tabela 2).

**Tabela 2.** Formulação de base semissólida com cera Lanette<sup>®</sup>.

<b>Fase</b>	<b>Componentes</b>	<b>Fórmula</b>
Oleosa	Cera Lanette N <sup>®</sup>	20%
Oleosa	Vaselina Líquida	6%
Oleosa	BHT	0,05%
Oleosa	Nipagin <sup>®</sup>	0,15%
Aquosa	EDTA	0,1%
Aquosa	Nipazol <sup>®</sup>	0,05%
Aquosa	Propilenoglicol	5%
Aquosa	H <sub>2</sub> O destilada	687 mL

**Fonte:** O autor (2014).

#### 4.4.2 INCORPORAÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E DO EXTRATO ETANÓLICO/ $\beta$ CD EM CREME LANETTE

Para realização dos ensaios biológicos em modelo anti-inflamatório, foi necessário a incorporação das amostras em veículo apropriado para aplicação sobre a pele dos animais (ver abaixo no item 4.7.2). Para isso, foram preparadas formulações com a incorporação do extrato etanólico nas seguintes concentrações 0,05%, 0,125% e 0,25% e extrato etanólico/ $\beta$ CD nas seguintes concentrações: 0,1%, 0,25% e 0,5%.

As concentrações dos cremes com extrato etanólico corresponderam à metade das concentrações dos cremes com extrato etanólico/ $\beta$ CD para que a concentração do extrato etanólico fosse mantida constante em ambas as formulações, já que na formulação extrato etanólico/ $\beta$ CD o complexo de inclusão foi preparado na proporção de 1:1.

Para o preparo de ambas as formulações, foi pesado o extrato etanólico puro e o extrato etanólico/ $\beta$ CD em béquer, nas três concentrações, solubilizados em um gral com propilenoglicol e foi adicionado 100 g de creme lanette em cada concentração seguida de homogeneização, obtendo então as seis dosagens para o estudo. Os cremes foram acondicionados em frascos adequado e devidamente identificados.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES EM BASE LANETTE

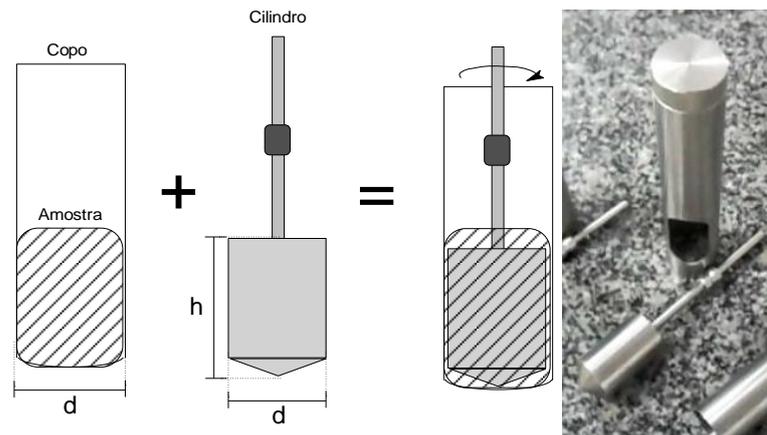
A viscosidade é uma medida direta das interações intermoleculares existentes em um material fluido. Assim, as possíveis interações entre os componentes do extrato puro e do extrato nanoencapsulado com a base lanette foram investigadas por experimentos reológicos estacionários, através da construção de curvas de fluxo (*tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento*), de viscosidade (*viscosidade x taxa de cisalhamento*) e classificação dos fluidos segundo modelos newtoniano/não-newtonianos (SCHRAMM, 2006).

O comportamento reológico das amostras de extrato e extrato/ $\beta$ CD incorporados em base lanette, além da base lanette pura e base lanette contendo  $\beta$ CD sem extrato (controles), foram avaliadas varrendo-se a tensão de cisalhamento ( $\tau$ ) em função da taxa de cisalhamento ( $\dot{\gamma}$ ), com um reômetro rotacional estacionário de taxa de cisalhamento controlada, marca ProRheo, modelo R-180.

Como sistema de amostragem, foi utilizando o padrão DIN 53 019 com as seguintes dimensões (Figura 17):

Diâmetro do copo (d):	26,03 mm
Volume do copo (V):	25 mL
Diâmetro do cilindro (d):	24,00 mm
Altura do cilindro (h):	36,00 mm

**Figura 17.** Dimensões da sonda reológica DIN 53 019.



**Fonte:** O autor (2015).

Antes dos experimentos, as amostras foram pré cisalhadas a  $\dot{\gamma} = 1000 \text{ s}^{-1}$  por 5 minutos à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  para apagar o histórico reológico. As curvas de fluxo (tensão de cisalhamento x taxa de cisalhamento) foram submetidas a uma variação cíclica de taxa de cisalhamento, no intervalo de  $100 < \dot{\gamma} < 1000 \text{ s}^{-1}$ , nos sentidos ascendente e descendente.

O controle de temperatura foi feito através da inserção da sonda DIN em um banho termostático conforme Figura 18.

**Figura 18.** Montagem do sistema reológico.



**Fonte:** O autor (2015).

A partir das curvas de fluxo, a viscosidade aparente  $\eta_{obs}$  foi automaticamente calculada pelo software interno do equipamento através da equação de Newton para a viscosidade:

$$\eta_{obs} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad \text{Equação 1}$$

Os dados foram inicialmente manipulados usando o programa RHESY e subsequentemente foram exportados para o Microcal Origin 8.0. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES LIVRE E EXTRATOS E FRAÇÕES/ $\beta$ CD

##### 4.6.1 MÉTODO DO SEQUESTRO DO RADICAL DPPH

A atividade antioxidante do extrato/frações livre e extrato/frações com  $\beta$ CD foi determinada através do método espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Sigma-Aldrich®). Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL em etanol das amostras de extrato/frações puro, 2 mg/mL em etanol das amostras de extrato/frações +  $\beta$ CD e 1 mg/mL em etanol de rutina (controle positivo) (MENSOR et al., 2001). A partir das soluções estoque, foram realizadas diluições em etanol, obtendo-se diferentes concentrações (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diluições das soluções estoques para o método do DPPH.

Tubos	Concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	EE	FH	FDCM	FAE	FB	Rutina
1	1	5	5	1	1	1
2	5	15	15	5	5	3
3	10	25	25	10	10	5
4	17,5	50	50	15	15	10
5	25	75	75	20	20	15
6	50	100	100	25	25	30
7	75	125	125	50	50	-----
8	125	150	150	75	75	-----
9	250	250	250	100	100	-----
10	500	500	500	150	150	-----
11	750	750	750	250	250	-----

EE: Extrato Etanólico; FH: Fração Hexânica; FDCM: Fração Diclorometânica; FAE: Fração em Acetato de Etila; FB: Fração Butanólica.

**Fonte:** O autor (2014).

Após as diluições das soluções estoque, alíquotas de 2,5 mL foram coletadas, em triplicata, e transferidas para tubos de ensaio seguida da adição de 1,0 mL da solução de DPPH 0,3 mM. Após 30 minutos de reação, a leitura foi realizada através de espectrofotômetro (SHIMADZU<sup>®</sup>, UV-1800) em 515 nm. O branco das amostras e da rotina foi constituído de 2,5 mL de suas respectivas soluções e 1,0 mL de etanol, sendo realizada para cada umas das concentrações utilizadas. O controle negativo foi constituído por 2,5 mL de etanol e 1,0 mL de solução de DPPH, seu branco foi composto somente por etanol.

A partir das leituras obtidas no espectrofotômetro, a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi determinada, que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelas amostras, utilizando a seguinte fórmula:

$$\%AA = 100 - \left[ \left( \frac{Abs\ amostra - Abs\ branco\ da\ amostra}{Abs\ controle - Abs\ branco\ do\ controle} \right) \times 100 \right]$$

Onde, *Abs amostra*: absorvância das amostras ou rutina para uma dada concentração; *Abs branco da amostra*: absorvância do branco ou rutina para uma dada concentração; *Abs controle*: absorvância do branco do controle negativo.

Após calcular as porcentagens de atividade antioxidante das amostras e da rutina, nas concentrações descritas na Tabela 3, os valores foram usados para montagem dos gráficos cuja abcissa corresponde à concentração da amostra/rutina e a ordenada à %AA. Através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram determinadas as equações da reta (SIGMAPLOT® 11.0), as quais foram utilizadas para o cálculo da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>), substituindo-se a variável y da equação por 50. Assim, quanto maior a redução do DPPH por uma amostra, menor será a CE<sub>50</sub> e maior será a sua atividade antioxidante.

#### 4.6.2 MÉTODO DO PODER DE REDUÇÃO DO FERRO

O poder de redução ou poder antioxidante de redução de ferro (FRAP) do extrato/frações livre e extrato/frações com βCD foi determinado pelo método do poder de redução do ferro. Foram preparadas soluções estoque a 1 mg/mL das amostras de extrato/frações puro, 2 mg/mL em etanol das amostras de extrato/frações + βCD e 1 mg/mL de rutina (controle positivo) utilizando metanol como diluente. A partir das soluções estoque, foram feitas diluições transferindo-se, em triplicata, diferentes alíquotas para tubos falcon e completando-se o volume para 1 mL com água, de modo a obter diferentes concentrações (Tabela 4). Foram adicionados, uma alíquota de 1 mL das soluções das amostras e rutina, 2,5 mL de tampão fosfato de potássio 200 μM (pH 6,6) e 2,5 mL de solução de ferrocianeto de potássio [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] 1% (Vetec®). A mistura foi incubada em estufa a 50 °C por 20 minutos. Na sequência, foram adicionados 2,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (CCl<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) 10% (Synth®) e a mistura foi submetida a centrifugação a 3000 rpm por 8 minutos. Após centrifugação, uma alíquota de 2,5 mL da camada superior da mistura foi transferida para tubo de ensaio e foram adicionados 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 0,1% (Synth®). O branco das amostras foi constituído por 1 mL de água e todos os demais reagentes, exceto as soluções das amostras e rutina (OYAIZY, 1986).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 700 nm (SHIMADZU®, UV-1800), obtendo-se as curvas de concentração *versus* absorvância. Através da análise de

regressão linear pelo método dos mínimos quadrados foram determinadas as equações da reta (SIGMAPLOT<sup>®</sup> 11.0), as quais foram utilizadas para o cálculo da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) das amostras e rutina, substituindo-se a variável  $y$  da equação por 0,5 de modo que a CE<sub>50</sub> indica a concentração efetiva na qual a absorvância foi 0,5 para o poder de redução.

**Tabela 4.** Diluições das soluções estoques para o método do poder de redução.

Tubos	Concentrações (µg/mL)					
	EE	FH	FDCM	FAE	FB	Rutina
1	25	100	100	50	100	10
2	50	200	200	100	200	25
3	100	300	300	150	300	50
4	150	400	400	200	350	75
5	200	500	500	300	400	100
6	250	600	600	400	450	125
7	300	700	700	500	500	150
8	400	800	800	-----	600	200
9	500	900	900	-----	700	250
10	600	1000	1000	-----	800	300
11	700	-----	-----	-----	900	350
12	800	-----	-----	-----	1000	400
13	900	-----	-----	-----	-----	500
14	1000	-----	-----	-----	-----	600
15	-----	-----	-----	-----	-----	700

EE: Extrato Etanólico; FH: Fração Hexânica; FDCM: Fração Diclorometânica; FAE: Fração em Acetato de Etila; FB: Fração Butanólica

**Fonte:** O autor (2014).

#### 4.6.3 MÉTODO DE COOXIDAÇÃO DO $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO

A atividade antioxidante do extrato/frações livre e extrato/frações com  $\beta$ CD foram determinadas pelo método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Foi preparado uma solução de  $\beta$ -caroteno (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) a 0,2 mg/mL em clorofórmio e, 1 mL dessa solução foi adicionado a um balão de rotaevaporação contendo ácido linoleico (25  $\mu$ L) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e Tween 40 (200 mg) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>). O balão, então, foi submetido à rotaevaporação em banho em água a 40°C, durante 15 minutos, para remoção do clorofórmio. Em seguida, 50 mL de água destilada, oxigenada por borbulhamento através de uma bomba de ar, foi adicionado ao balão lentamente sob agitação constante para formação de uma emulsão. Paralelamente, foram preparadas soluções das amostras a 250  $\mu$ g/mL para o extrato/frações livre, 500  $\mu$ g/mL para o extrato/frações com  $\beta$ CD e dos controles positivos (BHT, rutina e quercetina) a 25  $\mu$ g/mL. Alíquotas de 30  $\mu$ g/mL das soluções foram colocadas em poços de microplaca, em triplicata, seguido de 250  $\mu$ L da emulsão. Esse procedimento foi realizado rapidamente, para evitar a evaporação do etanol e a oxidação prévia do  $\beta$ -caroteno. O controle negativo foi realizado em triplicata, adicionando-se aos poços 30  $\mu$ L de etanol e 250  $\mu$ L da emulsão. O branco foi constituído de 280  $\mu$ L de etanol (KOLEVA et al., 2002).

A primeira leitura ( $t_0$ ) das absorvâncias foi feita imediatamente após a adição das alíquotas de emulsão na microplaca e, em seguida, a microplaca foi incubada por 15 minutos em estufa a 50°C. Após a incubação, foi realizada a segunda leitura ( $t_{15}$ ) e esse procedimento se repetiu por mais seis vezes obtendo-se ao final, oito leituras ( $t_0, t_{15}, t_{30}, t_{45}, t_{60}, t_{75}, t_{90}, t_{105}$ ), para monitoramento do processo de oxidação do  $\beta$ -caroteno, que resultou no clareamento e consequentemente na redução gradual da absorvância das soluções nos poços da microplaca. As medidas das absorvâncias foram realizadas em leitor de microplacas (THERMOPLATE<sup>®</sup>, TP-READER) em comprimento de onda de 492 nm. A partir das leituras obtidas das absorvâncias em  $t_0, t_{15}, t_{30}, t_{45}, t_{60}, t_{75}, t_{90}, t_{105}$ , o gráfico de decaimento da absorvância em função do tempo foi montado e foi possível a determinação da porcentagem de inibição da peroxidação lipídica (%I), utilizando a seguinte fórmula:

$$\%I = \left( \frac{A_{controle} - A_{amostra}}{A_{controle}} \right) \times 100$$

Onde,  $A_{controle} = Abs_{(t_0)} - Abs_{(t_{105})}$  e  $A_{amostra} = Abs_{(t_0)} - Abs_{(t_{105})}$ , sendo que  $A_{controle}$ , controle negativo e  $A_{amostra}$ : extrato, frações e controles positivos (BHT, rutina e quercetina).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FORMULAÇÕES COM EXTRATO ETANÓLICO LIVRE E EXTRATO ETANÓLICO/ $\beta$ CD

##### 4.7.1 ANIMAIS

Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos Swiss (25 – 30 g), machos, com 45 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* a temperatura ambiente ( $25 \pm 4$  °C). Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) desta instituição (protocolo nº 105/2012).

##### 4.7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA

A atividade antiinflamatória tópica de formulações com extrato EE e EE/ $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* foi avaliada pelo modelo de edema de orelha em camundongos. O agente flogístico óleo de Croton (Sigma-Aldrich®) foi dissolvido em um volume de 20  $\mu$ L de acetona (Synth®), os cremes lanette contendo o extrato na forma livre e o extrato nanoencapsulado foram aplicados topicamente na fase interna da orelha direita de cada camundongo. Na orelha esquerda de cada animal foram aplicados 20  $\mu$ L de acetona (veículo). Cada ensaio foi constituído por 12 grupos, todos com seis indivíduos ( $n = 6$ ): controle negativo (sem tratamento), controle negativo (base lanette), controle negativo (base lanette +  $\beta$ CD 0,05%, 0,125% e 0,25%), controle positivo (dexametasona creme), formulação com extrato etanólico em três diferentes concentrações 0,05%, 0,125% e 0,25%, formulação com extrato etanólico/ $\beta$ CD em três diferentes concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%. Para minimizar variações referentes às técnicas, os experimentos foram realizados sempre pelo mesmo experimentador.

Nos ensaios com modelos de inflamação aguda (aplicação única do agente flogístico) o edema foi avaliado quanto ao aumento da massa das orelhas (mg), aumento da espessura das orelhas (mm) e pelo método indireto de determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). Para isso, após indução do processo inflamatório e tratamentos, os animais foram sacrificados através da administração via intraperitoneal de cetamina 10% (75 mg/kg) e xilazina 2% (10 mg/kg).

A espessura das orelhas (direita e esquerda) foi medida próxima à extremidade medial com auxílio de um micrômetro externo digital (DIGIMESS®, IP40). Discos de 6 mm de diâmetro de ambas as orelhas foram coletados através de um *punch* (Richter®) e pesados em balança analítica (SHIMADZU®, AY220). O aumento da espessura da orelha foi calculado pela diferença entre o diâmetro da orelha direita e esquerda, os resultados foram expressos

como média  $\pm$  Erro Padrão Médio (E.P.M.) das diferenças dentro de cada grupo. O aumento da massa da orelha será calculado pela diferença entre a massa da orelha direita e da esquerda e os resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. das diferenças dentro de cada grupo.

A atividade anti-inflamatória tópica da formulação com extrato etanólico livre e extrato etanólico/ $\beta$ CD foi avaliada pelo método do edema de orelha induzido por óleo de cróton descrito por Schiantarelli et al (1982). Foi administrado topicamente 20 $\mu$ L de solução de óleo de cróton 2,5% (v/v) em acetona na fase interna da orelha direita de cada camundongo. Em seguida, foram administrados os tratamentos com as formulações com extrato etanólico livre em três diferentes concentrações 0,05%, 0,125% e 0,25%, e formulação com extrato etanólico/ $\beta$ CD em três diferentes concentrações 0,1%, 0,25% e 0,5%, dexametasona creme (1 mg/g) e acetona (20  $\mu$ L/orelha). Seis horas após o desafio com o agente flogístico, os animais foram sacrificados e o edema avaliado quanto ao aumento da massa (mg) e diâmetro da orelha (mm), e pela determinação da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO), de acordo com o item 4.7.3. Amostras das orelhas (discos de 6 mm) foram conservadas em formol e submetidas a análise histológica de acordo com o item 4.8.

#### 4.7.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA MIELOPEROXIDASE (MPO)

##### 4.7.3.1 Obtenção do sobrenadante

Aos fragmentos de 6 mm das orelhas dos camundongos submetidos ao teste anti-inflamatório tópico foram adicionados 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM, pH 5,4, contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTBA). Em seguida, foram triturados por 30 segundos em gral de porcelana. Os homogenatos foram transferidos para tubos de ensaio e adicionado mais 1 mL de tampão fosfato de sódio 80 mM, pH 5,4. As amostras (2 mL) ficaram em banho de gelo a 4 °C e foram sonicadas em ultrassom por 10 minutos seguida de centrifugação a 3.000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado na dosagem de proteínas totais e nos ensaios da atividade enzimática de MPO (DE YOUNG et al., 1989; SANCHEZ et al., 1999).

##### 4.7.3.2 Dosagem de proteínas totais

O método utilizado para dosagem de proteínas foi descrito inicialmente por Lowry et al (1951), modificado por Sargent et al (1987). O ensaio foi realizado em triplicata, colocando-se 20  $\mu$ L do sobrenadante, obtido do homogenato através da trituração dos fragmentos das orelhas dos camundongos submetidos à avaliação da atividade

antiinflamatória, em cada tubo de ensaio. Em seguida, foi feita a adição de 380 mL de água destilada, 2 mL da mistura reativa composta por 120 mL de: solução alcalina (1 g de NaOH mais 5 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 250 mL de água), 2 mL de tartarato de cobre e 2 mL de sulfato de cobre. Após adicionar 2 mL de solução reativa, aguardou-se um intervalo de 10 minutos cronometrados quando foi acrescentado 200 µL de solução Folin (1:5). Após 30 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu®, modelo 1800, em comprimento de onda 660 nm, zerando o branco com água destilada (LOWRY et al., 1951; SARGENT et al., 1987).

#### **4.7.3.3 Ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)**

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) é utilizada como indicativo da presença de leucócitos polimorfonucleares no tecido. Para a avaliação da atividade da enzima foi utilizada a metodologia de Bradley et al. (1982) modificada por De Young et al (1989). Triplicatas de 25 µL do sobrenadante obtido do homogenato realizado anteriormente através da trituração dos fragmentos das orelhas dos camundongos submetidos à avaliação da atividade antiinflamatória, foram colocadas em placas de 96 poços, adicionando 25 µL de 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina 1,6 mM em dimetilsulfóxido (DMSO), 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003% v/v diluída em tampão fosfato de sódio 0,08 mol/L (pH 5,4), para promover o início da reação. Posteriormente a placa foi incubada a 37 °C por 5 minutos, adicionando 100 µL de ácido sulfúrico 4 mol/L a 4 °C em cada poço para interromper a reação. A atividade enzimática foi determinada colorimetricamente usando o leitor de placas Thermoplate TR-Reader®, cuja leitura de absorbância foi feita a 450 nm, sendo expressa em densidade óptica/mg de proteínas (dO/mg de proteínas) (BRADLEY et al., 1982; DE YOUNG, 1989).

#### **4.7.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA**

Para a análise histológica sob microscopia óptica é necessária à confecção de lâminas delgadas dos tecidos que formam os órgãos. Inicialmente é necessário fazer a fixação dos tecidos coletados, para imobilizar as substâncias constituintes das células e dos tecidos, além de fornecer resistência para as etapas seguintes. Na desidratação é feita a retirada de água dos tecidos e substituição por álcool, viabilizando o processo de impregnação em parafina para a produção das lâminas (JUNQUEIRA, 2013). Para o preparo das lâminas histológicas, as amostras foram fixadas em solução ALFAC (85 mL de álcool 80%, 10 mL de formol 40% e 5 mL de ácido acético glacial) em um período de 16 horas, e conservadas em álcool 70% até o

início do processo de desidratação. As orelhas foram posteriormente desidratadas, emblocadas em parafina, seccionadas em cortes de 5  $\mu\text{m}$  em um micrótomo e coradas com hematoxilina e eosina. O edema (espessura do corte histológico), infiltração de leucócitos e vasodilatação foram os parâmetros da inflamação avaliada em áreas representativas com aumento de 100x e 200x. Nesses mesmos aumentos, foram realizadas fotografias dos cortes histológicos utilizando microscópio acoplado a câmera fotográfica digital (OLYMPUS<sup>®</sup>, BX-41).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA DOS COMPOSTOS DE INCLUSÃO: EXTRATO E FRAÇÕES/ $\beta$ CD

As ciclodextrinas possuem em sua cavidade, grupos C-H que lhes conferem caráter parcialmente hidrofóbico. Assim, moléculas de tamanho e polaridade adequados podem penetrar nesta região, estabelecendo interações de van der Waals e formando os compostos de inclusão moleculares (LOFTSSON et al., 1996; SZETJLI, 1998).

No ambiente aquoso, a formação desses compostos é facilitada pela remoção das moléculas de água do interior da cavidade que contribuem entalpicamente e entropicamente para a espontaneidade do processo. Isso porque essas moléculas de água inicialmente confinadas não satisfazem completamente o potencial de formação de ligações de hidrogênio. Quando liberadas, elas passam a fazer ligações de hidrogênio estáveis com as moléculas de água do meio, produzindo, geralmente, valores exotérmicos de entalpia ( $\Delta H < 0$ ). Essas moléculas, por sua vez, ganham liberdade conformacional e translacional, contribuindo para o aumento da entropia do processo (BREWSTER et al., 2007; DENADAI et al., 2007; SINGH et al., 2010).

Compostos de inclusão quando isolados, apresentam propriedades físico-químicas diferentes daquelas apresentadas quando estão complexados; a molécula hóspede sofre mudanças significativas nas suas propriedades físico-químicas quando é incorporada à cavidade da ciclodextrina e, por esse motivo, é fundamental a caracterização do material obtido, com o objetivo de confirmar a formação do complexo e determinar suas propriedades (SINGH et al., 2010).

Para se realizar tais estudos, são geralmente utilizadas técnicas analíticas tanto em solução quanto no estado sólido. Grande parte das caracterizações dos complexos de inclusão são desenvolvidos com o emprego de ferramentas espectroscópicas tanto em solução quanto no estado sólido, como por exemplo, UV-Vis, IR, Fluorescência e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (FRANCO et al., 2009; MILLER, et al., 2007); e métodos térmicos ou termodinâmicos como análises termogravimétricas (TGA, estado sólido), calorimetria diferencial exploratória (DSC, estado sólido) e calorimetria isotérmica de titulação (ITC, solução). Métodos fotométricos como difratometria de raios X são geralmente úteis quando ocorre a formação de cristais, enquanto que espectroscopia de dicroísmo circular geralmente são utilizadas com amostras quirais que sofrem mudanças conformacionais durante a inclusão (em solução). (CANNAVÁ et al., 2008; LU et al., 2009, VENTURINE et al., 2008).

### 5.1.1 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA NA REGIÃO DO UV-Vis

A espectrofotometria eletrônica na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é um método analítico que se fundamenta na interação entre a energia da radiação eletromagnética na região do UV-Vis com a matéria condensada, através do fenômeno de absorção.

Por se tratar de radiações UV ou visível, as energias envolvidas nas absorções são da ordem de  $1 \text{ eV} = 8000 \text{ cm}^{-1} = 100 \text{ kJ/mol}$ . Essa quantidade de energia absorvida por um sistema molecular é capaz de provocar transferência de elétrons de orbitais de menor energia para orbitais de maior energia. Além disso, como os orbitais eletrônicos do estado excitado geralmente possuem uma simetria diferente dos orbitais dos estados fundamentais, observa-se que essas transições estão associadas a uma alteração da distribuição de cargas das moléculas. (SILVERSTEIN et al., 2006).

Na prática, é uma técnica limitada a sistemas orgânicos conjugados, contendo átomos com elétrons não ligantes e sistemas inorgânicos contendo orbitais “d” e “f” semipreenchidos.

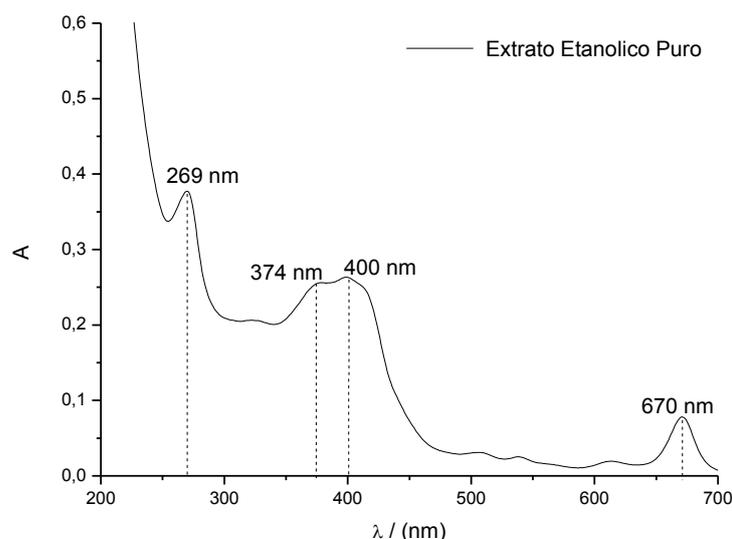
Como a absorção da radiação UV-vis normalmente resulta da excitação de elétrons de ligação, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo. A espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis é, então, uma importante ferramenta analítica para a identificação de grupos funcionais em uma molécula, permitindo, portanto a análise quantitativa e qualitativa de compostos contendo grupos cromóforos (SKOOG, 2007).

No estudo dos complexos supramoleculares formados por CDs e moléculas hóspedes, a espectrofotometria de UV-vis foi uma das primeiras ferramentas utilizadas para tal caracterização, principalmente pela sua capacidade de fornecer informações sobre as mudanças na distribuição eletrônica (desvios batocrômicos ou hipsocrômicos) e/ou no momento de dipolo de moléculas (desvios hipercrômicos ou hipocrômicos) (DEFAYE et al., 2007; SZEJTLI, 1998).

### 5.1.1.1 Identificação de cromóforos majoritários

O espectro eletrônico de UV-vis do extrato etanólico de *Bryophyllum pinnatum* é mostrado na Figura 19, podendo ser observadas a presença de pelo menos quatro bandas principais, sendo que as de 374 e 400 nm estão sobrepostas.

**Figura 19.** Espectro eletrônico do extrato etanólico puro.

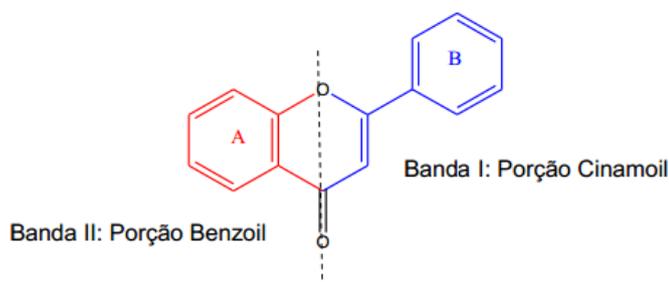


**Fonte:** O autor (2014).

Comparando as bandas do espectro da Figura 19 com dados da literatura, foi possível constatar a presença de pelo menos duas classes de substâncias: flavonóides e clorofilas como cromóforos majoritários (CORNARD, 2002; KRAWCZYK et. al., 1989).

Os flavonóides e os compostos fenólicos em geral, possuem grupos aromáticos no seu núcleo básico, na maior parte das vezes conjugados e, por isso apresentam um espectro UV bem característico (RIJEK et al., 2006). Dados de literatura mostram que especificamente em relação ao espectro UV-Vis dos flavonóides, é observado duas zonas de absorção máxima. A banda II encontra-se geralmente entre 240 e 280 nm e corresponde à absorção do grupo benzoila (anel A, Figura 20). Já a banda I apresenta absorções entre 300 e 400 nm, correspondendo ao grupo cinamoila (anel B, Figura 20) (ALONSO-SALCES et al., 2004; NEVES, et al., 2009; STALIKAS, 2007).

**Figura 20.** Esquema do flavonoide e suas porções que geram as bandas de absorção características no UV.



**Fonte:** ALONSO-SALCES et al., 2004.

As clorofilas, por sua vez, são os pigmentos mais abundantes da natureza, cujo principal papel é a absorção de energia luminosa e posterior conversão em energia química no processo de fotossíntese. Dos diversos tipos de clorofila, as clorofilas A e B são as mais abundantes no reino vegetal, sendo que a clorofila-A corresponde a aproximadamente 75% dos pigmentos verdes totais, enquanto que a clorofila-B é um pigmento suplementar, geralmente encontrado na razão aproximada de 3:1. A clorofila-A é uma clorina metalada com um íon  $Mg^{+2}$  que contém uma cadeia alifática anexa ao anel porfirínico. A presença desta cadeia longa e apolar confere uma alta hidrofobicidade à molécula, tornando-as geralmente insolúveis em meio aquoso (CETESB, 2014; UCHOA-FERNANDES, 2007).

As moléculas de clorofila-A não são moléculas muito estáveis e, dependendo das condições do meio, tais como temperatura, luminosidade excessiva e alterações de pH, elas podem sofrer degradação, originando produtos conhecidos como feopigmentos. A feofitina-A, produto da degradação da clorofila-A, interfere diretamente na identificação da clorofila-A por espectroscopia de UV-Vis, já que absorve luz na mesma região do espectro que a clorofila-A (AGUIAR, 2013).

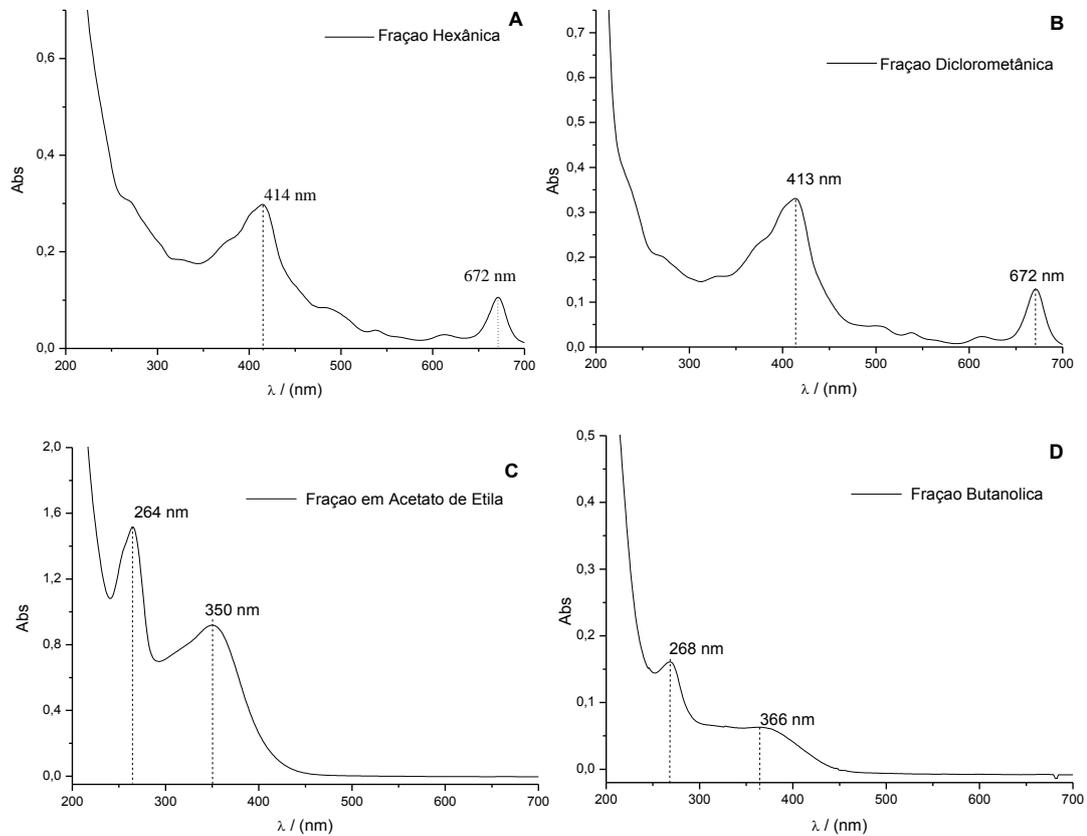
Nos espectros eletrônicos da clorofila-A, observa-se geralmente a presença de duas bandas intensas, sendo a primeira, de absorção entre 400 a 420 nm, característica de um derivado do tipo porfirina/clorina (banda Soret); e uma segunda banda a 668 nm, típica de derivados de clorofila (banda Q) (AGUIAR, 2013).

Estruturalmente a diferença entre a molécula de clorofila-A e feofitina-A, é o fato de que na segunda, o íon metálico  $Mg^{+2}$  é substituído por dois átomos de hidrogênio, levando a uma ligeira alteração do espectro. Assim, a diferenciação das duas moléculas se faz pela análise mais precisa da posição das bandas. Tanto a clorofila-A como a feofitina-A possuem alta absorção na região de 668 nm, sendo que para a feofitina ela é menos intensa. Na região de 400 a 420 nm, a feofitina-A apresenta máximo em 410 nm, enquanto que a clorifila-A

apresenta máximo em 420 nm (CARVALHO, 2012).

Analisando os espectros com base nas informações acima apresentadas, percebe-se tanto no extrato etanólico quanto nas frações em acetato de etila e butanólica, a presença das duas bandas de absorção nas faixas de 260 nm e 340 nm (bandas II e I), confirmando a presença de flavonóides. Já nos espectros de UV-Vis das frações hexânicas e de diclorometano, é clara a presença das bandas de absorção em 412 nm e 670 nm, característica de clorofilas (Figura 21).

**Figura 21.** Espectros eletrônicos das frações: A) hexânica, B) diclorometânica, C) em acetato de etila e D) butanólica livre..



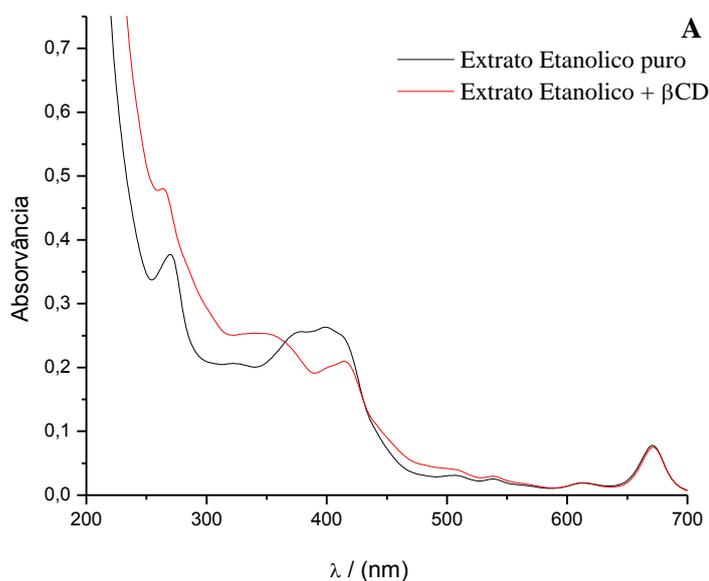
**Fonte:** O autor (2014).

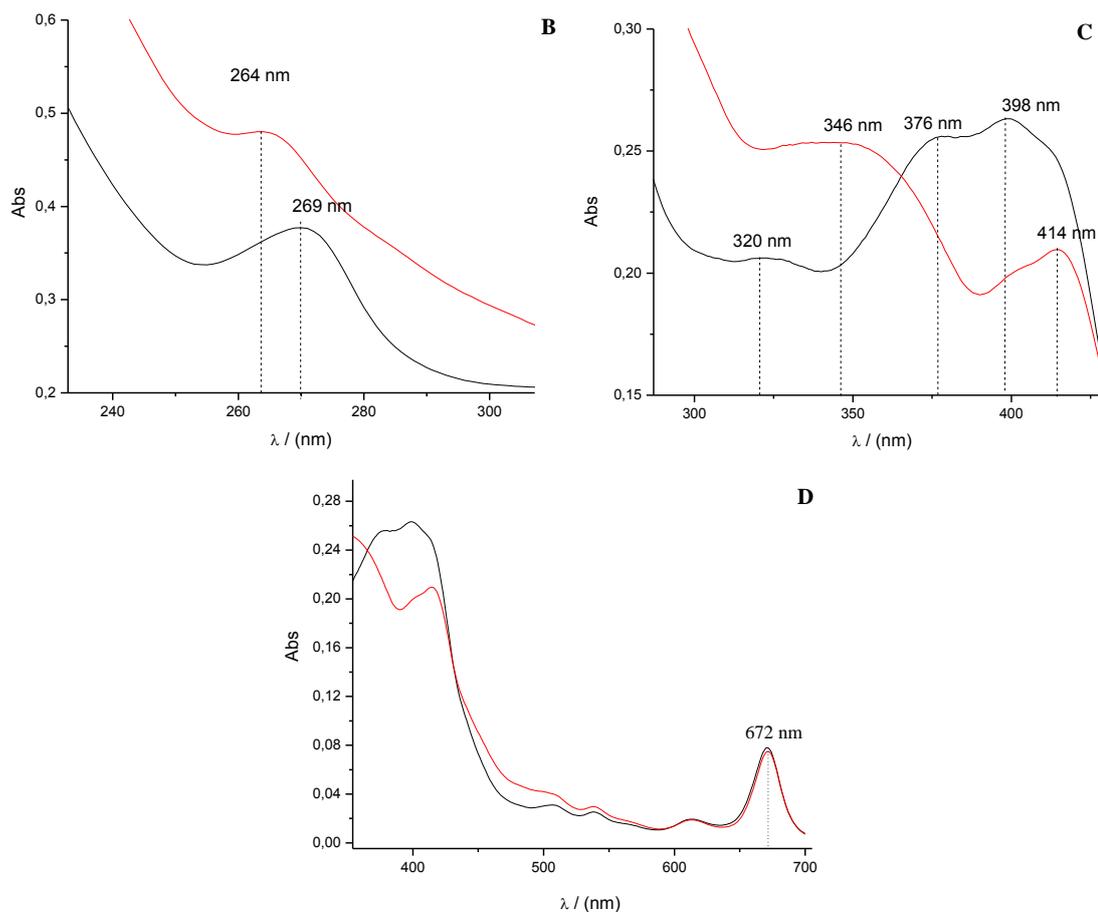
### 5.1.1.2 Caracterização dos compostos de inclusão

A avaliação das interações intermoleculares entre a  $\beta$ CD e os componentes dos extratos foi feita por comparação entre as bandas dos espectros das espécies puras e nanoencapsuladas, utilizando-se a mesma concentração de extrato nas amostras com e sem  $\beta$ CD. De acordo com a análise dos espectros de UV-Vis da fração etanólica na presença de  $\beta$ -ciclodextrina, importantes alterações podem ser observadas (Figura 22):

- Deslocamento hipsocrômico da banda II: 269 nm  $\rightarrow$  264 nm.
- Deslocamento hiperacrômico da banda II: Abs = 0,38  $\rightarrow$  0,48.
- Separação do envelope de bandas de máximos a 376 nm e 398 nm em bandas a 346 nm e 414 nm.
- Deslocamento hipocrômico das bandas compreendidas entre  $\approx$  370 a 420 nm
- Praticamente não houve mudança na banda a 672 nm, referente à feofitina-A.

**Figura 22.** Espectros eletrônicos de UV-vis do extrato etanólico e extrato etanólico na presença de  $\beta$ CD. A) Espectro completo. B), C) e D) diferentes regiões.





**Fonte:** O autor (2014).

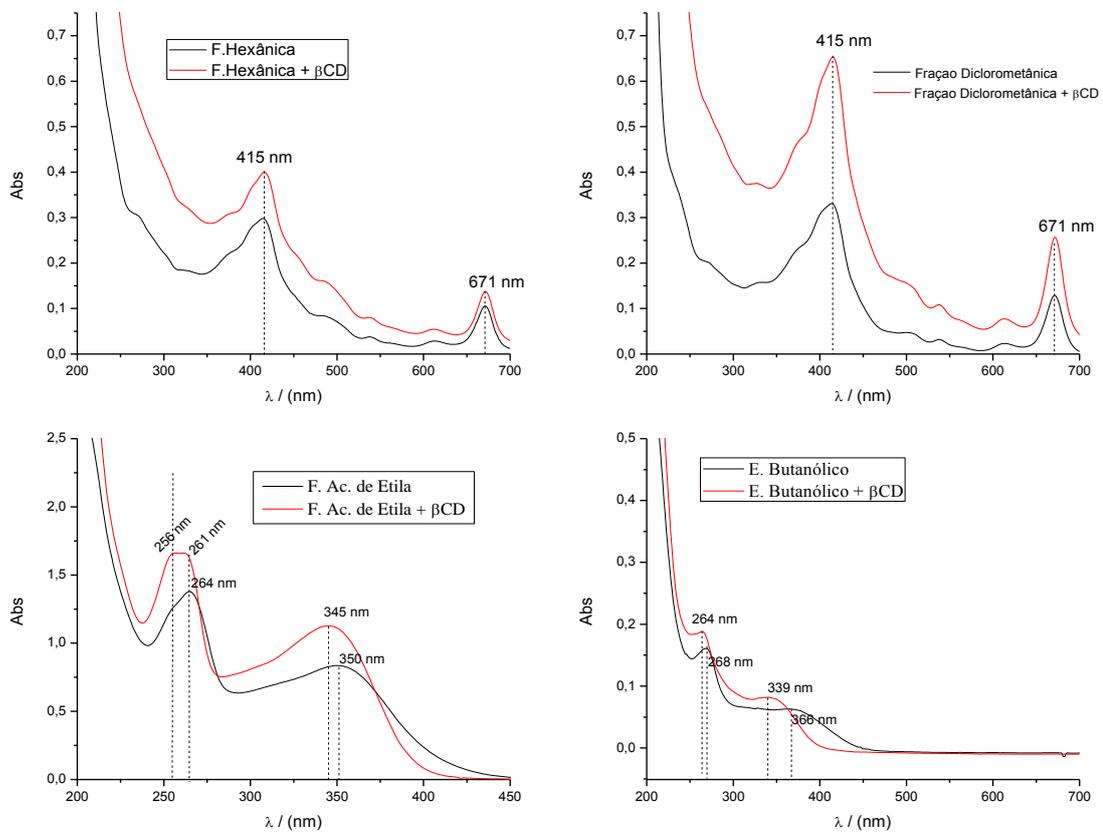
Quando exposto ao ambiente hidrofóbico das ciclodextrinas, os constituintes químicos presentes nos extrato/frações extraídos das folhas de *Bryophyllum Pinnatum* apresentaram alterações nos seus respectivos espectros UV-Vis, evidenciando desse modo a inserção desses constituintes na cavidade das moléculas de  $\beta$ -ciclodextrina. Tais alterações nos espectros podem ser explicadas por dois fatores principais: I) possível proteção dos elétrons excitáveis, ocasionada pelas interações intermoleculares entre os grupos cromóforos do substrato e os pares de elétrons não ligantes dos grupos C-O-C da cavidade da  $\beta$ CD e II) mudança de ambiente químico dos componentes do extrato, do solvente polar (água) para a cavidade pouco polar da  $\beta$ CD (SINGH et al., 2010; ZIA et al., 2001).

A Figura 23 mostra os espectros de UV-vis das frações na ausência e na presença de  $\beta$ CD. Como pode ser observado, as frações acetato de etila e butanólica apresentaram mudanças bastante significativas nos espectros, com deslocamentos hipsocrômicos similares ao observado para o extrato etanólico, além de deslocamentos hiper-crômicos e um possível desdobramento da banda II em dois máximos (256 e 261 nm). Já nos espectros das frações

hexânica e diclorometânica, observa-se apenas desvios hipercrômicos, sugerindo seletiva das interações pelos flavonoides.

Considerando que as frações acetato de etila e butanólica apresentaram as alterações mais expressivas, e sabendo que essas duas frações são ricas em flavonóides, supõe-se que as ciclodextrinas apresentaram seletividade por essas moléculas frente às clorofilas.

**Figura 23.** Comparação entre os espectros de UV-Vis das diversas frações, na ausência e na presença de  $\beta$ CD.



**Fonte:** O autor (2014).

### 5.1.2 ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL NA REGIÃO DO IR

Dentre as técnicas utilizadas na caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido, a espectroscopia vibracional na região do infravermelho, com transformada de Fourier (IR) é uma das mais utilizadas. A caracterização dos complexos de inclusão também é feita através da comparação dos espectros de obtidos da molécula hóspede pura e dos complexos de inclusão obtido, sendo no presente estudo, uma ferramenta complementar à espectroscopia de UV-vis. (CORTI et al, 2007; AALTONEN et al., 2008; ARRAIS, 2012).

A radiação na região do infravermelho possui maior comprimento de onda, apresentando conseqüentemente menor energia. Quando esse tipo de radiação interage com moléculas orgânicas, é suficiente apenas para causar alterações em modos vibracionais e rotacionais das moléculas. Para que determinada vibração resulte em absorção da radiação na região do infravermelho, é necessário que esta seja intensa o suficiente para provocar uma alteração no momento dipolo das ligações, permitindo assim medir diferentes tipos de vibrações entre os átomos de acordo com as suas ligações interatômicas. (BARBOSA, 2011).

O objetivo da espectroscopia de absorção no IV é a determinação dos principais grupos funcionais de um determinado material. Cada grupo absorve em uma frequência característica de radiação na região do IV. Assim, através da análise do espectro obtido, é possível caracterizar os grupos funcionais de um padrão ou de um material desconhecido. Além da caracterização de compostos orgânicos, através da técnica de infravermelho é possível ainda verificar se ocorreu a complexação entre a molécula hóspede e a  $\beta$ -ciclodextrina, pois as bandas responsáveis pela parte da molécula incluída normalmente são deslocadas ou têm alteradas suas intensidades (ZANG et al., 2009).

Os espectros de IR da  $\beta$ CD, do extrato etanólico (EE), fração hexânica (FH), fração diclometânica (FDCM), fração em acetato de etila (FAE), fração butanólica (FB) e dos seus respectivos complexos de inclusão são apresentados nas Figuras de 24-28.

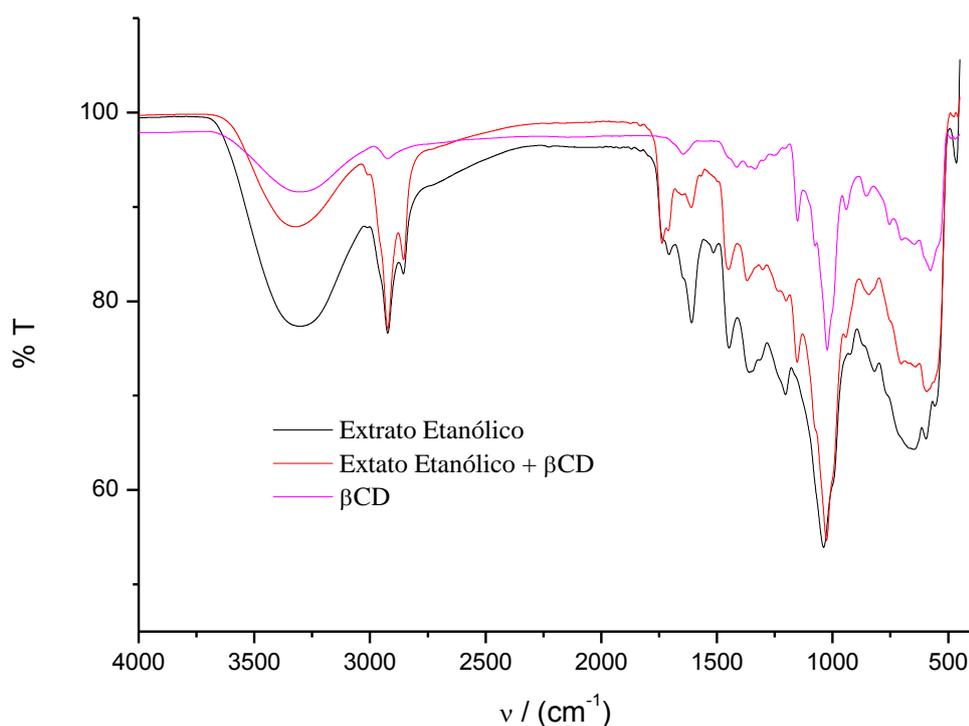
Conforme pode ser observado, em todos os espectros observa-se desvios e alteração de intensidade de várias bandas quando se compara o espectro dos complexos de inclusão com a sua respectiva fração.

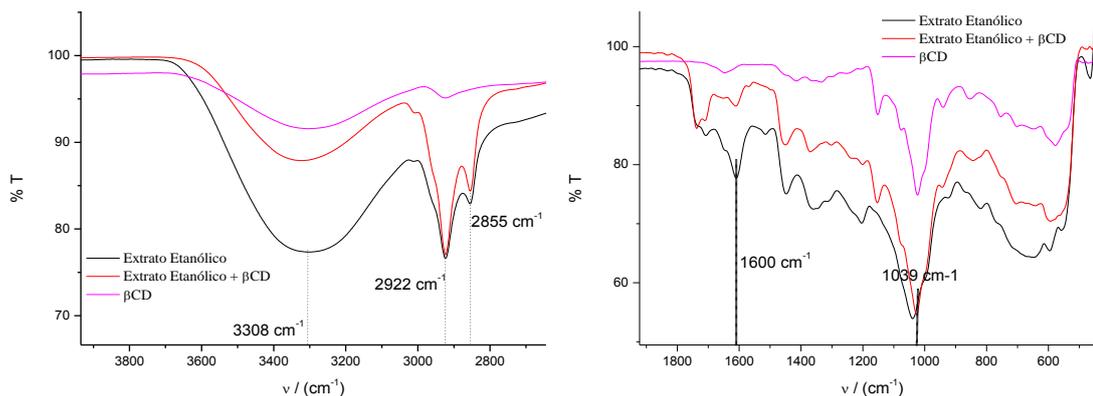
No espectro da  $\beta$ CD, observa-se principalmente a presença de bandas de absorção em  $3302\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H),  $2922\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H),  $1152\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O) e  $1019\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O). O espectro IV do extrato etanólico mostra bandas de absorção em  $1039\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O),  $1600\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O),  $2855\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H),  $2922\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H) e  $3305\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H). No espectro do complexo de inclusão observa-se que a banda  $1039\text{ cm}^{-1}$  sofreu um deslocamento para  $1023\text{ cm}^{-1}$ , e os picos

de  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $3305\text{ cm}^{-1}$  diminuíram bastante de intensidade, sendo que o primeiro pico chegou quase a desaparecer (Figura 24).

Como citado, deslocamentos de bandas correspondem à mudanças na energia dos modos vibracionais, enquanto que diferenças nas intensidades podem ser atribuídas a perturbações nos momentos de dipolo das ligações químicas de grupos funcionais envolvidos nas interações. De modo geral, a inserção de uma molécula hóspede no interior da cavidade da  $\beta$ CD leva a uma restrição conformacional, reduzindo a livre movimentação das moléculas encapsuladas, causando ambos os tipos de alterações. (NASCIMENTO, 2013, OLIVEIRA et al., 2011).

**Figura 24.** Espectro IR do extrato etanólico das folhas de *B. pinnatum*,  $\beta$ CD e complexo de inclusão.

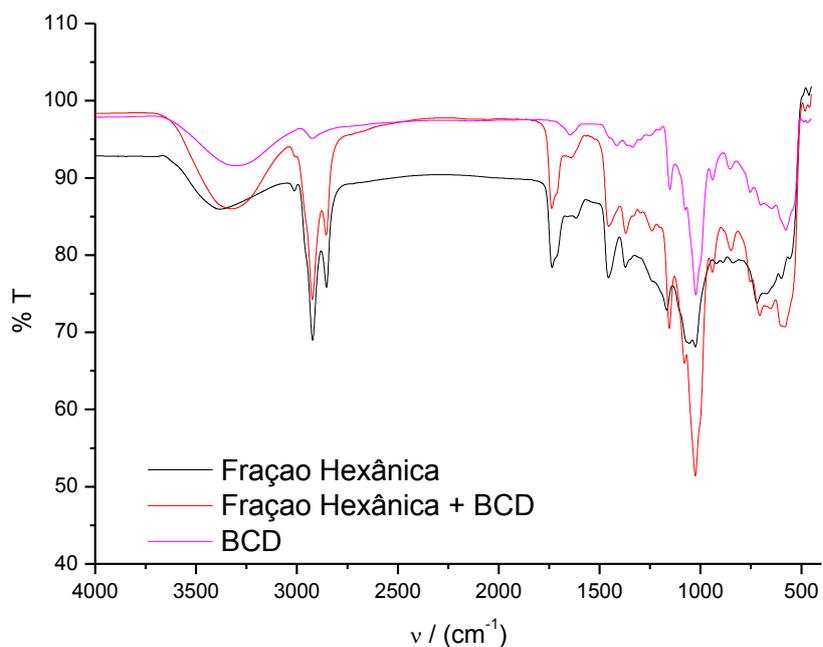


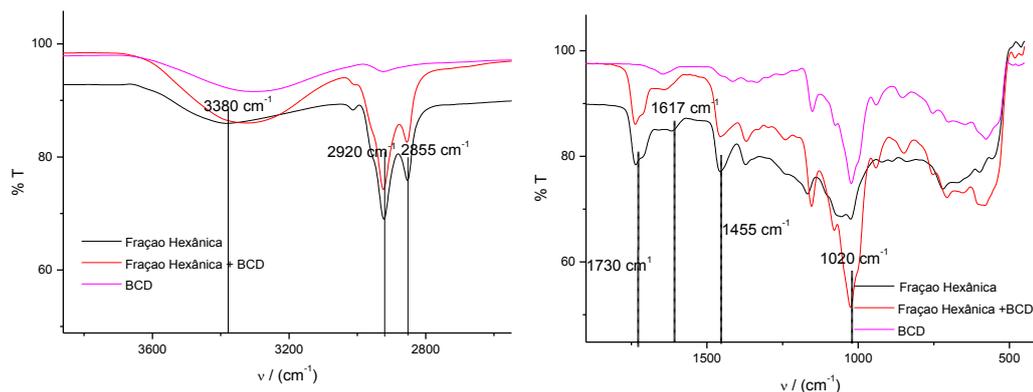


Fonte: O autor (2014).

Na análise do espectro de IR da fração hexânica observa-se a existência de bandas de absorção em  $1020\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O),  $1730\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=O),  $1455\text{ cm}^{-1}$  (C-N de clorofila),  $1617\text{ cm}^{-1}$  (C=C de clorofila),  $2855\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H),  $2920\text{ cm}^{-1}$  (estiramento  $\text{CH}_3$ ) e  $3380\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H). No espectro com  $\beta\text{CD}$ , observa-se pouquíssimas alterações que possam ser resultantes de interações, de modo que o espectro aparenta ser uma sobreposição dos espectros da fração hexânica e da  $\beta\text{CD}$  pura. A principal delas é um deslocamento da banda a  $1617\text{ cm}^{-1}$  para  $1643\text{ cm}^{-1}$  (C=C de clorofila) (Figura 25).

**Figura 25.** Espectro IR da fração hexânica das folhas de *B. pinnatum*,  $\beta\text{CD}$  e complexo de inclusão

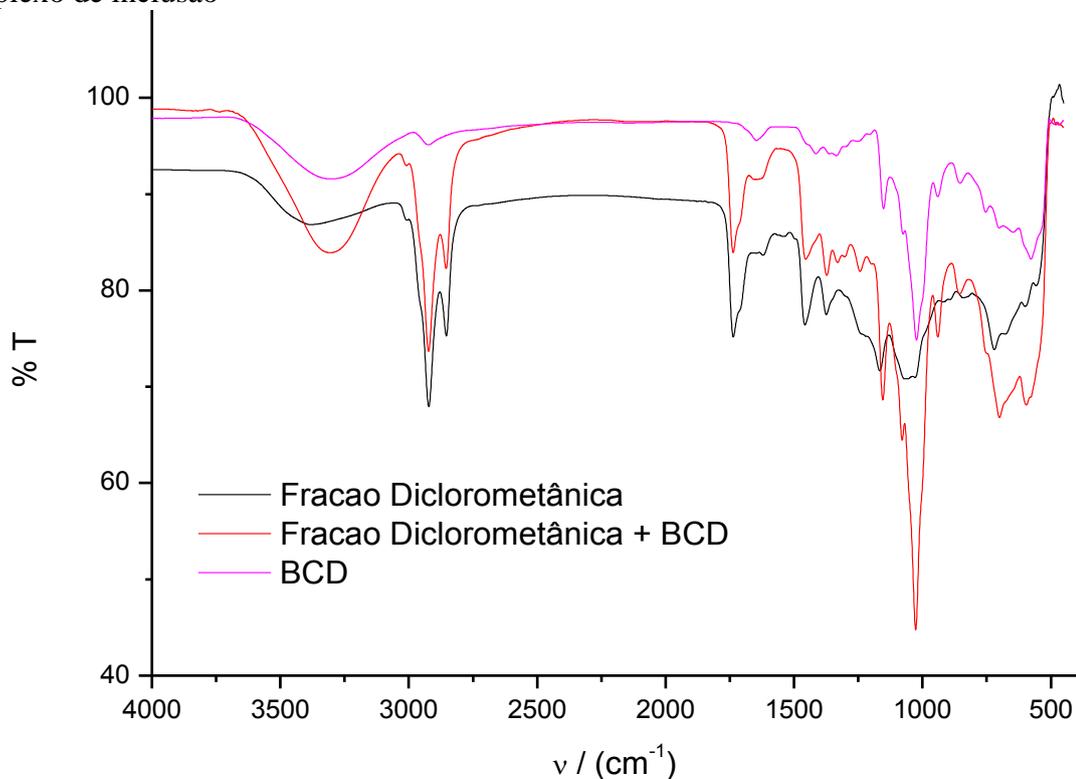


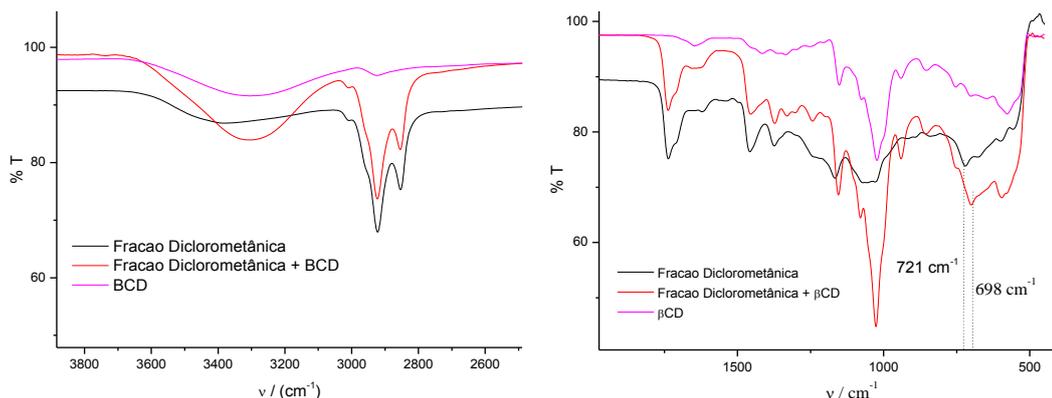


Fonte: O autor (2014).

No espectro de IR da fração em diclorometano, também ocorreram poucas alterações resultantes de interações intermoleculares. É possível observar somente alteração da banda a  $721\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de cadeia alifática –  $\text{CH}_2$ ) para  $698\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente devido à inclusão da parte alifática da feofitina na cavidade da  $\beta\text{CD}$  (Figura 26).

**Figura 26.** Espectro IR da fração diclorometânica das folhas de *B. pinnatum*,  $\beta\text{CD}$  e complexo de inclusão

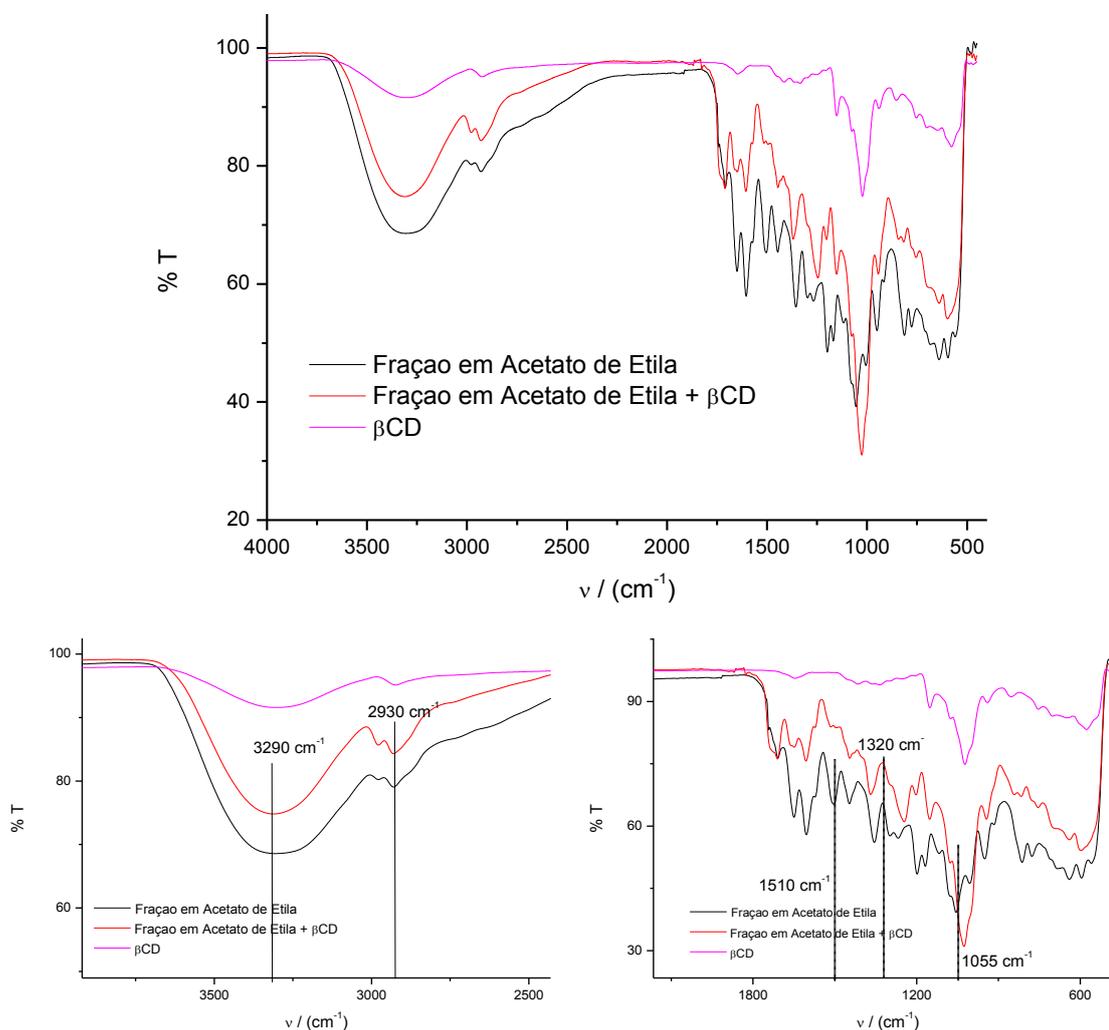




**Fonte:** O autor (2014)

O espectro de IR da fração de acetato de etila mostra bandas de absorção em  $1055\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O),  $1320\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-O),  $1510\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C) e  $2930\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C-H)  $3290\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O-H). No espectro com  $\beta$ CD, observa-se um número bem maior de mudanças em relação ao observado nas frações anteriores. Dentre elas: a banda  $1055\text{ cm}^{-1}$  aumentou de intensidade e foi deslocada para  $1025\text{ cm}^{-1}$ ; a banda a  $775\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de grupos etila) praticamente desapareceu; a banda a  $812\text{ cm}^{-1}$  (anel aromático) sofreu intensa redução de intensidade; desaparecimento da banda a  $913\text{ cm}^{-1}$  (deformação angular de  $\text{RCH}=\text{CH}_2$  fora do plano); desaparecimento das bandas a  $1117\text{ cm}^{-1}$  (C-O de álcoois ou fenóis) e  $1500\text{ cm}^{-1}$  (C=C de aromático); deslocamento da banda a  $1167\text{ cm}^{-1}$  para  $1148\text{ cm}^{-1}$  (C-O de álcoois ou fenóis); deslocamento da banda a  $1263\text{ cm}^{-1}$  para  $1243\text{ cm}^{-1}$  (C-O éteres); deslocamento da banda a  $1354\text{ cm}^{-1}$  para  $1367\text{ cm}^{-1}$  (não atribuída) (Figura 27).

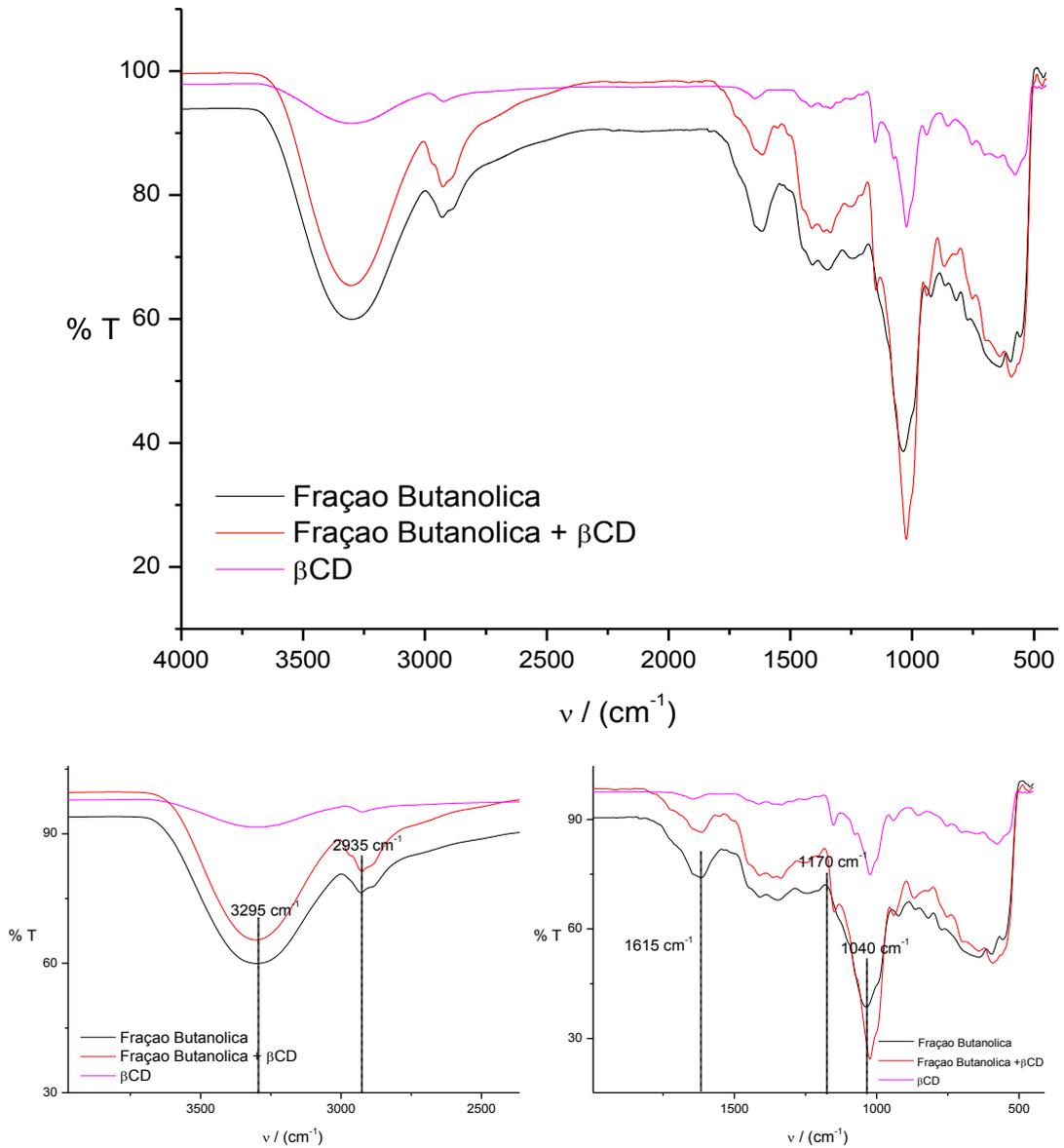
**Figura 27.** Espectro IR da fração de acetato de etila das folhas de *B. pinnatum*,  $\beta$ CD e complexo de inclusão



**Fonte:** O autor (2014).

O espectro de IR da fração butanólica das folhas de *B. pinnatum* mostra bandas de absorção em 1040  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-O), 1170  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-O), 1615  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C=O), 2935  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento C-H), 3295  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento O-H). E no espectro do complexo de inclusão a banda de absorção em 1040  $\text{cm}^{-1}$  teve sua intensidade aumentada e foi deslocada para 1020  $\text{cm}^{-1}$ , além de deslocamento da banda de 1175  $\text{cm}^{-1}$  para 1165  $\text{cm}^{-1}$ , e 1034  $\text{cm}^{-1}$  para 1015  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 28).

**Figura 28.** Espectro IR da fração butanólica das folhas de *B. pinnatum*,  $\beta$ CD e complexo de inclusão



**Fonte:** O autor (2014).

### 5.1.3 DIÂMETRO HIDRODINÂMICO POR DLS - $\langle D_h \rangle$

A nanotecnologia, por definição, está dedicada ao desenvolvimento de materiais estruturados na escala nanométrica. Portanto, a determinação do tamanho das partículas representa a principal abordagem a ser empregada ao se tratar de sistemas com essas características.

Entretanto, tal determinação pode não ser tão simples, pois as partículas de um dado material são na maioria das vezes irregulares ou polidispersas, podendo ainda estar em constante movimento (movimento Browniano) quando imersas em um fluido dispersante. Partículas maiores se movimentam mais lentamente do que as menores se a temperatura é a mesma (MALVERN, 2005; MURDOCK et al., 2008).

A esfera é a única forma geométrica que, dimensionalmente, pode ser definida apenas por um parâmetro (o diâmetro). Como na maioria das situações as partículas de uma amostra não possuem essa geometria, ou ainda, é impossível definir o formato real das partículas, coloca-se então a questão de como definir a dimensão de uma partícula de forma irregular.

No caso de suspensões líquidas, uma das aproximações utilizadas para medidas de tamanho considera que as partículas do sistema, independente do seu formato, possuem hipoteticamente o diâmetro de uma esfera de mesmo coeficiente de difusão  $C_d$ . Dentro dessa abordagem, o diâmetro das partículas é denominado *diâmetro hidrodinâmico* -  $D_h$ , estando inter-relacionado com  $C_d$  pela equação de Einstein (TANFORD, 1962):

$$D_h = \frac{RT}{6\pi\eta N_a C_d} \quad \text{Equação 1}$$

onde  $R$  é a constante dos gases (J/mol.K),  $T$  é a temperatura absoluta (Kelvin),  $\eta$  é a viscosidade do solvente (Pa.s),  $N_a$  é o número de Avogadro ( $6,02 \times 10^{23}$ ) e  $C_d$  o coeficiente de difusão da partícula ( $\text{m}^2/\text{s}$ ).

A fotometria de espalhamento de luz dinâmico – DLS, também conhecida como fotometria de correlação de fótons, é uma ferramenta físico-química capaz de medir a distribuição de coeficientes de difusão  $\langle C_d \rangle$  de partículas suspensas em uma amostra líquida a uma dada temperatura e composição (viscosidade constante). Se os coeficientes de difusão são descritos na forma de uma distribuição, a equação 1 deve ser reescrita na forma abaixo (TANFORD, 1962):

$$\langle D_h \rangle = \frac{RT}{6\pi\eta N_a \langle C_d \rangle} \quad \text{Equação 2}$$

onde  $\langle D_h \rangle$  é a distribuição de diâmetros hidrodinâmicos

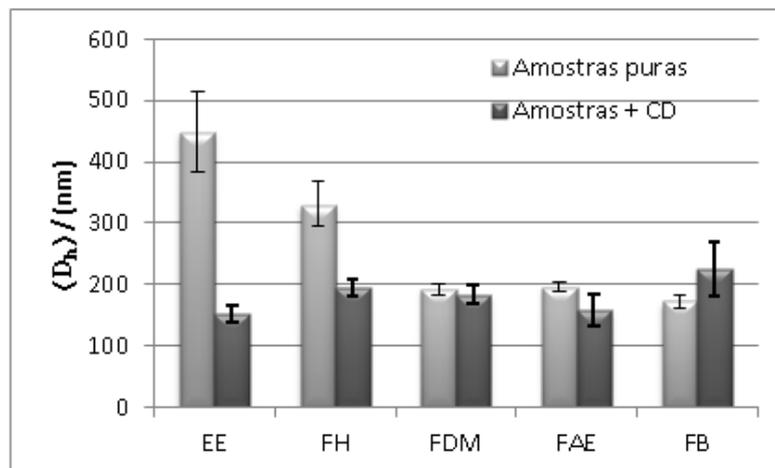
O diâmetro hidrodinâmico assim determinado também pode ser definido estatisticamente como uma média ponderada. A equação 3 mostra que a distribuição de diâmetros e uma dada espécie  $i$ ,  $\langle D_h \rangle_i$ , é calculada pela razão da quantidade de luz espalhada por essas espécies (produto entre o número de espécies  $N_i$ , a intensidade de luz espalhada pelas espécies  $I_i$ , e o diâmetro dessas espécies  $D_i$ ) pela quantidade total de luz espalhada pela amostra (dado pelo somatório do produto  $N_i I_i$ ) (TANFORD, 1962):

$$\langle D_h \rangle_i = \frac{\sum N_i I_i D_i}{\sum N_i I_i} \quad \text{Equação 3}$$

Como discutido acima, o diâmetro hidrodinâmico é um dos principais parâmetros físico-químicos utilizados para caracterizar espécies nanométricas em suspensão. No presente trabalho, as medidas de  $\langle D_h \rangle$  foram realizadas com o objetivo de descrever o tamanho das nanoestruturas formadas no meio aquoso na ausência e na presença de  $\beta$ CD.

A Figura 29 mostra valores  $\langle D_h \rangle$  para o extrato etanólico (EE) e suas frações (FH, FDCM, FAE, FB) e os respectivos compostos de inclusão, onde pode ser observado que tanto as dispersões obtidas para o extrato puro quanto para os compostos de inclusão apresentaram estruturas nanométricas em meio aquoso.

**Figura 29.** Valores médios dos diâmetros hidrodinâmicos de soluções etanólicas de extrato e frações de *Bryophyllum pinnatum* livre e encapsulado com  $\beta$ CD.

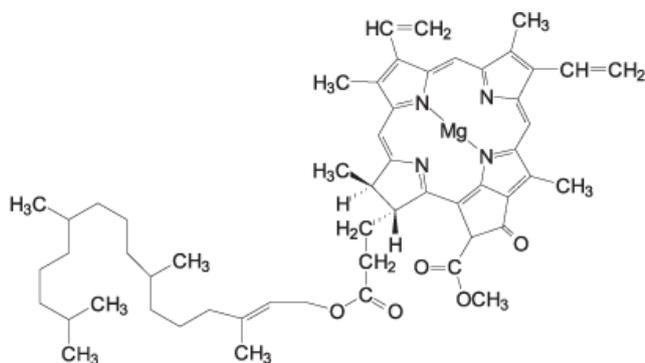


Fonte: O autor (2015).

A explicação para esse fato é fundamentada na composição química dos constituintes do extrato. Como foi constatado na seção 5.1.1.1 (*Identificação dos cromóforos majoritários*) uma das principais substâncias presentes na amostra são as clorofilas, responsáveis pela coloração verde de folhas de vegetais.

As clorofilas são compostos anfifílicos, contendo uma “cabeça” polar formada pelo anel porfirínico coordenado ao átomo de magnésio; e uma “cauda” hidrocarbônica apolar, conforme demonstrado na figura 30. É citado na literatura que esses compostos são capazes de formar diversos tipos de agregados moleculares no meio aquoso, muitos com simetria cilíndrica e tubular, dependendo principalmente da presença e da quantidade de co-solventes (WORCESTER et al., 1996; VLADKOVA, 2000; KRASNOVSKY, 1980). Como o extrato é uma mistura complexa, acredita-se que as clorofilas sejam responsáveis por encapsular os demais constituintes do extrato.

**Figura 30.** Estrutura de uma molécula de clorofila  $\alpha$



**Fonte:** MOREIRA et al., 2010

Assim, é suposto que a diluição de soluções etanólicas dos extratos (ricos em clorofila) em água tenha favorecido a formação de nanoestruturas com subsequente encapsulamento dos demais constituintes químicos das amostras.

Na presença de  $\beta$ CD, o  $\langle D_h \rangle$  das nanoestruturas presentes no extrato etanólico e da fração hexânica são bem menores do que nos extratos puros, sem  $\beta$ CD. Como as ciclodextrinas formam compostos de inclusão com componentes do extrato, novas interações intermoleculares são estabelecidas e, portanto, é esperado que os agregados formados tenham forma e tamanho diferentes. As demais frações não sofreram mudanças significativas de

tamanho na presença de  $\beta$ CD.

A redução no diâmetro hidrodinâmico das nanoestruturas presente no extrato etanólico e fração hexânica é muito interessante no que diz respeito ao potencial de utilização desse extrato/fração em formulações de uso tópico. Sabe-se que partículas na escala nanométrica são transportadas mais eficientemente através das barreiras biológicas, e conseqüentemente uma diminuição de tamanho pode resultar em um sistema de transporte de drogas mais eficiente (CSABA et al., 2006).

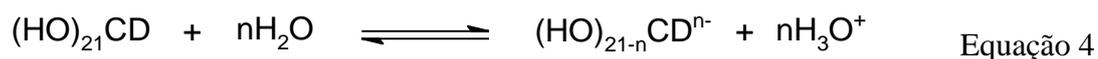
#### 5.1.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA

Condutividade elétrica é a propriedade que mede a capacidade de um determinado material conduzir corrente elétrica. No caso de condutores sólidos, esta condução se dá pelo movimento de elétrons enquanto que no meio líquido (soluções eletrolíticas), ocorre pelo movimento dos íons. Portanto, a condutividade elétrica é um parâmetro físico-químico utilizado para identificar a presença de íons em solução, bem como para quantificação desses íons. A condutividade elétrica se fundamenta na medida de corrente elétrica de uma solução quando se aplicam uma diferença de potencial alternado entre duas placas condutoras (OHLWELLER, 1981).

A Figura 31 mostra valores de condutividade elétrica para as dispersões do extrato e suas frações, na ausência e na presença de  $\beta$ CD.

De modo geral, pode-se observar que existe uma ligeira tendência de que na presença de  $\beta$ CD, a condutividade elétrica seja maior para o EE e as frações FH, FDCM e FB.

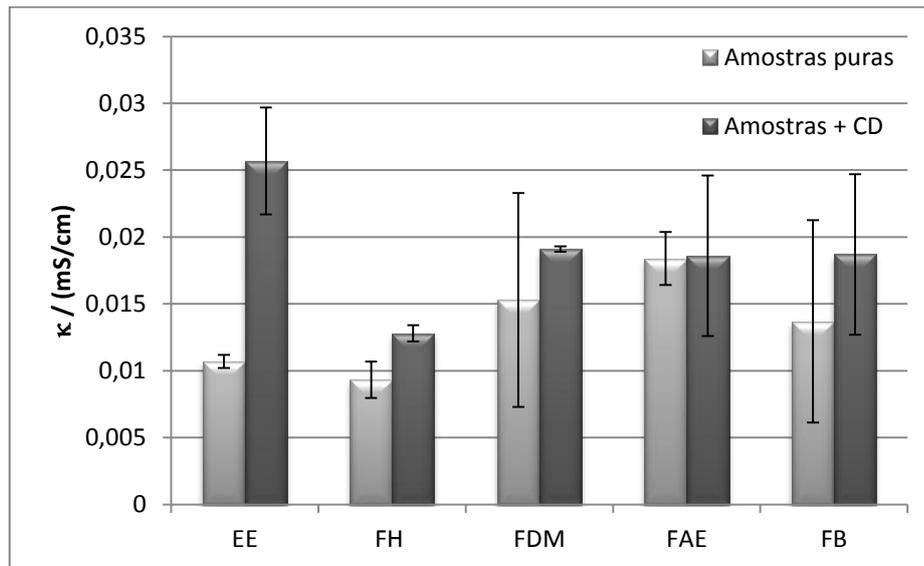
Esse comportamento foi atribuído ao fato da  $\beta$ CD possuir várias hidroxilas passíveis de ionização (21 hidroxilas ao todo). Apesar dos elevados valores de  $pK_a$  das ciclodextrinas ( $\approx 12,3$  variando até  $\approx 15,5$ ), em regime diluído (como é o caso) é de se esperar que seja estabelecido o equilíbrio químico abaixo, com liberação de espécies  $H^+$  para o meio:



A interação de ciclodextrinas com clorofilas pode também, através de algum mecanismo ainda desconhecido, forçar a liberação de íons  $Mg^{2+}$  para o meio, aumentando assim a condutividade elétrica das frações EE/ $\beta$ CD, FH/ $\beta$ CD, FDCM/ $\beta$ CD e FB/ $\beta$ CD. A formação de espécies iônicas no meio sugere uma maior tendência de solubilidade aquosa e, conseqüentemente maior biodisponibilidade das moléculas bioativas, contribuindo positivamente para seu efeito farmacológico.

Para a fração em acetato de etila (FAE), a condutividade praticamente não mudou, sugerindo caráter não iônico dos agregados.

**Figura 31.** Valores médios de condutividade elétrica de soluções etanólicas de extrato e frações de *Bryophyllum pinnatum* livre e encapsulado com  $\beta$ CD.



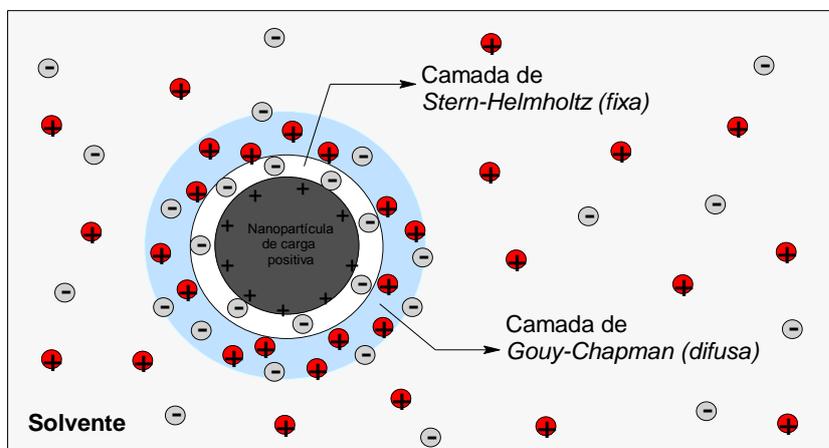
**Fonte:** O autor (2015).

### 5.1.5 POTENCIAL ZETA

Quando uma partícula é imersa em um fluido dispersante contendo espécies iônicas (elevada condutividade elétrica), sua superfície adquire espontaneamente uma carga elétrica superficial cuja magnitude dependerá do mecanismo envolvido: polarização pelo solvente, adsorção preferencial de íons ou ionização de grupos funcionais (XU, 1993).

A aquisição dessa carga induz uma distribuição dos íons em suas vizinhanças, formando uma *dupla camada elétrica* na interface da partícula com o líquido, sendo a primeira camada (fixa) denominada *Superfície de Stern-Helmholtz* e a segunda camada (de característica difusa) denominada *Superfície de Gouy-Chapman*, conforme demonstrado na Figura 32.

**Figura 32.** Esquema de uma dupla camada elétrica de uma nanopartícula de carga positiva



**Fonte:** NI et al., 2003.

A energia potencial eletrostática da camada de Stern-Helmholtz, normalizada pela carga superficial da partícula (potencial eletrostático, medido em voltz = Joules/Coulomb) é também denominado *potencial zeta*. O potencial zeta é uma medida da energia potencial eletrostática na interface entre as duas camadas elétricas. Em outras palavras, é a diferença de potencial elétrico entre a camada de *Stern-Helmholtz* e o meio dispersante, já que a camada de Gouy-Chapman tem composição similar ao solvente (XU, 1993; TANTRA et al., 2010; FERNÁNDEZ-NIEVES et al., 1999).

A intensidade do potencial zeta de uma nanopartícula está intimamente relacionada com sua estabilidade coloidal, visto que a repulsão eletrostática ajuda a evitar coagulação das nanopartículas (FERNÁNDEZ-NIEVES et al., 1999; PLAZA et al., 2001; DOUROUMIS et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2014). Assim, o potencial zeta é um indicador útil dessa carga e pode ser usado para inferir a respeito da estabilidade coloidal das nanopartículas. É relatado na literatura, que valores de potencial zeta superiores a  $\pm 30$  mV indicam estabilidade coloidal superficial da partícula normalizada pela carga. O tamanho da partícula afeta pouco os valores de potencial zeta porque este parâmetro é medido em *Joules por Coulomb*. Em outras palavras, é feita uma normalização da energia potencial pela quantidade de cargas.

A técnica se fundamenta na medida da frequência oscilação da luz espalhada (613nm), na presença de um campo elétrico alternado, medida por um contador de fótons situado num ângulo de  $173^\circ$ . O campo elétrico alternado cria um fenômeno de microeletroforese, que faz com que as partículas migrem na cubeta. Quanto maior for a frequência de oscilação das

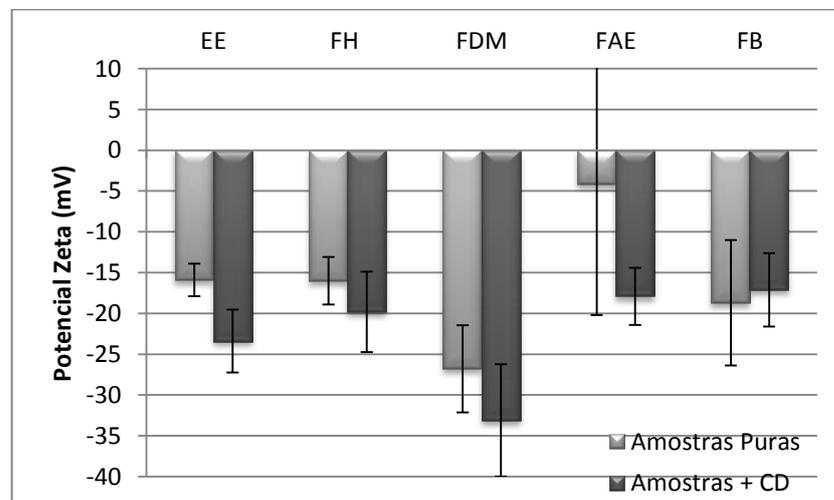
partículas (mobilidade eletroforética) maior será o potencial zeta.

A Figura 33 mostra os valores de potencial zeta para as mesmas dispersões descritas acima. Observa-se que para o extrato etanólico e as frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila, os valores de potencial zeta são mais negativos na presença de  $\beta$ CD do que nos extratos puros. Esse comportamento foi atribuído à presença de ciclodextrinas parcialmente ionizadas nos agregados e à interação  $\beta$ CD/porfirina.

A fração butanólica praticamente não sofreu alteração do potencial zeta pela interação com  $\beta$ CD.

Esses valores mais negativos de potencial zeta são compatíveis com a maior condutividade elétrica discutida no item acima, além de explicarem os menores valores de  $\langle D_h \rangle$ , pois nanoagregados carregados eletricamente tendem a apresentar diâmetros menores do que agregados não iônicos, devido ao efeito repulsivo dos constituintes (ALVES et al., 2014).

**Figura 33.** Valores médios de potencial zeta de soluções etanólicas de extrato e frações de *Bryophyllum pinnatum* livre e encapsulado com  $\beta$ CD.



**Fonte:** O autor (2015).

### 5.1.6 ESTABILIDADE TÉRMICA POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL (DTA)

A estabilidade térmica dos compostos foi avaliada por Análise Termogravimétrica (TGA, Figuras 34 e 35) e por Análise Térmica Diferencial (DTA, Figuras 36 e 37).

A curva TGA para a  $\beta$ CD, apresenta uma perda de 16% em massa, na faixa de 70-115°C, atribuída à saída de doze moléculas de água; seguida por uma estabilidade térmica até 279°C, quando inicia sua fusão. Em seguida, observa-se outra perda de massa a 343°C, atribuída a uma primeira decomposição, seguida de calcinação do composto (KOHATA et al., 1993). Na curva DTA, observa-se um pequeno pico endotérmico iniciado a 279°C, com máximo a 305°C, atribuído provavelmente à fusão da  $\beta$ CD. Após esse evento, sucessivos picos endotérmicos e exotérmicos são observados, confirmando que a decomposição ocorre por sucessivas etapas envolvendo reorganização molecular do material sólido. A calcinação é finalizada a  $\approx$  547°C, quando nem a  $\%m/m_0$  nem a potência térmica variam; gerando um sinal exotérmico com máximo a 540°C, levando a uma massa residual de apenas 0,11%.

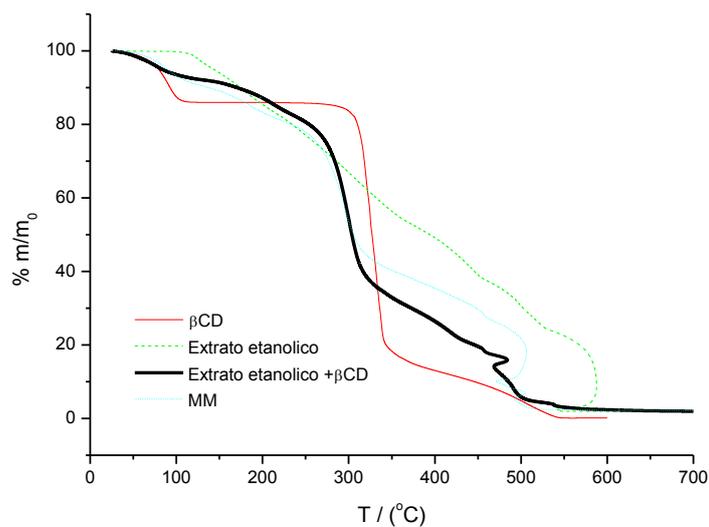
As curvas DTA/TGA para o extrato etanólico mostram a mudança de fase a aproximadamente 110°C seguida de contínua decomposição. A perda de massa se iniciou logo após a fusão, persistindo até 586°C, quando observou-se um recuo da curva de perda de massa. Este fenômeno foi atribuído a uma redução de temperatura decorrente de rápida expansão do material durante a calcinação (o material foi totalmente queimado ao final do experimento). A curva DTA para o EE mostrou evento de calcinação com máxima liberação entre 525 e 550°C.

Na presença de  $\beta$ CD, a fusão do extrato não foi observada até 128°C, de modo que o composto de inclusão sofreu apenas  $\approx$  8% de perda de massa do início do experimento até a temperatura até 128°C. A sucessiva perda de massa entre 134°C e 234°C foi atribuída à perda de material volátil e água remanescente, já que não foi observado liberação ou absorção de quantidade expressiva de energia dentro desta faixa de temperatura na curva de DTA. Esses dados são de fundamental importância, pois mostram o aumento da estabilidade térmica dos componentes do extrato na presença da  $\beta$ CD. Somente após 250°C, um intenso evento exotérmico associado à perda de massa foi observado. Tal evento sugere uma mudança no mecanismo de decomposição dos componentes do extrato devido à interação mútua, já que nenhum sinal exotérmico foi observado para a  $\beta$ CD pura, para o EE ou para a mistura mecânica nesta faixa de temperatura.

Não somente nesse intervalo de temperatura, mas em toda a faixa varrida, as curvas de

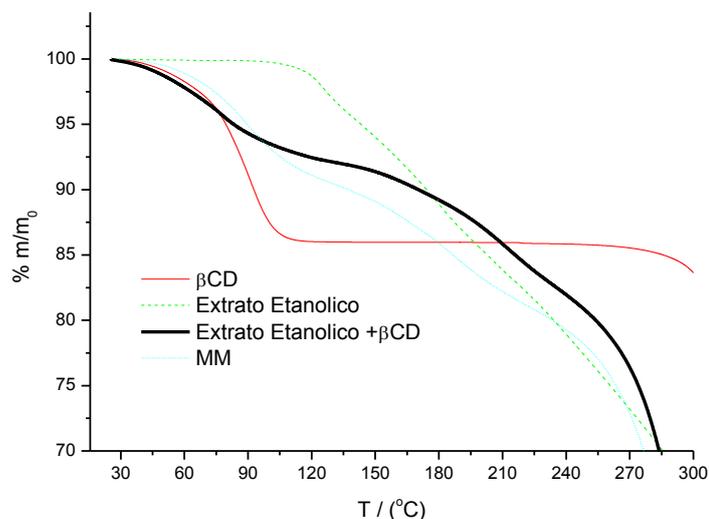
DTA e TGA da MM não se sobrepuseram às curvas do composto de inclusão, mostrando mais uma vez que no sistema EE/ $\beta$ CD existem interações intermoleculares resultantes do contato dos componentes na fase líquida durante o preparo das amostras.

**Figura 34.** TGA termograma para extrato etanólico,  $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 0 e 700 °C.



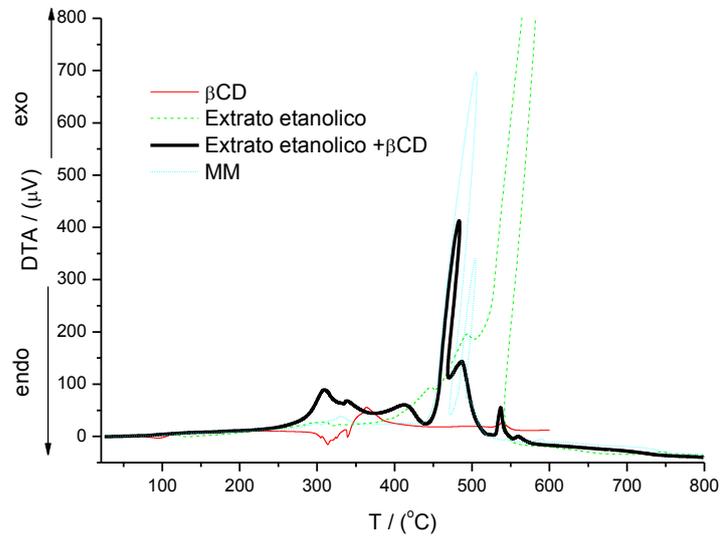
**Fonte:** O autor (2015).

**Figura 35.** TGA termograma para extrato etanólico,  $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 30 e 300 °C.



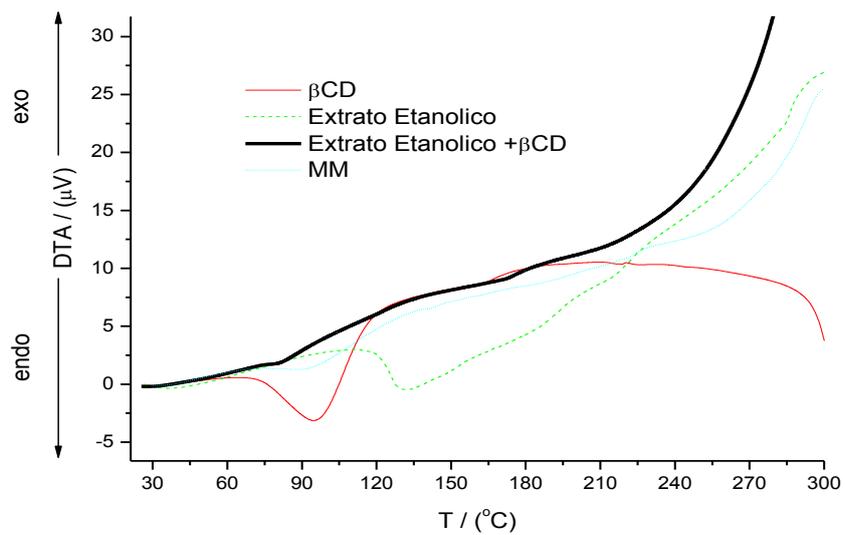
**Fonte:** O autor (2015).

**Figura 36.** DTA termograma para extrato etanólico,  $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 50 e 800 °C.



**Fonte:** O autor (2015).

**Figura 37.** DTA termograma para extrato etanólico,  $\beta$ CD, extrato etanólico/ $\beta$ CD e mistura mecânica na faixa de temperatura entre 30 e 300 °C.



**Fonte:** O autor (2015).

### 5.1.7 SOLUBILIZAÇÃO

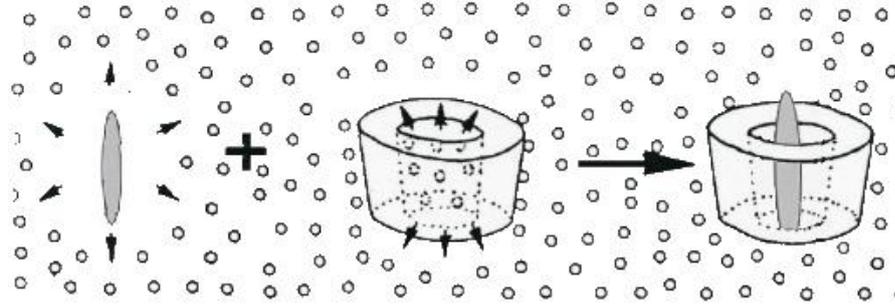
Sabe-se que a formação dos complexos de inclusão com ciclodextrinas é capaz de exercer alguns efeitos sobre a molécula complexada, como melhorar a solubilidade, acelerar ou retardar a absorção e estabilizar o fármaco em solução (AQIL et al., 2013; CAL et al., 2008). Porém, todos esses efeitos dependem da estabilidade e da solubilidade do complexo formado. Essas duas propriedades são independentes, pois um complexo muito estável pode ser muito solúvel.

No intuito de investigar o efeito da  $\beta$ CD sobre a solubilidade dos componentes do extrato, foram monitorados dois comprimentos, 374 nm e 400 nm, que correspondem as regiões de absorção dos cromóforos flavonóides e clorofila, respectivamente.

A partir da análise da Figura 38 observa-se com o perfil de solubilização do extrato etanólico livre e do extrato etanólico/ $\beta$ CD, e podem ser feitas algumas observações sobre esse perfil:

1. Constata-se mais uma vez a interação entre os componentes do extrato com a  $\beta$ CD, já que os perfis de solubilização para extrato livre e o extrato/ $\beta$ CD foram bem diferentes. É descrito na literatura, inclusive para compostos bioativos de plantas, que as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com moléculas de baixa solubilidade em água (como por exemplo, os polifenóis), aumentando desse modo a solubilidade destes compostos (BUSCHMANN et al., 2002; LOFTSSON et al., 2007; SINGH et al., 2002). Especificamente para flavonóides, podem-se citar como exemplo, estudos realizados com encapsulação de rutina com  $\alpha$ CD,  $\beta$ CD, HP- $\beta$ -CD e DM- $\beta$ -CD, em que foi verificado aumento na solubilidade da rutina em água, com consequente melhora na atividade farmacológica (HAIYUN et al., 2003; SHUANG et al., 1997; SRI et al., 2007; YU et al., 2007).
2. Os maiores valores de absorbância a 374 nm (banda característica para flavonóides) e a 400 nm (banda característica para clorofilas) na presença de  $\beta$ CD, a intervalos de tempo menores que 300 segundos, sugere que a velocidade de solubilização dos componentes do extrato é maior na presença de  $\beta$ CD do que nas amostras de extrato puro, em virtude da maior capacidade dos complexos de inclusão  $\beta$ CD com os componentes de o extrato interagir com a água (Figura 39). Em outras palavras, significa que o equilíbrio de dissolução das moléculas presente no extrato etanólico é alcançado mais rapidamente na presença de  $\beta$ CD.

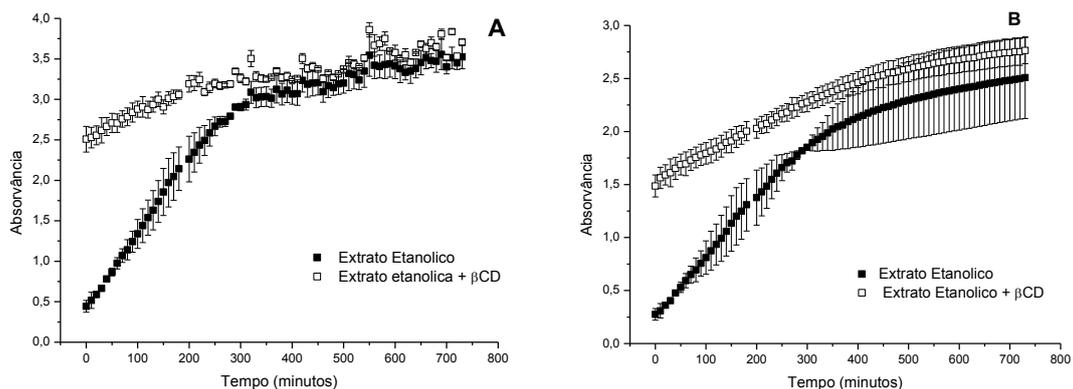
**Figura 39.** Representação esquemática da interação de moléculas livre e na forma de complexo de inclusão com a água. Os pequenos círculos representam as moléculas de água.



**Fonte:** Adaptado MARTINS et al., 2002.

3. A solubilização na presença de  $\beta$ CD é mais homogênea do que em sua ausência, sugerindo também que a difusão de material para o meio líquido possa estar acontecendo de maneira controlada.
4. Esta maior afinidade dos compostos pelo solvente sugere uma maior capacidade de difusão dos compostos no meio biológico, com consequente melhora na atividade farmacológica de tais compostos.

**Figura 38.** Perfil de solubilização extrato etanólico livre e extrato etanólico +  $\beta$ CD, A) flavonóide e B) clorofila, 374 nm e 400 nm, regiões correspondentes a absorção dos cromóforos de flavonóides e clorofila.



**Fonte:** O autor (2015).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO REOLÓGICA DAS FORMULAÇÕES EM BASE LANETTE

O termo reologia provém do grego (*rheo = fluir; logos = ciência*), significando "a ciência dos fluidos", que foi sugerido por E. C. Bingham e M. E. Crawford no século XIX para descrever o fluxo de líquidos e a deformação dos sólidos. O termo foi adotado formalmente em 1929 e hoje representa uma ciência que se dedica ao estudo das propriedades de fluxo e deformação da matéria como um todo, independente do estado físico (BARNES et al., 1998).

O entendimento dos parâmetros reológicos constitui uma importante ferramenta para as nanotecnologias pois permite descrever as interações intermoleculares entre os componentes de um dado sistema coloidal como é o caso de cremes, pastas, pomadas, loções, etc. Tal conhecimento permite o dimensionamento dos componentes de fluxo (bombas, tubulações), a previsão do comportamento do fluido durante o escoamento, além de serem bons indicadores de espalhabilidade e difusão de produtos sobre superfícies, como a pele por exemplo (SPADA et al., 2013).

Dentre os parâmetros reológicos, o de maior importância é a viscosidade ( $\eta$ ), definida a partir da equação da 2ª Lei de Newton como um fator de inércia (análogo à grandeza *massa*) que mede a resistência ao escoamento:

$$F = ma \quad \text{Equação 5 (2ª Lei de Newton)}$$

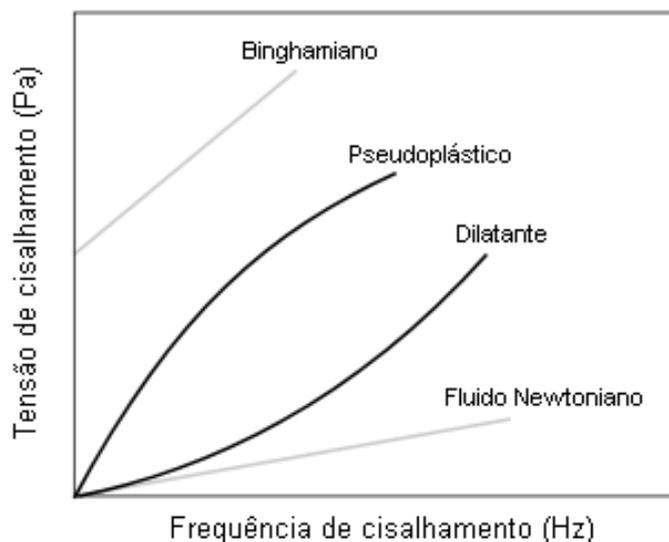
$$\tau = \eta\varphi \quad \text{Equação 6 (2ª Lei de Newton aplicada a fluidos)}$$

O parâmetro  $\tau$ , grandeza análoga à força ( $F$ ) é conhecida como tensão de cisalhamento – força aplicada à superfície paralela ao escoamento, tendo dimensões de pressão ( $\text{N/m}^2$  no SI). O termo  $\varphi$  é definido como gradiente de velocidade ( $\varphi = dv/dy$ ), grandeza análoga à aceleração ( $a$ ), que mede o movimento transmitido ao fluido devido à aplicação do estímulo externo  $\tau$ . É conhecida também como deformação por cisalhamento ou frequência de cisalhamento, por apresentar dimensões de frequência ( $\text{s}^{-1}$  no SI).

O fator de proporcionalidade entre  $\tau$  e  $\varphi$ , a viscosidade, tem unidades de  $\text{Ns/m}^2$  e informa sobre a facilidade (ou dificuldade) com que um fluido esco. Em outras palavras, mede a capacidade com que um fluido dissipa energia mecânica através de movimento, sendo diretamente dependente da intensidade das interações intermoleculares, tamanho, forma e estado de agregação dos componentes do fluido.

Fluidos que apresentam valores constantes de viscosidade são chamados de Newtonianos, enquanto aqueles cuja viscosidade é variável são os fluidos não Newtonianos. Tipos mais comuns de fluidos não newtonianos são mostrados na Figura 40.

**Figura 40.** Comportamento de fluidos quanto ao cisalhamento



**Fonte:** BARNES et al., 1998

Na figura 40, os fluidos Binghamianos apresentam comportamento similar a sólidos até certo valor de tensão  $\tau_x$ , a partir da qual passa a escoar. Fluidos pseudoplásticos e dilatantes apresentam respectivamente a viscosidade decrescente e crescente à medida que se aumenta a tensão (BENNETT et al., 1978).

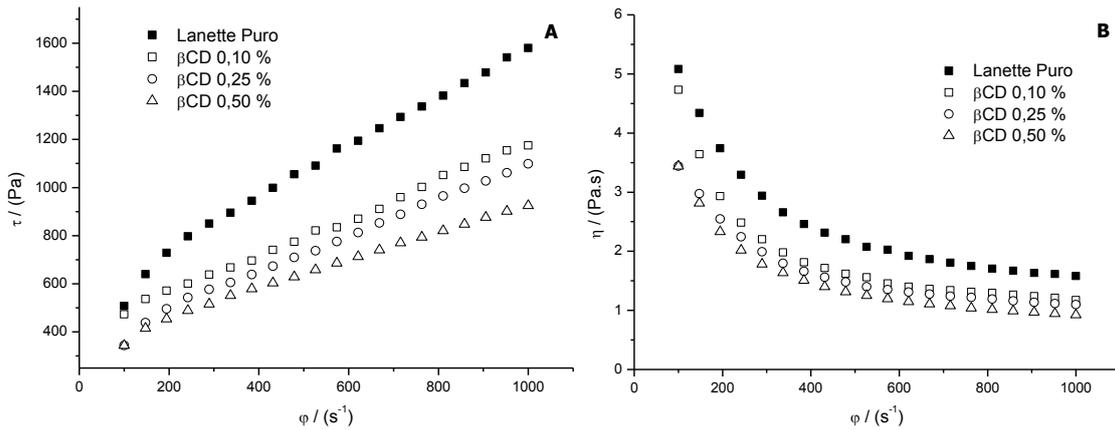
Na prática, o comportamento de fluxo de um dado material pode ser determinado através da construção de um gráfico de *tensão de cisalhamento versus taxa de cisalhamento*, como demonstrado na Figura 40, utilizando-se um reômetro.

No presente trabalho, amostras de lanette puro, contendo 0,10%, 0,25% e 0,50% de  $\beta$ CD; 0,10%, 0,25% e 0,50% de extrato etanólico de *Bryophyllum pinnatum*; e contendo 0,10%, 0,25% e 0,50% do composto de inclusão; foram submetidas a ensaios reológicos com o objetivo de se obter o perfil de fluxo e avaliar o efeito dos componentes nas interações intermoleculares. Neste caso, as concentrações foram as mesmas pois nosso objetivo foi estudar o efeito da composição na viscosidade, mantendo constante a concentração de soluto.

Como pode ser observado nas Figuras 41-43, a tensão de cisalhamento aumenta com taxa gradativamente menor enquanto que a viscosidade diminui exponencialmente com o aumento da taxa de cisalhamento (velocidade de rotação), mostrando que em todos os casos fluido é pseudoplástico (BARNES, 1997). A explicação para esse comportamento é dada em termos da destruição de agregados coloidais (SODERHJELM et al., 1994; BARNES et al., 1989; SODERHJELM et al., 1999; CARDOSO et al., 2006) dos surfactantes componentes do

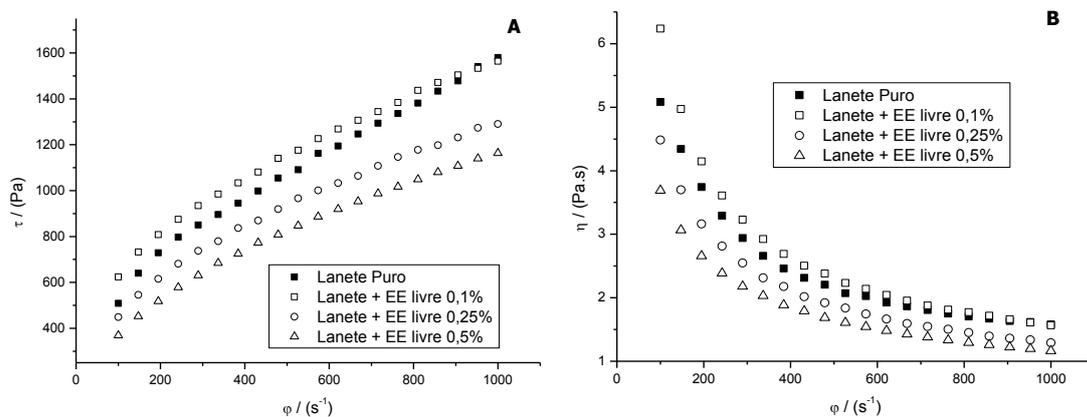
lanette (alcoóis graxos superiores e alquil sulfatos), mediante a aplicação do estímulo mecânico.

**Figura 41.** Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de  $\beta$ CD ( $100 \leq \dot{\varphi} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).



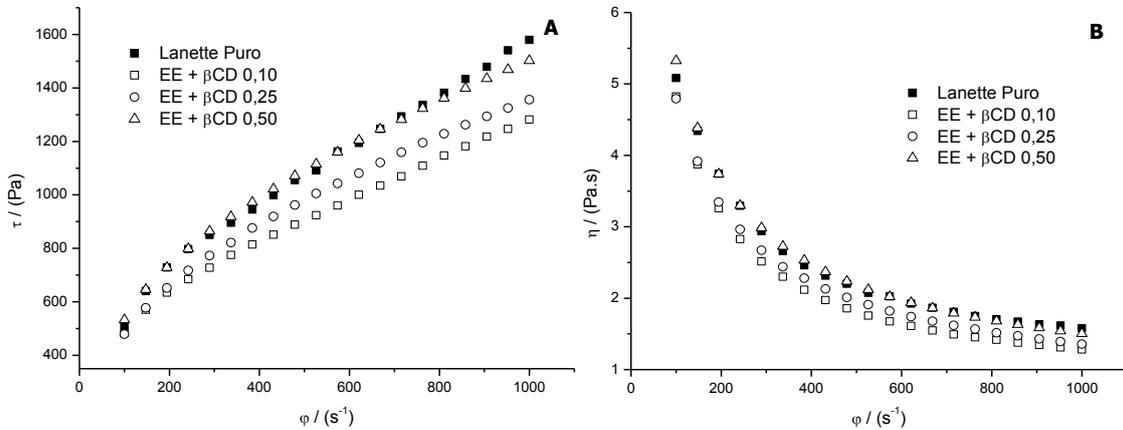
Fonte: O autor (2015).

**Figura 42.** Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de Extrato puro ( $100 \leq \dot{\varphi} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).



Fonte: O autor (2015).

**Figura 43.** Curvas de A) fluxo e B) de viscosidade à 30 °C, para diferentes concentrações de  $\beta$ CD ( $100 \leq \dot{\varphi} \leq 1000 \text{ s}^{-1}$ ).



**Fonte:** O autor (2015).

A maior queda na viscosidade (aproximadamente 50%) ocorre entre  $100$  e  $400 \text{ s}^{-1}$  aproximadamente. Acima de  $400 \text{ s}^{-1}$  a queda não é tão acentuada, pois os agregados entram em regime permanente de orientação molecular e desagregação, de modo que a viscosidade se torna aproximadamente constante. Assim, os dados sugerem que a taxa de cisalhamento ideal para processamento da amostra é em torno de  $400 \text{ s}^{-1}$ , que por sua vez é um valor típico de operações de mistura, agitação, transporte em tubulações e espalhamento de fluido sobre superfícies (BARNES et al., 1998).

De modo geral, as seguintes observações podem ser feitas:

- 1) A viscosidade das formulações semissólidas apresentou comportamentos diferentes para cada sistema avaliado.
- 2) A incorporação de  $\beta$ CD na formulação semissólida levou a uma gradativa redução de  $\tau$  e de  $\eta$ , sugerindo que a  $\beta$ CD favorece a desagregação das nanoestruturas presentes no lanette, aumentando assim sua fluidez.
- 3) A incorporação de 0,1% de EE na base lanette levou a um pequeno aumento em  $\eta$  e  $\tau$ . Entretanto, nas concentrações de 0,25% e 0,5% de EE, observou-se uma redução de ambos os parâmetros, sugerindo efeito similar ao observado para as composições  $\beta$ CD/lanette.
- 4) Para as formulações contendo EE/ $\beta$ CD, observou-se uma queda inicial dos valores de  $\tau$  e  $\eta$ , na presença de 0,1% do composto de inclusão. Por outro lado, o aumento da concentração de EE/ $\beta$ CD fez com que os valores de  $\eta$  e de  $\tau$  fossem gradativamente

maiores. Na máxima concentração de EE/ $\beta$ CD (0,5%) deve existir um efeito compensatório de interações intermoleculares que fazem com que o perfil de fluxo e de viscosidade da formulação seja muito próximo ao do lanette puro.

- 5) Os diferentes perfis reológicos mostram que os compostos de inclusão EE/ $\beta$ CD interagem com o veículo de maneira diferente do observado para o EE puro ou a  $\beta$ CD pura. A existência dessas interações é um indicativo de que haverá um controle na liberação dos princípios ativos durante a aplicação tópica.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES LIVRE E EXTRATOS E FRAÇÕES/ $\beta$ CD

Dados da literatura mostram que o extrato das folhas de *B. pinnatum* é rico em flavonóides. Considerando que tais constituintes possuem expressiva atividade antioxidante (BILIA et al., 2014; XIAO et al., 2011), alguns ensaios *in vitro* foram realizados para avaliar esse potencial, além de verificar se o encapsulamento do extrato e frações com  $\beta$ CD poderia levar a uma melhora significativa dessa atividade.

Levando-se em conta que a atividade antioxidante de um composto é influenciada pelo modelo de estudo aplicado, a realização de mais de um ensaio é recomendado, uma vez que os princípios dos métodos variam de acordo com a matriz reacional (HALLIWEL et al., 2000; MELO, 2010; FERREIRA et al., 2013; PINHO et al., 2014). Em vista disso, três metodologias baseadas em mecanismos distintos foram utilizadas para caracterizar a atividade antioxidante da amostra. No presente estudo, foram realizados os ensaios:

- 1) Sequestro de radicais livres estáveis, como DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila);
- 2) Poder de redução de íons metálicos – FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), como  $\text{Fe}^{3+}$ ;
- 3) Inibição da oxidação lipídica, como o método com da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.

O potencial antioxidante do extrato etanólico, frações livres e do controle positivo (rutina) frente ao radical DPPH, estão apresentados na Tabela 5 na forma de  $\text{CE}_{50}$ . Como observado, os valores de  $\text{CE}_{50}$  das amostras variaram entre  $8,13 \pm 0,99$  a  $67,66 \pm 1,92$   $\mu\text{g/mL}$  e foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ). A fração em acetato de etila apresentou menor  $\text{CE}_{50}$  ( $8,13 \pm 0,99$   $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparada as demais amostras avaliadas. Isso demonstra que esta fração possui maior atividade antioxidante, pois foi capaz de inibir o

radical livre DPPH com uma menor concentração. A rutina, flavonóide com reconhecida atividade antioxidante usado como controle positivo, produziu  $CE_{50}$  igual a  $8,37 \pm 0,23$   $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 5.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de *B.pinnatum* pelo método do sequestro do radical DPPH ( $p < 0,05$ ).

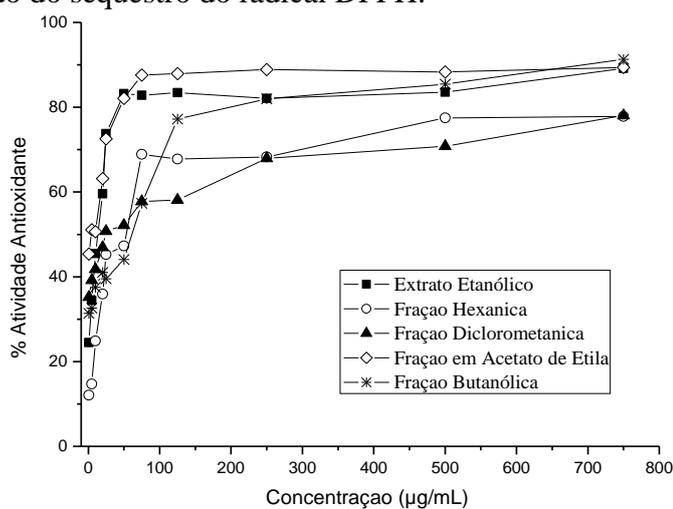
Amostras/Controle	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Extrato Etanólico	$12,27 \pm 0,38$
Fração Hexânica	$67,66 \pm 1,92$
Fração Diclorometânica	$51,89 \pm 3,68$
Fração em Acetato de Etila	$8,13 \pm 0,99$
Fração Butanólica	$28,27 \pm 0,35$
Rutina (controle positivo)	$8,37 \pm 0,23$

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

Fonte: O autor (2015).

Na figura 44 são mostrados os valores de porcentagem da atividade antioxidante (%AA) em diferentes concentrações do extrato etanólico e frações livres de *B. pinnatum*. É observado que, a partir da concentração de  $25 \mu\text{g/mL}$ , a fração em acetato de etila foi capaz de inibir o DPPH acima de 80%, demonstrando potente efeito antioxidante.

**Figura 44.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de *B. pinnatum* pelo método do sequestro do radical DPPH.



Fonte: O autor (2015).

A segunda metodologia utilizada no estudo para avaliação da atividade antioxidante foi o método FRAP, baseado na avaliação do poder de redução do ferro. Para esse experimento, os valores da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) para o extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* e rutina estão apresentadas na Tabela 6, enquanto que o perfil antioxidante das concentrações, avaliadas em função da absorbância, são apresentados na Figura 45.

Os valores das CE<sub>50</sub>, com absorbância em 0,5 para o poder de redução, variaram entre 222,95 ± 1,75 µg/mL e 1276,41 ± 0,70 µg/mL. No entanto, considerando os valores das amostras de *B.pinnatum*, a fração em acetato de etila apresentou menor CE<sub>50</sub> (222,95 ± 1,75 µg/mL), sendo a mais efetiva ( $p < 0,05$ ). Neste ensaio, a fração butanólica foi a menos ativa com valor de CE<sub>50</sub> cerca de seis vezes maior que a rutina. A rutina, controle positivo, produziu CE<sub>50</sub> igual 206,66 ± 1,13 µg/mL.

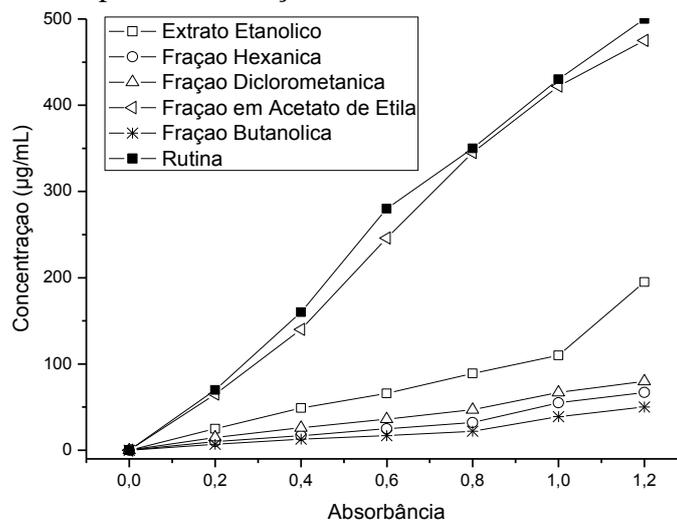
**Tabela 6.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução ( $p < 0,05$ ).

<b>Amostras/Controle</b>	<b>CE<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
<b>Extrato Etanólico</b>	536,90 ± 1,69
<b>Fração Hexânica</b>	606,88 ± 1,67
<b>Fração Diclorometânica</b>	626,63 ± 1,03
<b>Fração em Acetato de Etila</b>	222,95 ± 1,75
<b>Fração Butanólica</b>	1276,41 ± 0,70
<b>Rutina (controle positivo)</b>	206,66 ± 1,13

Os valores correspondem à média ± E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

**Figura 45.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução.

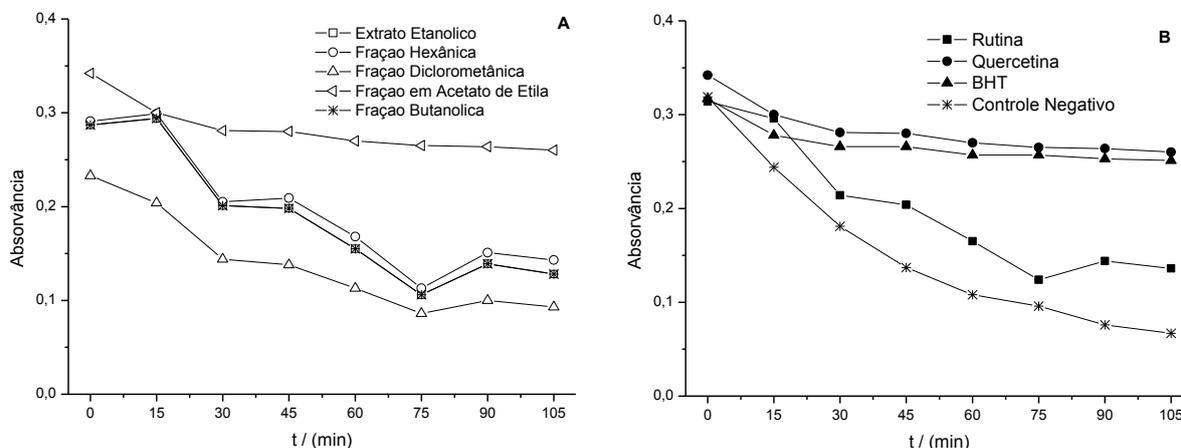


**Fonte:** O autor (2015).

A terceira metodologia utilizada para avaliação da atividade antioxidante foi o método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Na figura 46, são mostradas as leituras obtidas das absorbâncias nos tempos (minutos)  $t_0$ ,  $t_5$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$  e  $t_{105}$  do extrato etanólico e frações e dos controles (BHT, rutina e quercetina), onde se observa o decaimento das absorbâncias em função do tempo em decorrência da oxidação do  $\beta$ -caroteno.

Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e consequentemente, maior inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno. As frações hexânica, diclorometânica e em acetato de etila apresentaram menor variação no decaimento, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica. Entre os controles positivos testados, o BHT e a quercetina foram o mais ativos, produzindo um menor decaimento das absorbâncias.

**Figura 46.** Decaimento da absorbância em função do tempo para **A)** extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum*, **B)** controles positivo e negativo, pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.



**Fonte:** O autor (2015).

Considerando a inibição da peroxidação lipídica (%I), o extrato etanólico e frações das folhas de *B.pinnatum* (250  $\mu$ g/mL), bem como controles positivos (25  $\mu$ g/mL), produziram valores entre 35,75 e 70,74% (Tabela 7). Nesta tabela, fica evidenciado que a fração em acetato de etila, com inibição igual a 64,95%, foi a mais ativa seguida das frações hexânica e diclorometânica, com 40,23 e 37,76% de inibição, respectivamente.

**Tabela 7.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *B. pinnatum* pelo método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico ( $p < 0,05$ ).

Amostra/Controle	% Inibição da peroxidação lipídica
<b>Extrato Etanólico</b>	36 $\pm$ 1,46 <sup>a,c</sup>
<b>Fração Hexânica</b>	40 $\pm$ 2,73 <sup>a</sup>
<b>Fração Diclorometânica</b>	38 $\pm$ 3,29 <sup>a</sup>
<b>Fração em Acetato de Etila</b>	65 $\pm$ 0,82 <sup>b</sup>
<b>Fração Butanólica</b>	37 $\pm$ 3,06 <sup>c</sup>
<b>Rutina</b>	26 $\pm$ 3,85
<b>Quercetina</b>	63 $\pm$ 9,6 <sup>b</sup>
<b>BHT</b>	70 $\pm$ 3,52 <sup>b</sup>

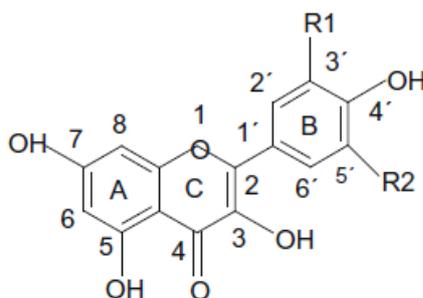
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

A maior atividade antioxidante da fração acetato de etila, em todas as metodologias utilizadas no presente estudo, pode ser atribuída aos componentes fenólicos já descritos para a planta, principalmente a presença majoritária de flavonoides, como já discutido em outras sessões (GOKBULUT et al., 2013; VITALINI et al., 2011; MAJAZ et al., 2011; MUZITANO et al., 2011; OKWU et al., 2011; TATSIMO et al., 2012, PATEWAR, 2012; BALAMURUGAN et al., 2012; CHIBLI et al., 2014).

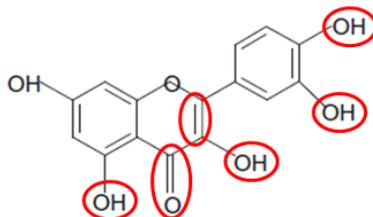
Essa atividade é relacionada com a presença de grupos hidroxil nas posições 3' e 4' do anel B, os quais conferem elevada estabilidade ao radical formado, participando da deslocalização do elétron, e a existência de uma dupla ligação entre os carbonos C<sub>2</sub> e C<sub>3</sub> do anel C em conjugação com o grupo carbonilo na posição C<sub>4</sub>, o qual torna possível a deslocalização de um elétron do anel B. E ainda, devido à presença de grupos hidroxil livres na posição 3 do anel C e na posição 5 do anel A, juntamente como grupamento carbonilo na posição 4, também são importantes para a atividade antioxidante que esses compostos apresentam (Figura 47). A quercetina, um flavonóide com reconhecida atividade antioxidante, possui todas essas características, sendo considerada um dos antioxidantes naturais mais potentes conhecidos (Figura 48). Várias classes de flavonoides (flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas ou flavonóis, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas) diferem quanto ao nível de oxidação e saturação do anel C, enquanto que os compostos que pertencem a uma mesma classe diferem-se entre si no padrão de substituição dos anéis A e B. Tais diferenças estruturais, influenciam a estabilidade do radical formado e desta maneira a propriedade antioxidante dos flavonoides (HUBER et al., 2009; MERCADER-ROS et al., 2010; QUIDEAU et al., 2011; SANTI et al., 2014; GREGORIS et al., 2010).

**Figura 47.** Estrutura química básica de flavonoides e sistema de numeração para diferenciação da posição dos carbonos.



**Fonte:** SIMÕES et al., 2010

**Figura 48.** Estrutura química da quercetina com destaque as características estruturais que determinam a atividade antioxidante dos flavonoides.



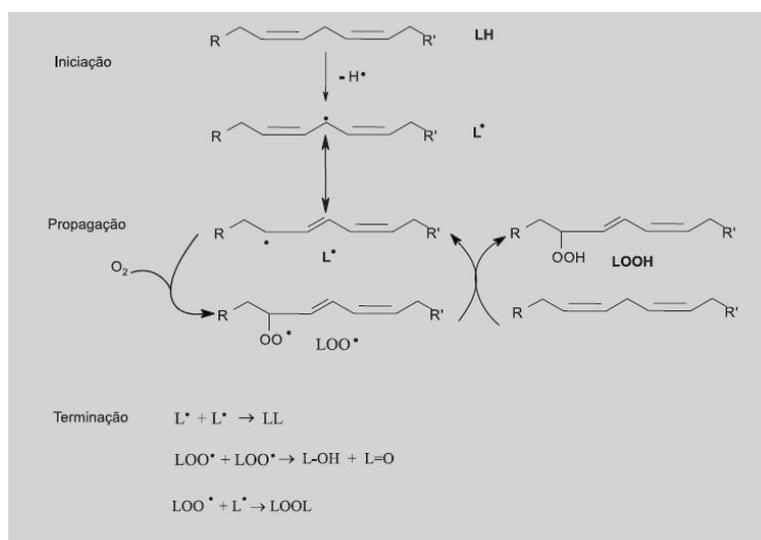
**Fonte:** SIMÕES et al., 2010.

Os ensaios de avaliação da inibição da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), como por exemplo, o sistema de cooxidação  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, apesar de também ser uma metodologia *in vitro* de avaliação da atividade antioxidante, reproduz melhor situações fisiológicas de estresse oxidativo, como a oxidação dos lipídeos insaturados das membranas celulares pelos radicais livres, produzindo principalmente  $L\bullet$ ,  $LO\bullet$  e  $LOO\bullet$ , levando a destruição de sua estrutura, alteração dos mecanismos de troca de metabólitos e, em casos extremos, à morte celular (ALVES et al., 2010; LIMA et al., 2001; NETO et al., 2013).

A LPO é um processo composto por três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação. A primeira etapa dessa reação ocorre através da abstração de um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ( $R-CH_2-R$ ) através do ataque de um radical livre ( $L\bullet$ ), originando um radical de metileno ( $R-CH\bullet-R$ ).

Este, por sua vez, sofre um rearranjo molecular formando um dieno conjugado que pode reagir com moléculas de oxigênio, originando um radical peroxila ( $ROO\bullet$ ). A partir da formação desse radical, ocorre a fase de propagação, devido a sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metilenos de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Em seguida, estes sofrem um rearranjo molecular, formando dienos conjugados e, posteriormente, atacando moléculas de oxigênio e originando desse modo, um novo  $ROO\bullet$  que propagará o processo (Figura 49).

**Figura 49.** Esquema representando as principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica.



**Fonte:** LIMA, 2001

Os antioxidantes podem atuar nesse processo, inibindo a iniciação do processo ao neutralizar EROS do meio e/ou inibir a propagação da LPO ao neutralizar os radicais peróxido formados pela oxidação dos lipídeos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; HALLIWELL, 2007; KÜHN et al., 2002; CATALÁ, 2010).

No ensaio de inibição da peroxidação lipídica, a análise do gráfico de decaimento da absorbância da emulsão do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico em função do tempo (Figura 43), mostra que tanto o extrato etanólico quanto as frações hexânica e em acetato de etila retardaram e reduziram a LPO, com conseqüente oxidação do  $\beta$ -caroteno.

A fração em acetato de etila foi a mais promissora com 65% de inibição da peroxidação lipídica, sendo que a quercetina, flavonóide utilizado como controle positivo, apresentou 63% de inibição. Este ensaio possui como meio reacional um sistema de emulsão e, por isso as substâncias lipofílicas possuem mais facilidade em exercer sua função antioxidante, pois são capazes de permanecer na interface óleo:água da emulsão, onde ocorre a LPO (KOLEVA et al., 2002).

Devido aos resultados positivos para avaliação da atividade antioxidante e devido à complexidade química dos derivados vegetais, não se pode afirmar que a ação antioxidante de *B. pinnatum* seja devido a um único mecanismo de ação, podendo ser sugerido a combinação de pelo menos três mecanismos principais: I) o sequestro de radicais livres; II) quelatação de íons metálicos (que podem iniciar a produção de radicais hidroxil pela Reação de Fenton ou Harber-Weis); e III) proteção contra a peroxidação lipídica através da ação antioxidante

direcionada sobre o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2\text{-}\bullet$ ) (que são espécies extremamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica) (GALATI et al., 2002; KAHRAMAN et al., 2003; PIETTA, 2000; MERCADER-ROS et al., 2010; NGUYEN et al., 2013; WU et al., 2015).

Visando melhorar a atividade antioxidante do extrato e suas frações, seus respectivos compostos de inclusão foram submetidos aos três métodos descritos acima.

Inicialmente, o potencial antioxidante dos fitocomplexos frente ao radical DPPH, do controle positivo (rutina / $\beta\text{CD}$ ) e da  $\beta\text{CD}$  pura estão apresentados na Tabela 8 na forma de  $\text{CE}_{50}$ , cujos valores variaram entre  $4,32 \pm 1,72$  a  $49,02 \pm 1,04$   $\mu\text{g/mL}$ . O composto de inclusão da fração acetato de etila apresentou menor  $\text{CE}_{50}$  ( $4,32 \pm 1,72$   $\mu\text{g/mL}$ ) quando comparada as demais amostras avaliadas. Isto demonstra que esta fração possui maior atividade antioxidante, pois foi capaz de inibir o radical livre DPPH com uma menor concentração. O composto de inclusão Rutina/ $\beta\text{CD}$ , usado como controle positivo, produziu  $\text{CE}_{50}$  igual a  $3,57 \pm 1,07$   $\mu\text{g/mL}$  enquanto que a  $\beta\text{CD}$  pura apresentou baixa capacidade antioxidante, já que sua  $\text{CE}_{50}$  foi de  $81,96 \pm 1,10$   $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabela 8.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações +  $\beta\text{CD}$  das folhas de *B.pinnatum* pelo método do sequestro do radical DPPH ( $p < 0,05$ ).

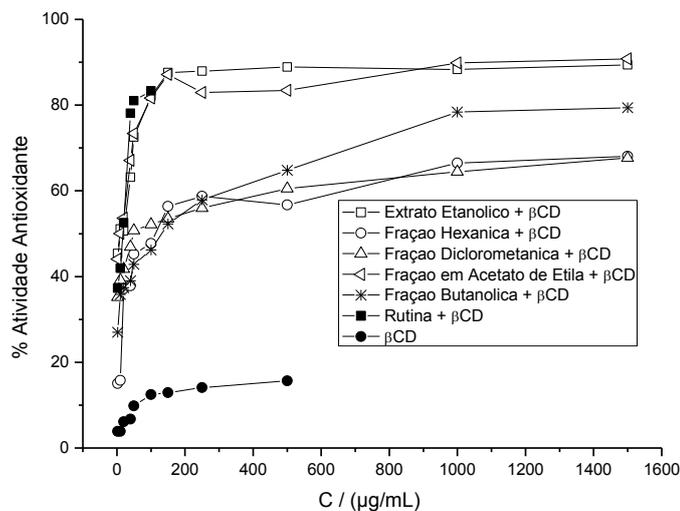
<b>Amostras/Controle</b>	<b><math>\text{CE}_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
<b>Extrato Etanólico+ <math>\beta\text{CD}</math></b>	$7,03 \pm 0,92$
<b>Fração Hexânica+ <math>\beta\text{CD}</math></b>	$54,51 \pm 1,15$
<b>Fração Diclorometânica+ <math>\beta\text{CD}</math></b>	$49,02 \pm 1,04$
<b>Fração em Acetato de Etila+ <math>\beta\text{CD}</math></b>	$4,32 \pm 1,72$
<b>Fração Butanólica+ <math>\beta\text{CD}</math></b>	$21,47 \pm 1,28$
<b>Rutina+ <math>\beta\text{CD}</math> (controle positivo)</b>	$3,57 \pm 1,07$
<b><math>\beta\text{CD}</math></b>	$82,96 \pm 1,10$

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

Na Figura 50 são mostrados os valores de porcentagem da atividade antioxidante (%AA) em diferentes concentrações do EE/ $\beta\text{CD}$  e frações/ $\beta\text{CD}$ . Observa-se que para o EE e FAE, houve um aumento da atividade antioxidante após o encapsulamento com  $\beta\text{CD}$  e que a  $\beta\text{CD}$  pura não possui capacidade antioxidante expressiva, já que a mesma foi capaz de inibir o DPPH em menos de 20%.

**Figura 50.** Atividade antioxidante do EE/ $\beta$ CD e frações/ $\beta$ CD pelo método do sequestro do radical DPPH.



**Fonte:** O autor (2015).

Comparado a atividade antioxidante do EE e frações livres com EE/ $\beta$ CD e frações/ $\beta$ CD, respectivamente, percebe-se que para todas as amostras houve diminuição do valor de  $CE_{50}$ , mas somente para o EE/ $\beta$ CD e para FAE/ $\beta$ CD as reduções foram significativas ( $p < 0,05$ ). O valor de  $IC_{50}$  (concentração de antioxidante necessária para eliminar 50% dos radicais livres presentes) para FAE foi de 8,13  $\mu$ g/mL, enquanto que este número para FAE/ $\beta$ CD foi a metade. Para o EE/ $\beta$ CD, os resultados mostraram que são necessários 7,03  $\mu$ g/mL para eliminar 50% dos radicais de DPPH enquanto que para o EE livre, se necessita de uma concentração de 12,27  $\mu$ g/mL para eliminar a mesma quantidade de radicais DPPH. (Tabela 9).

**Tabela 9.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com  $\beta$ CD pelo método do sequestro do radical DPPH ( $p < 0,05$ ).

<b>Amostra</b>	<b>CE<sub>50</sub> (<math>\mu</math>g/mL)</b>
<b>Extrato Etanólico</b>	12,27 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>
<b>Extrato Etanólico/<math>\beta</math>CD</b>	7,03 $\pm$ 0,92 <sup>b</sup>
<b>Fração Hexânica</b>	67,66 $\pm$ 1,92 <sup>c</sup>
<b>Fração Hexânica/<math>\beta</math>CD</b>	54,51 $\pm$ 1,15 <sup>c</sup>
<b>Fração Diclorometânica</b>	51,89 $\pm$ 3,68 <sup>d</sup>
<b>Fração Diclorometânica/<math>\beta</math>CD</b>	49,02 $\pm$ 1,04 <sup>d</sup>
<b>Fração em Acetato de Etila</b>	8,13 $\pm$ 0,99 <sup>e</sup>
<b>Fração em Acetato de Etila/<math>\beta</math>CD</b>	4,32 $\pm$ 1,72 <sup>f</sup>
<b>Fração Butanólica</b>	28,27 $\pm$ 0,35 <sup>g</sup>
<b>Fração Butanólica/<math>\beta</math>CD</b>	21,47 $\pm$ 1,28 <sup>g</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

Para o ensaio pelo método do poder de redução do ferro, os valores da concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) para o extrato etanólico e frações na presença de  $\beta$ CD, rutina/ $\beta$ CD (controle positivo) e  $\beta$ CD pura estão apresentadas na Tabela 10. Os valores de CE<sub>50</sub> com absorvância em 0,5 para o poder de redução variam entre 82,21  $\pm$  1,97  $\mu$ g/mL e 932,56  $\pm$  1,57  $\mu$ g/mL.

Considerando os valores de CE<sub>50</sub> da Tabela 10, o composto FAE/ $\beta$ CD apresentou menor CE<sub>50</sub> (82,21  $\pm$  1,97  $\mu$ g/mL), sendo considerado portanto a amostra mais efetiva ( $p < 0,05$ ). De maneira semelhante ao observado com o ensaio realizado com as amostras na forma livre, a fração butanólica foi a amostra menos ativa, apresentando valor de CE<sub>50</sub> igual a 932,56  $\pm$  1,57  $\mu$ g/mL. A rutina/ $\beta$ CD apresentou CE<sub>50</sub> igual a 75,39  $\pm$  0,92  $\mu$ g/mL, conforme pode ser observado na Figura 51.

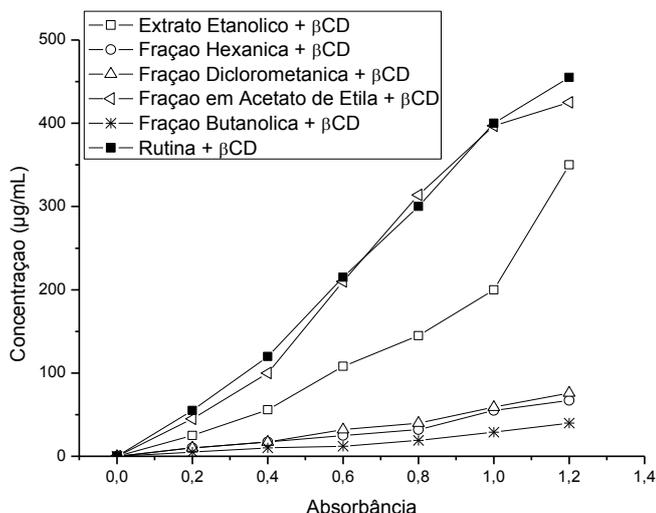
**Tabela 10.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações +  $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução ( $p < 0,05$ ).

<b>Amostras/Controle</b>	<b>CE<sub>50</sub> (<math>\mu</math>g/mL)</b>
<b>Extrato Etanólico/<math>\beta</math>CD</b>	387,21 $\pm$ 1,12
<b>Fração Hexânica/<math>\beta</math>CD</b>	546,02 $\pm$ 1,19
<b>Fração Diclorometânica/<math>\beta</math>CD</b>	502,45 $\pm$ 0,86
<b>Fração em Acetato de Etila/<math>\beta</math>CD</b>	82,21 $\pm$ 1,97
<b>Fração Butanólica/<math>\beta</math>CD</b>	932,56 $\pm$ 1,57
<b>Rutina/<math>\beta</math>CD (controle positivo)</b>	75,39 $\pm$ 0,92

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

**Figura 51.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações/ $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução.



**Fonte:** O autor (2015).

Comparando-se a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e do extrato etanólico e frações/ $\beta$ CD, percebe-se que para todas as amostras houve diminuição do valor de  $CE_{50}$ , mas somente para as amostras de EE/ $\beta$ CD e FAE/ $\beta$ CD essa diminuição foi significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com  $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método do poder de redução ( $p < 0,05$ ).

Amostra	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Extrato Etanólico</b>	$536,90 \pm 1,69^a$
<b>Extrato Etanólico/<math>\beta</math>CD</b>	$387,21 \pm 1,12^b$
<b>Fração Hexânica</b>	$606,88 \pm 1,67^c$
<b>Fração Hexânica/<math>\beta</math>CD</b>	$546,02 \pm 1,19^c$
<b>Fração Diclorometânica</b>	$626,63 \pm 1,03^d$
<b>Fração Diclorometânica/<math>\beta</math>CD</b>	$502,45 \pm 0,86^d$
<b>Fração em Acetato de Etila</b>	$222,95 \pm 1,75^e$
<b>Fração em Acetato de Etila/<math>\beta</math>CD</b>	$82,21 \pm 1,97^f$
<b>Fração Butanólica</b>	$1276,41 \pm 0,70^g$
<b>Fração Butanólica/<math>\beta</math>CD</b>	$932,56 \pm 1,57^g$

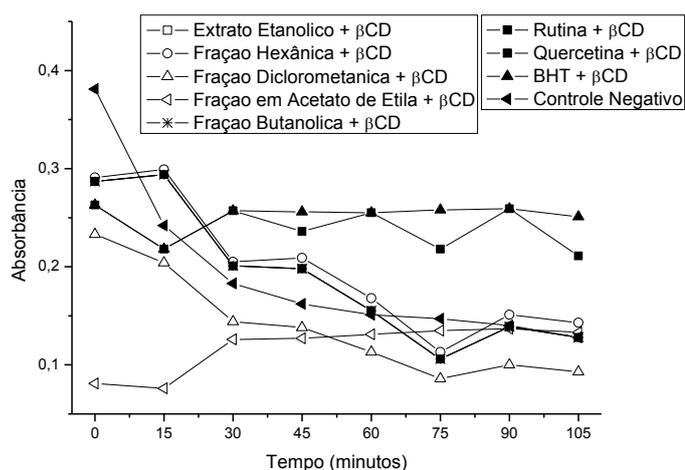
Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015).

A Figura 52 mostra as leituras obtidas das absorvâncias nos tempos (minutos)  $t_0$ ,  $t_5$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{45}$ ,  $t_{60}$ ,  $t_{75}$ ,  $t_{90}$  e  $t_{105}$  do EE/ $\beta$ CD e frações/ $\beta$ CD e dos controles (BHT/ $\beta$ CD, rutina/ $\beta$ CD e quercetina/ $\beta$ CD), para o método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Quanto menor o decaimento, maior a inibição da peroxidação lipídica e consequentemente da oxidação do  $\beta$ -caroteno.

De maneira semelhante ao observado com as amostras livres as composições FH/ $\beta$ CD, FDM/ $\beta$ CD e em FAE/ $\beta$ CD apresentaram menor variação no decaimento, demonstrando maior inibição da peroxidação lipídica. Como pode ser observado, dentre os controles positivos testados, o BHT/ $\beta$ CD e a quercetina/ $\beta$ CD foram o mais ativos, produzindo um menor decaimento das absorvâncias.

**Figura 52.** Decaimento da absorvância em função do tempo para o extrato etanólico e frações/ $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método da cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico.



**Fonte:** O autor (2015)

Considerando a inibição da peroxidação lipídica (%I), o EE/ $\beta$ CD e frações/ $\beta$ CD (500  $\mu$ g/mL – 250  $\mu$ g/mL extrato/fração + 250  $\mu$ g/mL  $\beta$ CD), bem como controles positivos (25  $\mu$ g/mL), produziram valores entre 32 e 83% (Tabela 12). Nesta tabela, fica evidenciado que a fração em acetato de etila, com inibição igual a 76%, foi a mais ativa seguida das frações hexânica e diclorometânica, com 56 e 42% de inibição, respectivamente.

**Tabela 12.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações +  $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico ( $p < 0,05$ ).

<b>Amostra/Controle</b>	<b>% Inibição da peroxidação lipídica</b>
Extrato Etanólico/ $\beta$ CD	37 $\pm$ 1,13a,c,d
Fração Hexânica/ $\beta$ CD	56 $\pm$ 3,94a
Fração Diclorometânica/ $\beta$ CD	42 $\pm$ 4,62a
Fração em Acetato de Etila/ $\beta$ CD	76 $\pm$ 1,27b
Fração Butanólica/ $\beta$ CD	32 $\pm$ 3,37c
Rutina/ $\beta$ CD	37 $\pm$ 1,04d
Quercetina/ $\beta$ CD	83 $\pm$ 5,92b
BHT/ $\beta$ CD	80 $\pm$ 1,72b

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015).

Ao comparar a atividade antioxidante do EE e frações livres e do EE/ $\beta$ CD e frações/ $\beta$ CD, percebe-se que houve um aumento significativo do percentual de inibição da peroxidação lipídica para a composição FAE/ $\beta$ CD, indicando aumento da capacidade antioxidante devido o encapsulamento com  $\beta$ CD (Tabela 13).

**Tabela 13.** Atividade antioxidante do extrato etanólico e frações livres e encapsulados com  $\beta$ CD das folhas de *B. pinnatum* pelo método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico ( $p < 0,05$ ).

<b>Amostra</b>	<b>% Inibição da peroxidação lipídica</b>
<b>Extrato Etanólico</b>	36 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>
<b>Extrato Etanólico/<math>\beta</math>CD</b>	37 $\pm$ 1,13 <sup>a</sup>
<b>Fração Hexânica</b>	40 $\pm$ 2,73 <sup>b</sup>
<b>Fração Hexânica/<math>\beta</math>CD</b>	56 $\pm$ 6,94 <sup>c</sup>
<b>Fração Diclorometânica</b>	38 $\pm$ 3,29 <sup>d</sup>
<b>Fração Diclorometânica/<math>\beta</math>CD</b>	42 $\pm$ 4,62 <sup>d</sup>
<b>Fração em Acetato de Etila</b>	65 $\pm$ 0,82 <sup>e</sup>
<b>Fração em Acetato de Etila/<math>\beta</math>CD</b>	76 $\pm$ 1,27 <sup>f</sup>
<b>Fração Butanólica</b>	37 $\pm$ 3,06 <sup>g</sup>
<b>Fração Butanólica/<math>\beta</math>CD</b>	32 $\pm$ 3,37 <sup>g</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. As médias diferem entre si após análise de variância seguida do teste de Tukey para  $p < 0,05$ .

**Fonte:** O autor (2015)

Diante dos resultados apresentados, foi possível observar a  $\beta$ CD foi capaz de melhorar a atividade antioxidante do EE, FAE e FH.

No ensaio de DPPH é avaliada a habilidade de sequestrar radicais livres de um composto antioxidante que é intimamente associado com a capacidade dessa substância em doar átomos de hidrogênio (YANG et al., 2008). A melhora na atividade antioxidante do extrato etanólico e da composição FAE/ $\beta$ CD quando comparado à forma livre dessas amostras, pode ser atribuído às mudanças na capacidade de doação do átomo de hidrogênio, como consequência do processo de encapsulação.

A melhora da atividade antioxidante do extrato etanólico e da fração em acetato de etila na presença de  $\beta$ CD pode ser associada também com o aumento da solubilidade e biodisponibilidade dos compostos presente na fração após o encapsulamento, o que favorece a interação dos constituintes antioxidantes como radical DPPH (STRAZISAR et al. 2008; ALVAREZ-PARRILLA et al. 2005; FERREIRA, 2009).

Um mecanismo proposto para explicar o aumento da capacidade antioxidante se fundamenta no efeito das interações intermoleculares entre  $\beta$ CD e as moléculas encapsuladas. Quando os compostos do extrato etanólico e da fração em acetato de etila (flavonoides) estão conjugados com a  $\beta$ CD uma ou várias ligações de hidrogênio podem ser formadas entre os átomos de hidrogênio das hidroxilas dos flavonoides com átomos de oxigênio presentes no interior da cavidade da  $\beta$ CD. Essas novas ligações entre os componentes da fração e a  $\beta$ CD enfraquecem as ligações covalentes entre o hidrogênio e o oxigênio das hidroxilas e consequentemente a doação de hidrogênio por esse grupamento torna-se mais fácil (NGUYEN et al., 2013; JULLIAN et al., 2007; MERCADER-ROS et al., 2010).

No método do poder de redução de íons  $Fe^{2+}$ , de acordo com Lue et al. (2010), os componentes hidrofóbicos quando presentes em um sistema aquoso possuem capacidade de redução limitada do íon ferro. Como esse ensaio é desenvolvido em meio aquoso, a solubilidade aquosa do antioxidante testado tem que ser considerada, pois é um fator que influencia diretamente o ensaio. Assim, o aumento da atividade antioxidante apresentada pelo composto de inclusão por este método, pode ser também ser associada à melhoria da solubilidade dos compostos presentes no extrato etanólico e fração em acetato de etila que possuem atividade antioxidante (STRAZISAR et al. 2008; ALVAREZ-PARRILLA et al. 2005; FERREIRA, 2009; NGUYEN et al., 2013).

Em relação método de cooxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, observou-se que as frações hexânica e em acetato de etila (hidrofóbicas) foram as que apresentaram maior potencial antioxidante na forma livre. Além disso, foram as únicas que tiveram sua

capacidade antioxidante aumentada após o processo de encapsulamento com  $\beta$ CD. Por se tratar de um método onde as reações de inibição da peroxidação lipídica ocorrem na interface óleo-água, especula-se que a interação da  $\beta$ CD com os componentes das frações hexânica e acetato de etila aumentem a disponibilidade das espécies nessa região, por provocar uma redução da hidrofobicidade.

Apesar de as metodologias utilizadas no estudo possuírem mecanismos antioxidantes diferentes, é importante destacar que os resultados obtidos através dos ensaios *in vitro* devem ser corroborados com experimentos *in vivo*, visto que a ação dos antioxidantes não se limita ao sequestro de radicais livres, mas também envolve outros mecanismos como a suprarregulação de enzimas antioxidantes e modulação de sinalização redox nas células, desse modo, sendo necessário a realização de testes *in vivo* e celulares (CAROCHO et al., 2013; HUANG et al., 2005; LÓPEZ-ALARCÓN et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2008; PINCHUK et al., 2012).

#### 5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DAS FORMULAÇÕES COM EXTRATO ETANÓLICO LIVRE E EXTRATO ETANÓLICO/ $\beta$ CD

A *Bryophyllum pinnatum* é uma planta popularmente utilizada no tratamento tópico de inflamações e feridas, e apesar de sua atividade anti-inflamatória ter sido relatada na literatura (OJEWOLE, 2005; SOUSA et al., 2005; AFZAL et al., 2012b), ainda são poucos os estudos que avaliam a ação tópica de formulações com o extrato obtido das folhas da planta pelo modelo de edema de orelha. Além disso, não encontramos relatos de avaliações de sua atividade anti-inflamatória tópica quando as mesmas estão na forma de composto de inclusão com a  $\beta$ -ciclodextrina.

Assim a investigação da atividade anti-inflamatória tópica de formulações nanoencapsuladas de extrato etanólico de *B. pinnatum* se faz necessária para comprovação da eficácia dessa espécie no tratamento das doenças inflamatórias cutâneas, considerando que o uso tradicional não é suficiente para validar eticamente nenhuma planta medicinal como um medicamento seguro e eficaz e, devido às vantagens promovidas pela complexação do extrato vegetal quando comparado com a utilização de sua forma isolada (LAPA et al., 2010, QUINTANS et al., 2013).

O processo inflamatório é caracteriza-se por quatro sinais clássicos: calor, eritema, edema e dor. Então, a utilização do edema como parâmetro de avaliação em modelos validados, como o modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes flogísticos,

permite avaliar o potencial anti-inflamatório tanto por via tópica quanto sistêmica de diversos agentes, sejam eles compostos sintéticos, extratos de plantas ou compostos isolados (GÁBOR, 2003; DE YOUNG et al., 1989). Além disso, quando o objetivo do estudo é o desenvolvimento de formulações para uso tópico, esse modelo de avaliação de atividade anti-inflamatória oferece ainda a vantagem de identificar compostos que apresentam uma absorção cutânea apropriada de maneira a atingir concentrações adequadas na pele para exercer um efeito farmacológico e, ainda possui como vantagem o fato de ser uma metodologia bastante simples e rápida, que requer pequena quantidade de amostra, possui boa reprodutibilidade, fornece resultados rápidos e com elevado grau de confiança (GÁBOR, 2000; BOUCLIER et al., 1990).

O óleo de cróton é um potente agente irritante obtido da espécie *Croton tiglium L.* (Euphorbiaceae) conhecida por sua ação flogística. É constituído por uma mistura de lipídeos, em que o 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA), agente com potente ação irritante, é um dos principais ésteres de forbol presentes no óleo (SARAIVA et al., 2011).

O modelo de edema de orelha induzido por TPA consiste em um modelo útil para a triagem da atividade anti-inflamatória de compostos que agem na fase aguda da inflamação, assim como em processos inflamatórios hiperproliferativos (GÁBOR., 2000; MARKS, 1990). A aplicação tópica do TPA induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada pela presença da vasodilatação e formação de eritema já nas primeiras duas horas, seguido do aumento da espessura da orelha devido ao extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24 horas. A aderência dos leucócitos polimorfonucleares (PMN) na parede dos vasos e a desgranulação dos mastócitos é verificada entre a 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> hora. No entanto, a infiltração máxima de leucócitos PMN no tecido é atingida somente 24 horas após a aplicação tópica do TPA (YOUNG et al., 1983). O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da proteína quinase C (PKC), assim como a ativação sequencial da via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), indução da expressão da ciclooxigenase 2 (COX – 2) e translocação/ativação da lipoxigenase (LOX), que por sua vez resulta na síntese e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação de edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). A ativação da via da MAPK pela PKC promove a ativação de alguns fatores de transcrição nuclear, como o NF-κB e a AP-1, os quais tem papel de destaque na regulação da produção de variadas proteínas pró-inflamatórias, como por exemplo algumas

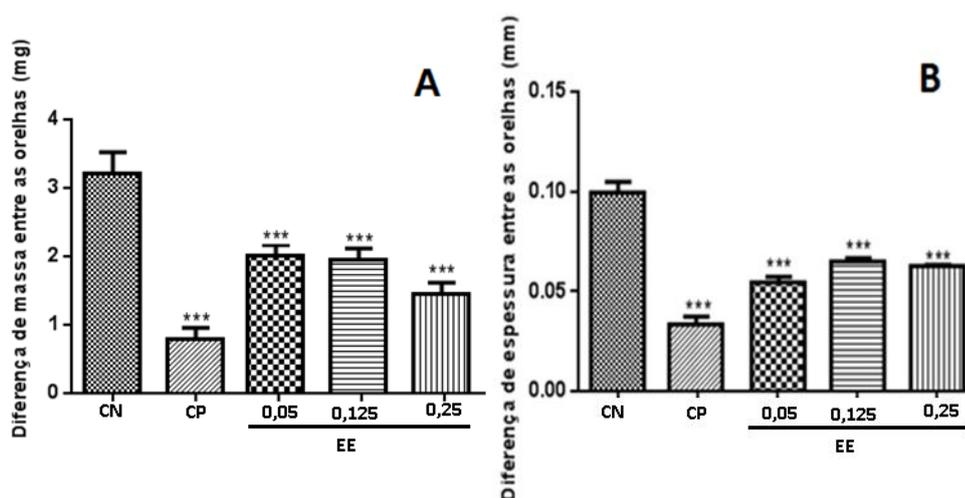
citocinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), enzimas pró-inflamatórias (COX-2, iNOS) e moléculas de adesão (PASCUAL et al., 2006; GLASS et al., 2006; GARCIA-PIÑERES et al., 2001; SANCHEZ, et al., 1999). Enquanto a fosforilação da PLA<sub>2</sub> pela PKC resulta na liberação do ácido araquidônico (AA) seguida da produção de prostaglandinas e leucotrienos via COX e LOX, respectivamente (WANG et al., 2000; YOUNG et al., 1984).

Um acréscimo dos níveis teciduais dos metabólitos da via do AA, principalmente a PGE<sub>2</sub> e o LTB<sub>4</sub> parece ser determinante para que o processo inflamatório se inicie após a aplicação do TPA (MURAKAWA et al., 2006). Os metabólitos da via do AA sintetizados via 5-LOX são moléculas essenciais para a formação do edema e infiltração leucocitária nesse modelo, considerando que a PGE<sub>2</sub> contribui com o aumento do fluxo sanguíneo devido a sua ação vasodilatadora, enquanto os leucotrienos são responsáveis pelo extravasamento plasmático e conseqüente formação do edema e infiltração leucocitária (NAKAMURA et al., 2003; YOUNG et al., 1984). Estudos recentes apontam que a resposta inflamatória do tipo persistente, característica desse modelo, é devido à produção sequencial de mediadores inflamatórios como os eicosanóides e citocinas, em que a PGE<sub>2</sub> e o TNF $\alpha$  seriam os principais mediadores edematogênicos (MARAKAWA et al., 2006). Mas, pode-se afirmar com certeza é que os metabólitos da via do AA são os principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pelo óleo de cróton. Assim, aqueles compostos que são capazes de inibir a cascata do AA possuem atividade significativa no modelo de edema de orelha induzido pelo TPA, como efetivamente é observado pelos corticóides, inibidores da PLA<sub>2</sub> e inibidores da COX e/ou LOX (GÁBOR, 2000; GÁBOR, 2003).

O potencial anti-inflamatório das formulações semissólidas contendo EE na forma livre das folhas de *B. pinnatum* são apresentados a seguir. A partir da análise das figuras percebe-se que a aplicação tópica do óleo de cróton na orelha dos camundongos promoveu um aumento significativo da massa e da espessura da orelha, se tornando visualmente perceptível após a sexta hora do desafio com esse agente flogístico (Figura 53A e 53B).

Esse aumento foi significativamente reduzido pela aplicação tópica do EE nas concentrações de 0,05 mg/orelha, 0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha. Na concentração de 0,05 mg do EE o edema foi inibido em 34,% (p < 0,001), enquanto a concentração de 0,25 mg/orelha reduziu em 44% (p < 0,001). O edema de orelha foi diminuído em 39% após a aplicação de 0,125 mg desse extrato (p < 0,001), conforme observado na tabela 14.

**Figura 53.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. **A.** Diferença de massa entre as orelhas (mg). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). **B.** Diferença de espessura entre as orelhas (mm). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de espessura entre as orelhas (mm). As medidas diferem em relação ao controle negativo (CN, acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo CN (acetona). CP: controle positivo – dexametasona.



**Fonte:** O autor (2015)

**Tabela 14.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. \*\*\* $p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

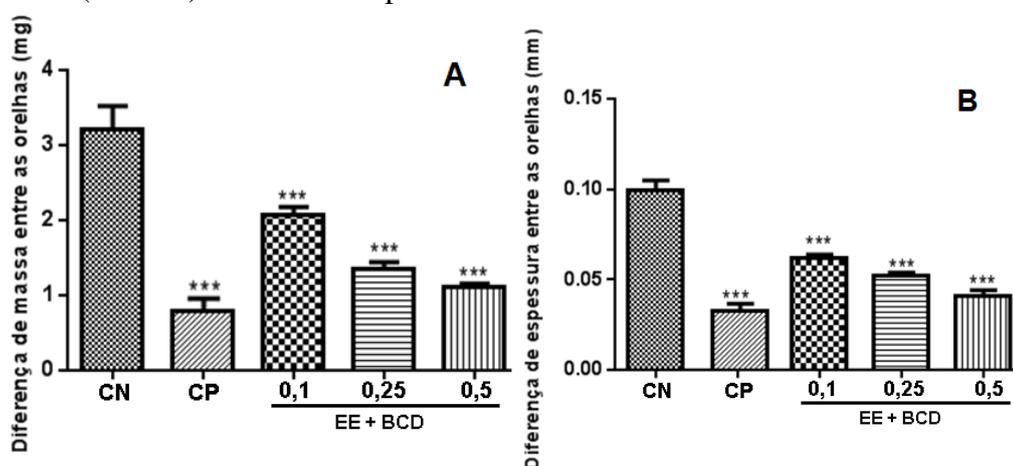
Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 $\mu$ L/orelha	3,2 $\pm$ 0,85	0
Extrato Etanólico	0,05 mg/orelha	2,11 $\pm$ 0,5***	34
	0,125 mg/orelha	1,94 $\pm$ 0,45***	39
	0,25 mg/orelha	1,77 $\pm$ 0,24***	44
Dexametasona	0,1 mg/orelha	0,78 $\pm$ 0,24***	75

**Fonte:** O autor (2015)

Na presença de  $\beta$ CD, a aplicação tópica do óleo de cróton na orelha dos camundongos também promoveu um aumento significativo da massa e da espessura da orelha após a sexta hora de aplicação do óleo de cróton, como pode ser observado nas figuras 54A e 54B. Esse aumento foi significativamente reduzido pela aplicação tópica do EE/ $\beta$ CD nas concentrações de 0,1 mg/orelha, 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha. Na concentração de 0,1 mg do EE/ $\beta$ CD o edema foi inibido em 35% ( $p < 0,001$ ), enquanto a concentração de 0,5 mg/orelha reduziu em

65% ( $p < 0,001$ ). O edema de orelha foi diminuído em 58% após a aplicação de 0,25 mg do EE/ $\beta$ CD ( $p < 0,001$ ). A dexametasona, um agente anti-inflamatório esteróide utilizado nesse estudo como controle positivo, como esperado, inibiu o edema em 75% ( $p < 0,001$ ) (Tabela 15).

**Figura 54.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum*/ $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. **A.** Diferença de massa entre as orelhas (mg). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). **B.** Diferença de espessura entre as orelhas (mm). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de espessura entre as orelhas (mm). As medidas diferem em relação ao controle negativo (CN, acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo CN (acetona). CP: controle positivo – dexametasona.



**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 15.** Efeito do extrato etanólico + $\beta$ CD de *B. pinnatum* sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. \*\*\* $p < 0,001$ , diferente do grupo controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

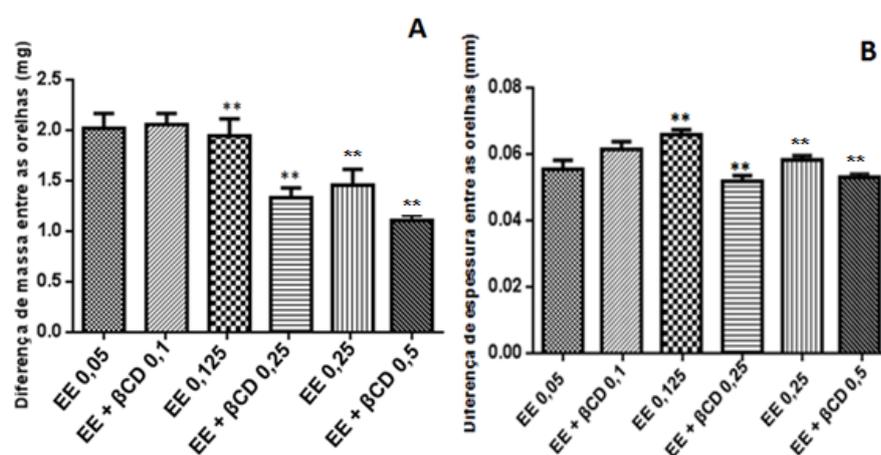
Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 $\mu$ L/orelha	3,2 $\pm$ 0,85	0
	0,1 mg/orelha	2,07 $\pm$ 0,28***	35
Extrato Etanólico + $\beta$ CD	0,25 mg/orelha	1,34 $\pm$ 0,25***	58
	0,5 mg/orelha	1,1 $\pm$ 0,14***	65
Dexametasona	0,1 mg/orelha	0,78 $\pm$ 0,24***	75

**Fonte:** O autor (2015)

Quando comparado os efeitos do extrato etanólico livre do EE/ $\beta$ CD nas suas concentrações correspondentes, percebe-se que nas concentrações de 0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha de extrato etanólico livre e suas correspondentes 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha de

EE/ $\beta$ CD respectivamente, apresentaram diferenças significativas na redução da massa e da espessura das orelhas ( $p < 0,01$ ) (Figura 55A e 55B), enquanto que o tratamento de menor concentração apresentou a mesma capacidade de reduzir o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton seja na forma livre ou encapsulado com  $\beta$ CD (Tabela 16).

**Figura 55.** Comparação do efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* na forma livre e encapsulado com  $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. **A.** Diferença de massa entre as orelhas (mg), **B.** Diferença de espessura entre as orelhas (mm). As medidas diferem em relação as concentrações correspondentes do EE e EE/ $\beta$ CD após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: \*\* $p < 0,01$ , EE vs EE/ $\beta$ CD.



**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 16.** Efeito do extrato etanólico livre e encapsulado com  $\beta$ CD sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. \*\* $p < 0,01$ , diferença significativa entre o grupo tratado EE e EE/ $\beta$ CD após análise de variância seguida do teste de Student-Newman-keuls.

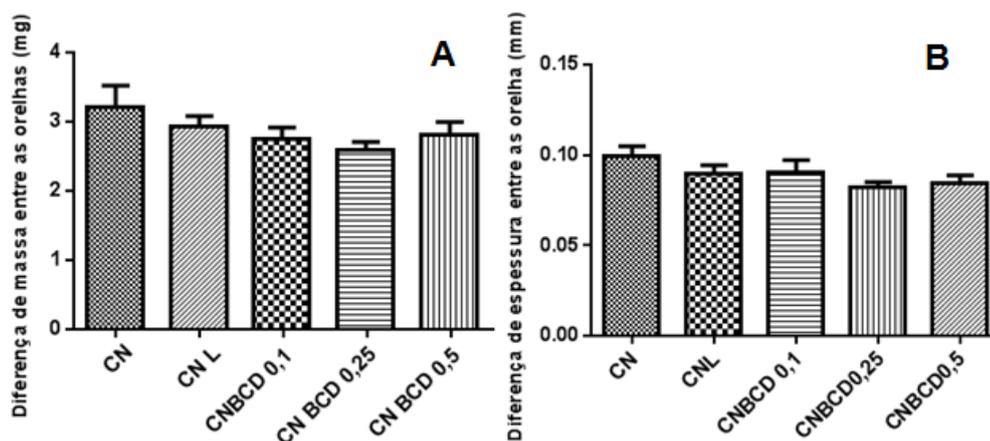
Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Extrato Etanólico livre	0,05 mg/orelha	2,11 $\pm$ 0,5 <sup>ns</sup>	34 <sup>ns</sup>
	0,125 mg/orelha	1,94 $\pm$ 0,45 <sup>**</sup>	39 <sup>**</sup>
	0,25 mg/orelha	1,77 $\pm$ 0,24 <sup>**</sup>	44 <sup>**</sup>
Extrato etanólico/ $\beta$ CD	0,1 mg/orelha	2,07 $\pm$ 0,28 <sup>ns</sup>	35 <sup>ns</sup>
	0,25 mg/orelha	1,34 $\pm$ 0,25 <sup>**</sup>	58 <sup>**</sup>
	0,5 mg/orelha	1,1 $\pm$ 0,14 <sup>**</sup>	65 <sup>**</sup>

**Fonte:** O autor (2015)

Vale ressaltar que a aplicação tópica dos controles, ou seja, a base lanette pura ou a base lanette contendo o agente de encapsulação ( $\beta$ CD), não foram capazes de promover uma

redução significativa no edema (Figuras 56A e 56B). Os valores de porcentagem de inibição do edema estão presentes na tabela 17, confirmando esses resultados.

**Figura 56.** Efeito da base creme lanette pura e base creme lanette com  $\beta$ CD. **A.** Diferença de massa entre as orelhas (mg). **B.** Diferença de espessura entre as orelhas (mm).



**A.** Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de massa entre as orelhas (mg). **B.** Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. da diferença de espessura entre as orelhas (mm). As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores não significativos: ns vs grupo controle negativo (acetona). **CNL:** controle negativo lanette; **CNBCD 0,1:** controle negativo  $\beta$ CD 0,1 mg/orelha; **CNBCD 0,25:** controle negativo  $\beta$ CD 0,25 mg/orelha; **CNBCD 0,5:** controle negativo  $\beta$ CD 0,5 mg/orelha.

**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 17.** Efeito do veículo (base lanette) e do excipiente ( $\beta$ CD) sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. Não significativo (ns) em relação ao grupo controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

Grupo	Concentração	Massa do edema (mg)	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 $\mu$ L/orelha	3,2 $\pm$ 0,85	0%
Lanette	-----	2,90 $\pm$ 0,93 <sup>ns</sup>	9
Bcd	0,1 mg/orelha	2,74 $\pm$ 0,43 <sup>ns</sup>	14
	0,25 mg/orelha	2,68 $\pm$ 0,20 <sup>ns</sup>	16
	0,5 mg/orelha	2,81 $\pm$ 0,47 <sup>ns</sup>	12

**Fonte:** O autor (2015)

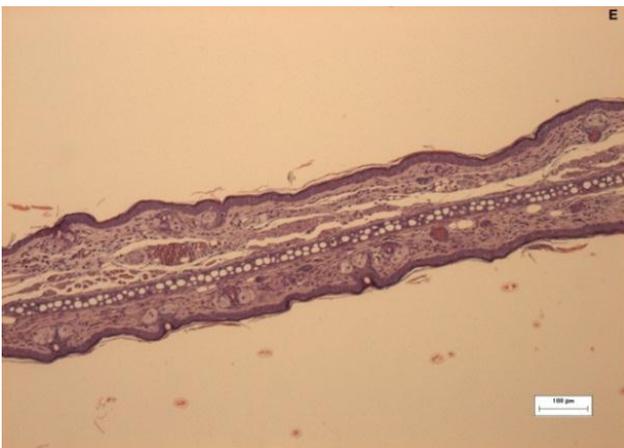
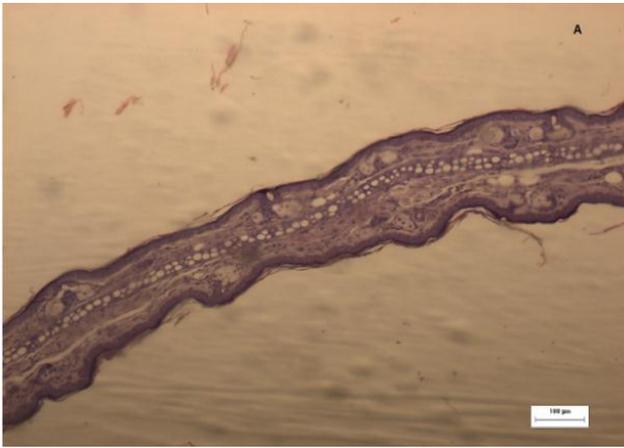
Ainda com a finalidade de confirmar e compreender melhor o efeito anti-inflamatório das formulações semissólidas no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação única do óleo de cróton, foram realizadas análises histológicas de parâmetros morfológicos da inflamação.

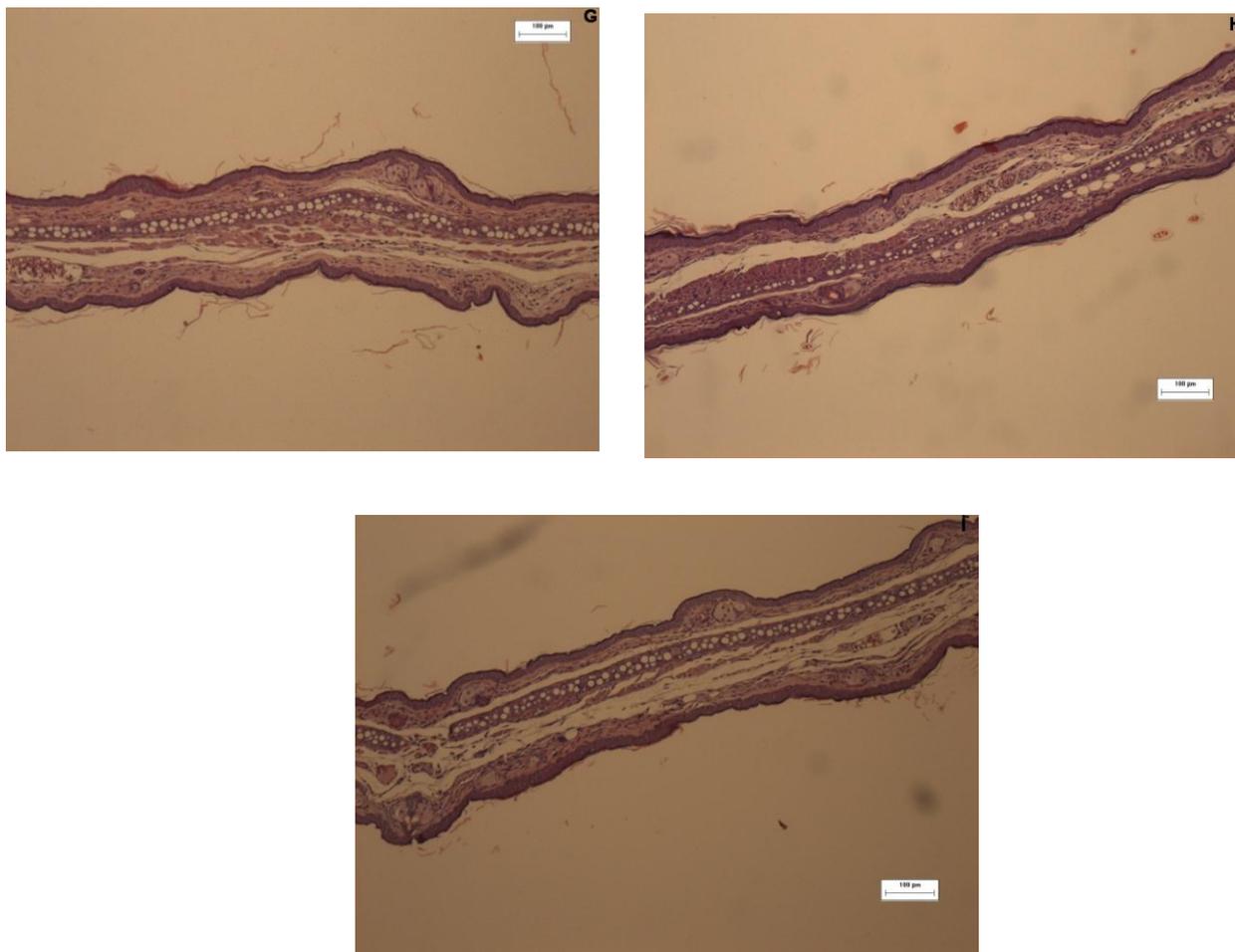
No modelo de inflamação aguda utilizada neste estudo, são apresentadas fotos representativas dos cortes histológicos (ampliados 100x, escala 100  $\mu$ m) de orelhas de camundongos de cada grupo experimental que receberam como tratamento, a formulação semissólida com o extrato livre e o extrato encapsulado com  $\beta$ CD, respectivamente (Figura 57).

Ao comparar o grupo sem inflamação (Figura 57A) com o grupo controle negativo (Figura 57B), é verificado que a aplicação do óleo de cróton produziu um aumento acentuado da espessura da orelha (derme), acompanhado pela ruptura do tecido conjuntivo, com desorganização das fibras da matriz extracelular. Após a aplicação da dexametasona (0,1mg/orelha), controle positivo, a inibição do edema foi um tanto expressiva, como pode ser visualizado na Figura 57C.

O tratamento dos tecidos com as formulações contendo o extrato livre e encapsulado com  $\beta$ CD foram também capazes de reduzir a formação do edema, ou seja, a espessura da derme. Tal redução pode ser constatada nos cortes histológicos apresentados nas Figuras 57D à 57I.

**Figura 57.** Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito de formulação semissólida com extrato etanólico de *B. pinnatum* na forma livre sobre o tamanho do edema (espessamento da derme).



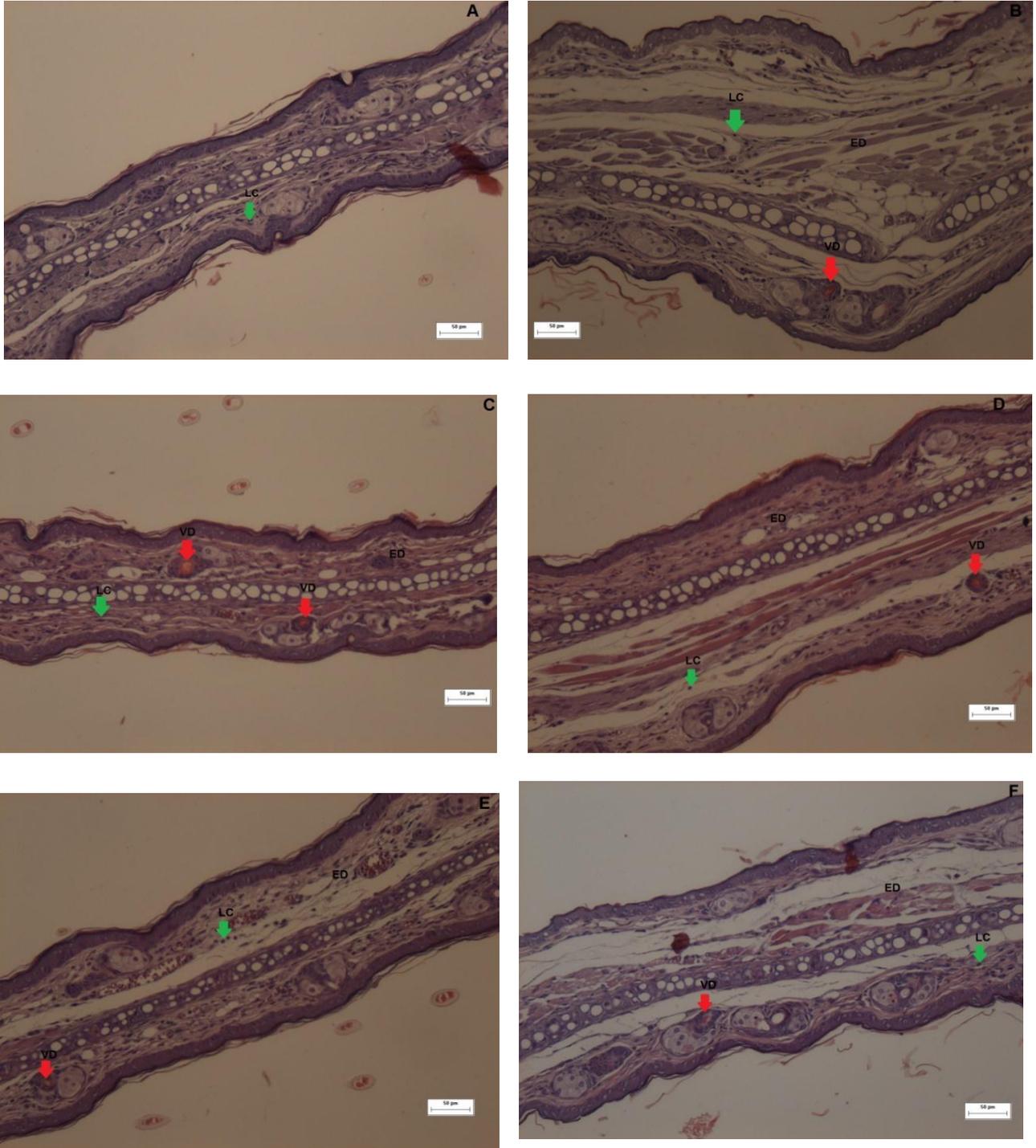


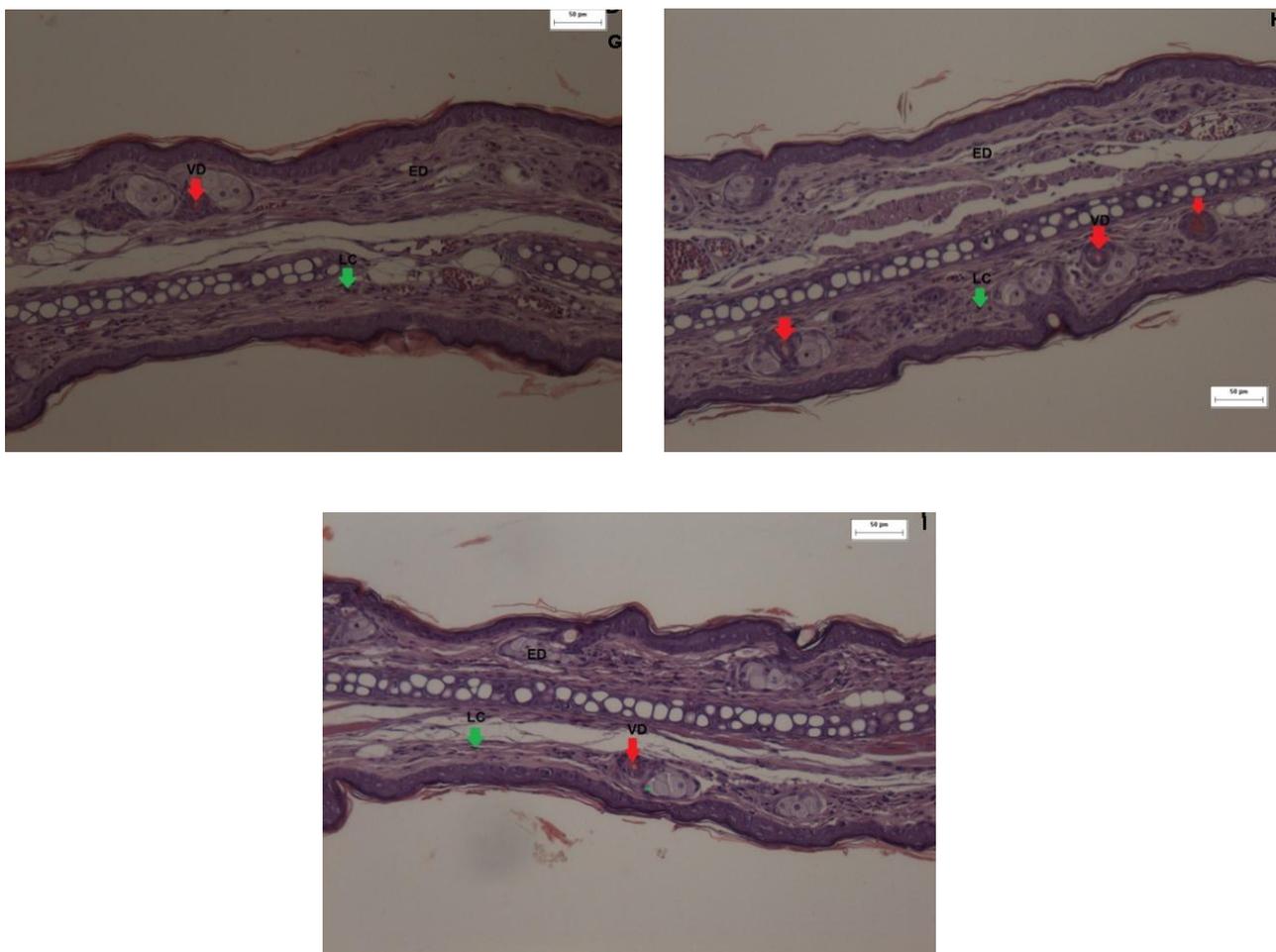
Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 100  $\mu$ m). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona). (C) Dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE livre 0,05 mg/orelha; (E) EE livre 0,125 mg/orelha; (F) EE livre 0,25 mg/orelha, (G) EE+ $\beta$ CD 0,1 mg/orelha; (H) EE+ $\beta$ CD 0,25 mg/orelha; (I) EE+ $\beta$ CD 0,5 mg/orelha.

**Fonte:** O autor (2015).

Analisando ainda os parâmetros de inflamação nas amostras das orelhas, através da Figura 58 (cortes histológicos em aumento de 200x, escala 50  $\mu$ m), observa-se que o óleo de cróton, além dos efeitos citados inicialmente, causou também vasodilatação e infiltração de leucócitos polimorfos nucleares na derme e que tais parâmetros inflamatórios foram suprimidos pelo tratamento tópico com as formulações com o extrato na forma livre nas concentrações de 0,125mg/orelha e 0,25 mg/orelha e na forma encapsulada com  $\beta$ CD nas concentrações 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha; assim como pela dexametasona (0,1 mg/orelha).

**Figura 58.** Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação única de óleo de cróton: efeito de formulação semissólida com extrato etanólico de *B. pinnatum* na forma livre e encapsulado sobre vasodilatação e infiltração de leucócitos.





Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (100x, escala de 50  $\mu\text{m}$ ). (A) Basal (sem inflamação); (B) Controle (acetona). (C) Dexametasona 0,1 mg/orelha; (D) EE livre 0,05 mg/orelha; (E) EE livre 0,125 mg/orelha; (F) EE livre 0,25 mg/orelha; (G) EE/ $\beta$ CD 0,1 mg/orelha; (H) EE/ $\beta$ CD 0,25 mg/orelha; (I) EE/ $\beta$ CD 0,5 mg/orelha; (ED) edema/espessamento da derme; (VD) vasodilatação; (LC) leucócitos.  
**Fonte:** O autor (2015)

Com o objetivo de confirmar as diferenças obtidas entre os tratamentos com a forma livre e o encapsulado com  $\beta$ CD do extrato, o efeito inibitório dos tratamentos foi avaliado também através da avaliação da medida da espessura do tecido edematoso ( $\mu\text{m}$ ) nos cortes teciduais examinados através do programa IMAGE-PRO<sup>®</sup> PLUS (Tabela 18). Nesta análise, nas concentrações de 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha de EE/ $\beta$ CD percebe-se diferença significativa na redução do edema quando comparado as concentrações correspondentes no tratamento com o extrato na forma livre (0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha).

**Tabela 18.** Efeito do tratamento com formulações semissólidas com o extrato etanólico na forma livre e encapsulada com  $\beta$ CD sobre o tamanho do edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton. Medidas de espessura do tecido edematoso ( $\mu\text{m}$ ) em cinco regiões aleatórias de cada corte histológico através de fotomicrografia utilizando o programa IMAGE-PRO<sup>®</sup> PLUS. Cada grupo foi representado por quatro cortes histológicos (n=4). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. \*\*  $p < 0,01$ , diferença significativa entre o grupo tratado com extrato etanólico livre e EE/ $\beta$ CD após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

Grupo	Concentração	Tamanho do edema ( $\mu\text{m}$ )	Inibição do edema (%)
Controle (acetona)	20 $\mu\text{L}$ /orelha	327,77 $\pm$ 15,33	0%
Basal (sem óleo de cróton)	----	155,55 $\pm$ 20,14	----
	0,05 mg/orelha	215,11 $\pm$ 41,8 <sup>ns</sup>	34,37 <sup>ns</sup>
Extrato Etanólico livre	0,125 mg/orelha	211,15 $\pm$ 24,5 <sup>**</sup>	35,57 <sup>**</sup>
	0,25 mg/orelha	193,77 $\pm$ 6,46 <sup>**</sup>	40,88 <sup>**</sup>
	0,1 mg/orelha	205,47 $\pm$ 18,22 <sup>ns</sup>	37,31 <sup>ns</sup>
Extrato etanólico + $\beta$ CD	0,25 mg/orelha	189,63 $\pm$ 7,41 <sup>**</sup>	42,14 <sup>**</sup>
	0,5 mg/orelha	155,57 $\pm$ 5,72 <sup>**</sup>	52,53 <sup>**</sup>
	Dexametasona	0,1 mg/orelha	118,54 $\pm$ 13,02

Fonte: O autor (2015)

Os resultados no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton mostraram que, na resposta inflamatória aguda, as formulações semissólidas com EE/ $\beta$ CD foram capazes de inibir o edema (Tabelas 16 e 18), promovendo resposta semelhante à da dexametasona (corticoesteróide). Evidencia-se a atividade anti-edematogênica das formulações semissólidas com os complexos de inclusão EE/ $\beta$ CD 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha que apresentaram redução do edema de orelha induzida pelo óleo de cróton com diferença estatística quanto comparada as formulações semissólidas com o EE correspondente (0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha, respectivamente), e equivalente ao controle positivo (Tabela 16). Através da análise da Figura 53 e da Tabela 17 percebe-se que essa ação anti-edematogênica não sofre influência dos componentes utilizados da fórmula do veículo (base lanette) e nem do agente encapsulante do extrato ( $\beta$ CD) utilizada no estudo. Essa ação edematogênica apresentada pelas formulações semissólidas (EE/ $\beta$ CD) pode ser atribuída à redução da permeabilidade vascular, já que através da análise histológica (Figura 54 e 55) observou-se que quando comparado os tratados com o grupo controle negativo, as formulações foram capazes de diminuir a vasodilatação e conseqüentemente a infiltração de leucócitos polimorfos nucleares, principalmente neutrófilos, por se tratar de um processo inflamatório agudo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; CHRISTY et al., 2013; GEERING et al., 2013).

Diversos metabólitos com atividade anti-inflamatória já foram isolados e identificados nos extratos das folhas de *B. pinnatum* (AFZAL et al., 2012a; AFZAL et al., 2012b), dentre

eles destaca-se a  $\alpha$ -amirina, um triterpeno pentacíclico, cuja aplicação tópica apresentou efeito dose-dependente na diminuição do edema induzido por TPA em ratos. O efeito anti-inflamatório é uma atividade comum dos triterpenos (MAHATO et al., 1988; PRICE et al., 1987). Nesse sentido, existe um grande interesse por essa classe de metabólitos secundários devido ao seu vasto espectro de atividades farmacológicas. O mecanismo de ação dessa classe de metabólito na atividade antinflamatória é através da inibição da enzima COX-2, a produção de NO, modulação da expressão de moléculas de adesão, via inibição de NF- $\kappa$ B e, ainda por serem capazes de inibir a isoenzima fosfodiesterase, um novo alvo intracelular na pesquisa de novas drogas com capacidade anti-inflamatória (WEE et al., 2005; ZHANG et al., 2003). Além disso, a aplicação tópica do agente flogístico TPA em camundongos induz um estresse oxidativo e/ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e em seguida é observado hiperplasia epidermal (RAHMAN et al., 2008). Levando-se em conta a ocorrência do estresse oxidativo resultante da aplicação do óleo de cróton, a presença de flavonóides com atividade antioxidante e anti-inflamatória em *B. pinnatum*, como a quercetina, rutina, canferol e luteolina, podem também justificar o efeito anti-inflamatório tópico via modulação de enzimas relacionadas com o metabolismo do AA, como a PLA<sub>2</sub>, COX e/ou LOX, assim como a inibição do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B, dependendo da estrutura do composto (GOKBULUT et al., 2013; GARCÍA-MEDIAVILLA et al., 2007; MUZITANO et al., 2011; MAJAZ et al., 2011; BALAMURUGAN et al., 2012; LEE et al., 2013;), justificando desse modo o uso tradicional de muitos extratos de plantas como anti-inflamatórios, cujos constituintes fitoquímicos presentes são os flavonóides (YANAMOTO et al., 2001; PARK et al., 2003).

Em vista dos resultados positivos observados com a fração livre e encapsulado do extrato sugere-se que entre os diversos mecanismos de ação envolvidos na atividade anti-inflamatória da *B. pinnatum*, aquele que envolve a inibição da via do ácido araquidônico desempenha um papel importante nesse processo através da supressão dos seus metabólitos no local inflamado e os efeitos decorrentes do mesmo, como edema, vasodilatação e infiltração de leucócitos. Tal hipótese de mecanismo de ação pode ser fortalecida devido à presença de flavonóides no extrato etanólico da planta em questão, os quais desempenham efeito anti-inflamatório pela inibição da PLA<sub>2</sub>, COX, LOX, iNOS (COUTINHO et al., 2009; CHIBILI, 2013).

O uso da  $\beta$ CD para o encapsulamento do extrato vegetal apresentou como vantagem a promoção de uma liberação sustentada dos compostos ativos do extrato, otimizando portanto a sua eficácia quando comparada a aplicação do extrato na forma livre, já que esse tipo de

liberação é capaz de suprir a pele por um período de tempo mais prolongado (MONACO, 2000; SCHMALTZ et al., 2005; GUTERRES et al., 2006).

Além disso, a melhora da atividade anti-inflamatória da formulação semissólida com o extrato na fórmula encapsulado quando comparado à forma livre pode ser associado também ao fato dos compostos de inclusão apresentarem a tendência de se acumular nos tecidos inflamados, mediante a formação de ligações de hidrogênio das hidroxilas das ciclodextrinas com constituintes celulares, aumentando o tempo de permanência dos compostos no tecido (GUTERRES et al., 2006; KREUTER, 1994; SCHAFFAZICK et al., 2003).

O modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton também permite avaliar outros parâmetros inflamatórios relacionados a muitas doenças cutâneas, como por exemplo, a infiltração leucocitária no tecido lesado durante uma resposta inflamatória aguda (WINYARD, 2003; GÁBOR, 2000). Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para a região exposta a um estímulo nocivo. Esse processo envolve uma interação complexa dos leucócitos com o endotélio através da expressão de moléculas de adesão de superfície (selectinas, ICAM- moléculas de adesão intercelular e integrinas) sendo também facilitado pela ação de agentes quimiotáticos como a IL-8, C5a e LTB4 (RANG et al., 2012; SHERWOOD et al., 2004; ARNHOLD, 2003). Uma vez no local inflamado, os neutrófilos liberam diversas substâncias, tais como ROS, mediadores pró-inflamatórios e enzimas proteolíticas, como a mieloperoxidase (MPO), contribuindo de maneira significativa na manutenção do processo inflamatório (BRADLEY et al., 1982).

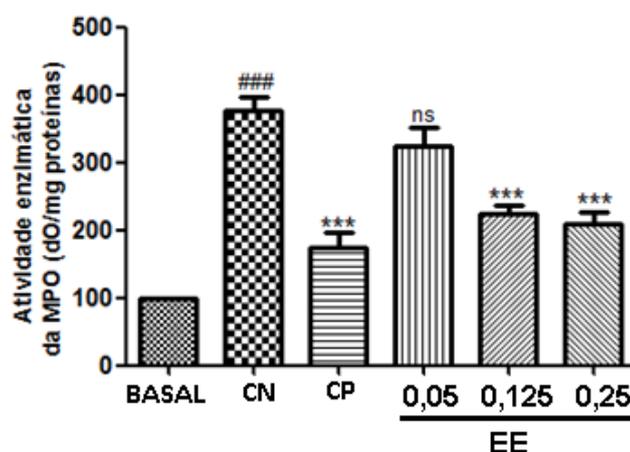
A MPO é uma enzima pro-oxidante presente em neutrófilos e está diretamente envolvida nos passos metabólicos centrais correlacionados ao processo de inflamação. Ela é encontrada principalmente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, e em menor quantidade, nos lisossomos primários de monócitos. Possui característica catiônica e possui um grupamento heme. Nos neutrófilos que são ativados por quimioatratadores, onde a MPO é a enzima presente em maior quantidade, uma vez liberada pelos grânulos azurófilos primários, esta participa como agente principal na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. Na presença de íons cloro ( $Cl_2$ ) a MPO transforma o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), formado durante o metabolismo oxidativo, em ácido hipocloroso (HOCl), o qual é considerado um oxidante altamente tóxico. Uma vez que o HOCl é formado dentro dos fagossomos, torna-se uma potente arma contra patógenos (ARATANI, et al., 1999; GUILPAN, et al., 2008).

Acredita-se que esse sistema MPO-  $H_2O_2$ -  $Cl_2$  seja uma importante ferramenta utilizada pelos neutrófilos para matar os microorganismos. Além disso, esse mesmo sistema parece estar envolvido na citotoxicidade contra células cancerígenas, mas também no dano

tecidual causado em locais inflamados onde os neutrófilos liberam tanto o  $H_2O_2$  como a MPO. A MPO também é responsável de catalisar a síntese de hipotiocianato, promovendo a oxidação de grupamentos anilina e fenol. As células endoteliais também sofrem influência da MPO, pois se a enzima se internalizar na célula, haverá a produção de oxidantes intracelulares, podendo contribuir para o aumento do dano tecidual nos processo inflamatórios. Desse modo, a MPO vem sendo frequentemente associada a diversas situações patológicas, principalmente naquelas que existe um processo inflamatório mediado pelos neutrófilos (ARATANI, et al., 1999; GUILPAN, et al., 2008, SILVA, 2009).

No estudo a aplicação tópica do TPA promoveu aumento da atividade da enzima MPO após seis horas do desafio com o agente flogístico (Figura 59). E esse aumento foi revertido pela aplicação tópica das formulações semissólidas com EE nas concentrações de 0,05 mg/orelha, 0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha em 14%, 40% e 44%, respectivamente ( $p < 0,001$ ). De maneira semelhante à dexametasona, controle positivo, que inibiu a atividade da enzima em 53% (Tabela 19).

**Figura 59.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. dos valores da inibição da atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: ### $p < 0,001$  vs grupo basal; \*\*\* $p < 0,001$  vs grupo controle negativo (acetona).



**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 19.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).

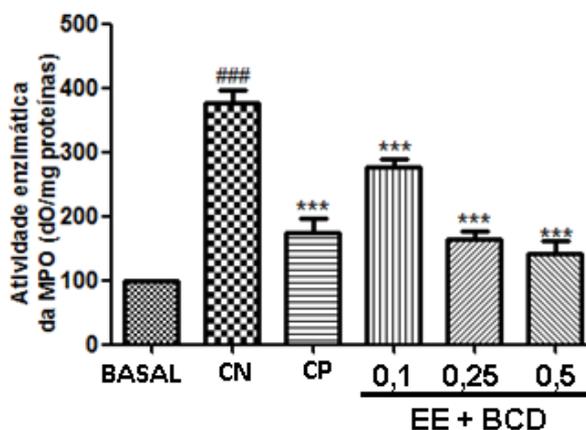
Grupo	Concentração	Inibição da atividade enzimática MPO (dO/mg proteína) (%)
Controle (acetona)	20µL/orelha	0
Extrato Etanólico livre	0,05 mg/orelha	14 ± 6,70 <sup>***</sup>
	0,125 mg/orelha	40 ± 9,77 <sup>***</sup>
	0,25 mg/orelha	44 ± 6,18 <sup>***</sup>
Dexametasona	0,1 mg/orelha	53 ± 11,03 <sup>***</sup>

Os valores correspondem à média ± E.P.M. de seis camundongos. <sup>\*\*\*</sup>p<0,001, diferente do grupo controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

**Fonte:** O autor (2015).

A avaliação do efeito da formulação semissólida com EE/βCD sobre a atividade da enzima mieloperoxidase, mostrou que a aplicação tópica do TPA promoveu aumento da atividade da enzima MPO após seis horas do desafio com o agente flogístico (Figura 60). E esse aumento foi diminuído pela aplicação tópica das formulações semissólidas com EE/βCD nas concentrações de 0,1 mg/orelha, 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha em 26,48%, 56,83% e 67,38%, respectivamente (p < 0,001). De maneira semelhante a dexametasona, controle positivo, que inibiu a atividade da enzima em 53,6% (Tabela 20).

**Figura 60.** Efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* + βCD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). Os valores correspondem à média ± E.P.M. dos valores da inibição da atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: <sup>###</sup>p<0,001 vs grupo basal; <sup>\*\*\*</sup>p<0,001 vs grupo controle negativo (acetona).



**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 20.** Efeito do extrato etanólico +  $\beta$ CD de *B. pinnatum* sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).

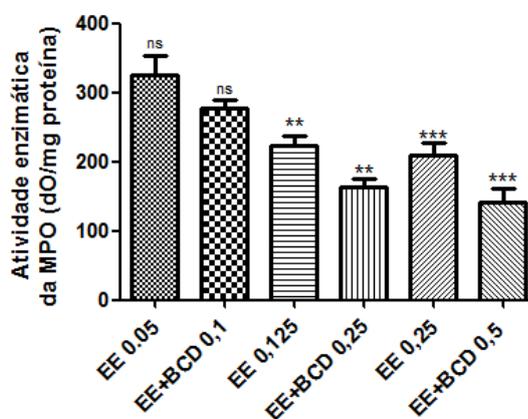
Grupo	Concentração	Inibição da atividade enzimática MPO (dO/mg proteína) (%)
Controle (acetona)	20 $\mu$ L/orelha	0
Extrato Etanólico/ $\beta$ CD	0,1 mg/orelha	26 $\pm$ 16,20 <sup>***</sup>
	0,25 mg/orelha	56 $\pm$ 8,25 <sup>***</sup>
	0,5 mg/orelha	67 $\pm$ 13,08 <sup>***</sup>
Dexametasona	0,1 mg/orelha	53 $\pm$ 11,03 <sup>***</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. <sup>\*\*\*</sup>p<0,001, diferente do grupo controle negativo (acetona) após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

**Fonte:** O autor (2015).

Quando comparado os efeitos do extrato etanólico livre do extrato etanólico +  $\beta$ CD sobre a inibição da atividade enzimática da MPO nas suas concentrações correspondentes, percebe-se que nas concentrações de 0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha de extrato etanólico livre e suas correspondentes 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha de extrato etanólico +  $\beta$ CD respectivamente, apresentaram diferenças significativas na inibição da atividade da MPO (p<0,01 e p<0,001) (Figura 61), enquanto que o tratamento de menor concentração apresentou a mesma capacidade de inibir a atividade da MPO seja na forma livre ou encapsulado com  $\beta$ CD (Tabela 21).

**Figura 61.** Comparação do efeito do extrato etanólico de *B. pinnatum* livre com o extrato etanólico +  $\beta$ CD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. dos valores da inibição da atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína). As medidas diferem em relação as concentrações correspondentes do extrato etanólico livre e extrato etanólico+ $\beta$ CD após análise de variância seguida do teste de Newman-Keuls. Valores significativos: \*\*p<0,01, <sup>\*\*\*</sup>p<0,001, EE vs EE/  $\beta$ CD.



**Fonte:** O autor (2015).

**Tabela 21.** Efeito do extrato etanólico livre e encapsulado com  $\beta$ CD sobre a atividade enzimática da MPO (dO/mg proteína).

Grupo	Concentração	Inibição da atividade enzimática MPO (dO/mg proteína) (%)
Extrato Etanólico livre	0,05 mg/orelha	14 $\pm$ 6,70 <sup>ns</sup>
	0,125 mg/orelha	40 $\pm$ 9,77 <sup>**</sup>
	0,25 mg/orelha	44 $\pm$ 6,18 <sup>***</sup>
Extrato etanólico/ $\beta$ CD	0,1 mg/orelha	26 $\pm$ 16,20 <sup>ns</sup>
	0,25 mg/orelha	56 $\pm$ 8,25 <sup>**</sup>
	0,5 mg/orelha	67 $\pm$ 13,08 <sup>***</sup>

Os valores correspondem à média  $\pm$  E.P.M. de seis camundongos. <sup>\*\*\*</sup>p<0,001, <sup>\*\*</sup>p<0,01, diferença significativa entre o grupo tratado com extrato etanólico livre e extrato etanólico+ $\beta$ CD após análise de variância seguida do teste de Student- Newman-keuls.

**Fonte:** O autor (2015)

Diversos estudos demonstram uma forte correlação entre a atividade da MPO e o número de neutrófilos no tecido inflamado (BRADLEY et al., 1982). A aplicação do creme com EE ou com EE/ $\beta$ CD apresentaram atividade anti-edematogênica e inibição do aumento da atividade da enzima MPO no modelo de inflamação cutânea aguda induzida pela aplicação tópica de TPA. Através da análise das figuras 59, 60 e 61 e, tabelas 19, 20 e 21 percebe-se que as formulações semissólidas utilizadas no estudo foram capazes de inibir a atividade enzimática da MPO, promovendo resposta semelhante à dexametasona (controle positivo). É importante destacar a capacidade de inibição da atividade da MPO apresentada pelas formulações semissólidas com os complexos de inclusão EE/ $\beta$ CD 0,25 mg/orelha e 0,5 mg/orelha que apresentaram capacidade de inibição da atividade enzimática com diferença estatística quando comparada as formulações semissólidas com EE livre correspondente (0,125 mg/orelha e 0,25 mg/orelha, respectivamente), e que as formulações de menor concentração não apresentaram diferença estatística entre elas. Assim, pode-se afirmar que ambas as formulações em estudo possuem ação inibitória sobre a migração de neutrófilos quando utilizado topicamente e, que as formulações que apresentam o extrato na forma encapsulada teve essa atividade potencializada, o que para o processo inflamatório a redução da atividade enzimática da MPO é um aspecto positivo, uma vez que com a diminuição da migração dos neutrófilos para a área inflamada, há redução dos danos causados nos tecidos por enzimas hidrolíticas e por espécies reativas (GARRIDO et al., 2004).

A atividade da MPO e o sistema formado junto com os seus produtos são de extrema importância na defesa do organismo contra infecções. Mas, sobre condições patológicas, a

ativação persistente do sistema MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Cl<sub>2</sub> em fagócitos ativados pode afetar de modo negativo os tecidos. O HOCl é capaz de promover reações de modificações focando lipídios, lipoproteínas e DNA, incluindo reações de halogenação, nitração e “cross-linking” oxidativo (MALLE et al., 2007). O estudo de estratégias de intervenção terapêutica tem como objetivo uma inibição eficiente da MPO podendo ser efetivas em diversos níveis, como no bloqueio do seu sítio ativo, desvio da MPO do ciclo de cloritização, inibição irreversível com o uso de inibidores suicidas e aplicação de sequestradores de HOCl para retardar o início e evolução de doenças onde componentes inflamatórios estejam envolvidos. Todas essas estratégias vêm sendo investigadas, mas ainda de modo limitado e não-sistemático. Sabe-se é que através da inibição da enzima MPO, observa-se a melhora dos efeitos adversos oxidativos provocados por essa enzima (ARNHOLD, 2003; MALLE, et al., 2007).

## 6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados apresentados nesta dissertação, foi possível obter as seguintes conclusões:

- Através da espectroscopia de UV-vis, foi possível identificar flavonoides como cromóforo majoritário no extrato etanólico, fração acetato de etila e fração butanólica.
- Alterações nos espectros de UV-Vis e IR permitiram detectar a formação de complexos de inclusão com a  $\beta$ CD. Considerando que as maiores alterações ocorreram nos sinais referentes aos flavonóides, é suposto que haja interação preferencial das ciclodextrinas com essa classe de compostos.
- A  $\beta$ CD foi capaz de afetar o tamanho dos agregados formados em solução aquosa, mediante a alteração da carga superficial e condutividade elétrica das soluções, mostrando assim, um aumento da estabilidade coloidal.
- Os composto EE/ $\beta$ CD possui maior estabilidade térmica do que o extrato etanólico puro, mostrando mais uma vez a existência de interações intermoleculares no sistema EE/ $\beta$ CD e sugerindo um maior tempo de prateleira para a composição.
- O fitocomplexo EE/ $\beta$ CD possui a capacidade de se solubilizar em água em um tempo menor que o extrato etanólico na forma livre, e de forma mais homogênea, sugerindo que a difusão das moléculas para o meio possa ocorrer de maneira controlada.
- Através da construção do perfil reológico das amostras, pôde-se mudanças no perfil de viscosidade em decorrência de intermoleculares com os componentes da formulação.
- A  $\beta$ CD melhorou significativamente ( $P < 0,005$ ) a atividade antioxidante do extrato etanólico, fração acetato de etila e fração hexânica, se comparado com o extrato/fração puro, por aumentar a disponibilidade eletrônica dos componentes do extrato.
- As formulações semissólidas com extrato etanólico puro e com  $\beta$ CD apresentaram atividade anti-inflamatória tópica em modelo agudo de edema de orelha induzido por óleo de cróton. O composto de inclusão com  $\beta$ CD apresentou uma melhora da atividade quando comparado com as formulações contendo o extrato, mostrando que a complexação dos componentes do extrato com a  $\beta$ CD é uma importante estratégia a ser considerada para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas para uso tópico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, J.; GORDON, K. C.; STRACHAN, C. J.; RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 159-169, 2008.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Elsevier, 2008.
- ADESANWO, J.K.; RAJI, Y.; OLALEYE, S.B.; ONASANWO, S.A. Antiulcer activity of methanolic extract of *Bryophyllum pinnatum* in rats. **Journal of Biological Science**, v. 7, n. 2, p. 409-412, 2007.
- AFZAL, M.; KAZMI, I.; KHAN, R.; SINGH, R.; CHAUHAN, M.; BISHT, T.; ANWAR, F. *Bryophyllum pinnatum*: A review. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 143-149, 2012a.
- AFZAL, M.; GUPTA, G.; KAZMI, I.; RAHMAN, M.; AFZAL, O.; ALAM, J.; HAKEEM, K.R.; PRAVEZ, M.; GUPTA, R.; ANWAR, F. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 853-858, 2012b.
- AGRAWAL, S.; KULKARNI, G. T.; SHARMA, V. N. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of *Terminalia paniculata* and *Madhuca longifolia*. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 62-68, 2011.
- AGUIAR, I. **Reações de transferência de elétrons fotoinduzidas em complexos binucleares: em direção a fotossíntese artificial**. 2013. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, p.193-194, 2000.
- AKTUMSEK, A.; ZENGİN, G.; GULER, G.O.; ÇAKMAK, Y.S.; DURAN, A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. **Food and Chemical Toxicology**, v.55, p. 290-296, 2013.
- ALBRECHT, A.M.; EVANS, W.C.; RASTON, L.C. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. **Green Chemistry**, v. 8, p. 417-432, 2006.
- ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, p. 1-15, 2008.
- ALONSO-SALCES. R. M.; BARRANCO. A.; ABAD. B.; BERRUETA. L. A.; GALLO. B.; VICENTE. F. Polyphenolic profiles of basque cider apple cultivars and their technological properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2938-2952, 2004.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L.A.; TORRES-RIVAS, F.; RODRIGO-GARCIA, J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. Complexation of Apple Antioxidants:

Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by Cyclodextrin (CD). **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry**, v. 53, p. 121-129, 2005.

ALVES, M.P.; SCARROE, A.L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.341, p. 215-220, 2007.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v.33, n.10, p. 2202-2210, 2010.

ALVES, M.R.A.; VIRTUOSO, L.C.; ALVARENGA, E.S.; DENADAI, A.M.L. Study of the interaction between glucosamine hydrochloride and sodium dodecylsulphate micelles using conductometric, isothermal calorimetry, zeta-potential titrations, and NMR NOESY. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 38, p. 248-259, 2014.

APAK, R.; GÜÇLÜ, K.; DEMIRATA, B.; ÖZYÜREK, M.; ÇELİK, S.; BEKTAŞOĞLU, K.; ÖZYURT, D. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assay applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, v.12, p.1496-1547, 2007.

AQUIL, F.; MUNAGALA, R.; JEYABALAN, J.; VADHANAM, M. V. Bioavailability of phytochemicals and its enhancement by drug delivery systems. **Cancer Letters**, v. 334, p.133–141, 2013.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 1828-1836, 1999.

ARNHOLD, J. Free radicals – Friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**, v. 69, p. 4-9, 2003.

ARRAIS, M. A. S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona:  $\beta$ cd e dapsona:  $s\beta\beta$ cd para incremento de solubilidade em forma farmacêutica**. 2012. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, 2012.

BAGHIANI, A.; BOUMERFEG, S.; ADJADJ, M.; AMENI, D.; DJERMOUNI, M.; KHELIFI-TOUHAMI, F.; CHAREF, N.; KHENNOUF, S.; ARRAR, L. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga reptans* L. Extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 21-30, 2011.

BALAMURUGAN, K.; KASTHIKEYAN, J. Evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory nature of luteolin in experimentally induced hepatocellular carcinoma. **Biomedicine and Preventive Nutrition**, v. 2, p. 86-90, 2012.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Science**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; WALTERS, K. **An Introduction to Rheology**, 5ª ed; ELSEVIER Science Publishers B.V. : Amsterdam, 1998.

BARNES, H. A.; HUTTON, J. F.; S, K. W. F. R. **An Introduction to Rheology**; ELSEVIER Science Publishers B.V. : Amsterdam, 1989.

BARNES, H.A. Thixotropy – a review. **Journal of Non-newtonian Fluid Mechanics**, v. 70, p. 1-33, 1997.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New finding in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6185-6205, 2008.

BENNETT, C. O.; MYERS, J. E. **Fenômenos de Transporte: Quantidade de Movimento, Calor e Massa.**; Ed McGraw-Hill do Brasil Ltda, 1978.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; PEREIRA, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U.; QUIRINO, M.S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BILIA, A.R.; ISACCHI, B.; RIGHESCHI, C.; GUCCIONE, C.; BERGONZI, M.C. Flavonoids Loaded in Nanocarriers: An Opportunity to Increase Oral Bioavailability and Bioefficacy. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 1212-1227, 2014.

BISWAS, S.K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; HOSEN, S.M.Z.; UDDIN, R.; RAHAMAN, M.S. Literature review on pharmacological potentials of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 10, p. 1258-1262, 2011.

BONINA, F.P., PUGLIA, C.; BARBUZZI, T.; CAPRARRIS, P.; PALAGIANO, F.; RIMOLI, M.G.; SAIJA, A. In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen, and diclofenac. **European Journal of Pharmaceutics Sciences**, v. 14, n. 2, p. 123-134, 2001.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacology Review**, v. 42, p. 127-154, 1990.

BRADLEY, P.P., PRIEBAT, D.A., CHRISTENSEN, R.D., ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal Investigative of Dermatology**. v. 78, p. 206-209, 1982.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006** - aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápico. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**/ Ministério da Saúde, Secretária de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 26 de 13 de maio de 2014** – Regulamento o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2014.

BREWSTER, M. E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 645–666, 2007.

BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.17, n. 10, p. 2675-2685, 2012.

BUSCHMANN, H.-J.; SCHOLLMAYER, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, p.185–191, 2002.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 467–478, 2008.

CANNAVÀ C, CRUPI V, FICARRA P, GUARDO M, MAJOLINO D, STANCANELLI R, VENUTI V. Physicochemical characterization of coumestrol/ $\beta$ -cyclodextrins inclusion complexes by UV–vis and IR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 48, p. 172-178, 2008.

CAO, G.A.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoides: structure-activity relationships. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, n.5, p. 749-760, 1997.

CARDOSO, M.; OLIVEIRA, E.D.; PASSOS, M.L. Licor negro de eucalipto kraft de indústrias brasileiras: características químicas, físicas e seu processamento na unidade de recuperação. **O papel**, p. 57-70, 2006.

CARNEIRO, S.C.M.C.C.; FONSECA-ALVES, C.E.; VICENTE, I.S.T.; MARTINS, A.F.; FIORAVANTI, M.C.S. Efeitos do meloxicam sobre as avaliações hematológica e bioquímica renal de cães adultos sadios. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 1, p. 001-007, 2014.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, D.F.; PAIVA, A.A.; MELO, A.S.O. Perfil lipídico e estado nutricional do adolescente. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 4, p. 491-498. 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 Farmacognosia**, v. 18, p. 314-319, 2008.

CARVALHO, M.C.M.S.S.C. **Estudo da evolução de carotenos e de açúcares em tomate cereja**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Aveiro, 2012.

CARVALHO, L.O.; MILKE, L.T. Importância terapêutica do óleo-resina de copaíba: enfoque para ação anti-inflamatória e cicatrizante. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 11, n. 2, p. 25-36, 2014.

CATALÁ, A.A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 399, p. 318-323, 2010.

CELIK, S. E.; OZYÜREK, M.; TUFAN, A. N.; GÜÇ, LÜ, K.; APAK, R. Spectroscopic study and antioxidant properties of the inclusion complexes of rosmarinic acid with natural and derivative cyclodextrins. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, p. 1615–1624, 2011.

CETESB. Análise de Clorofila a como Ferramenta no Monitoramento da qualidade das Águas. **Cadernos da Gestão do Conhecimento**. São Paulo, 2014. 83p.

CHAKRABORTY, S.; BASU, S.; LAHIRI, A.; BASAK, S. Inclusion of chrysin in  $\beta$ -cyclodextrin nanocavity and its effect on antioxidant potential of chrysin: A spectroscopic and molecular modeling approach. **Journal of Molecular Structure**, v. 977, p. 180–188, 2010.

CHIBLI, L.A. **Caracterização química e atividades biológicas de *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken**. 2013. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.

CHIBLI, L.A.; RODRIGUES, K.C.M.; GASPARETTO, C.M.; PINTO, N.C.C.; FABRI, R.L.; SCIO, E.; ALVES, M.S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O.V. Anti-inflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 330-338, 2014.

CHRISTY, A.L.; WALKER, M.E.; HESSNER, M.J. ;BROWN, M.A. Mast cell activation and neutrophil recruitment promotes early and robust inflammation in the meninges in EAE. **Journal of Autoimmunity**, v. 42, p. 50-61, 2013.

CHUNG, Y.C.; CHANG, C.T.; CHAO, W.W.; LIN, C.F.; CHOU, S.T. Antioxidative activity and safety if the 50% ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 2454-2458, 2002.

CLARKE, G.; TING, K.N.; WIART, C.; FRY, J. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for

Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. **Antioxidants**, v. 2, p. 1-10, 2013.

COLEGATE, S.M.; MOLYNEUX, R.J. **Bioactive Natural Products : Detection, Isolation and Structural Determination**. 2. ed. Boca Raton (EUA): CRC, 2008.

CORNARD, J.P; MERLIN, J.C. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al (III). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, n. 19, 2002.

CORREIA, R.T.P.; BORGES, K.C.; MEDEIROS, M.F.; GENOVESE, M.I. Bioactive compounds and phenolic-linked functionality of powdered tropical fruit residues. **Food Science and Technology International**, v. 18, n. 6, p. 538-541, 2013.

CORTI, G.; CAPASSO, G., MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M.J. The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, p. 463-478, 2006.

CUNHA FILHO, M.S.S.; MARINHO, B.D.; LABANDEIRA, J.J.T.; PACHECO, R.M.; LANDÍN, M. Characterization of  $\beta$ -Lapachone and Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin Solid-state Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 3, p. E1-E10, 2007.

DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G. D.; EGITO, E. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 1, p. 9-18, 2011.

DAMODARAN, S., KIRK L. P., FENNEMA, O. R.: Tradução Adriano Brandelli et al. **Química de Alimentos de Fennema**. 4<sup>a</sup>. ed. Porto Alegre : Artmed, 900p, 2010.

DASH, A.K.; CUTWORTH II, G.C. Therapeutic, application of implantable drug delivery systems. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 1998.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papavarine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw edema. **Agents and Actions**, v. 42, n.1-2, p.29-33, 1994.

DEFAYE, J.; FERNANDEZ, J.G.M.; MELLET, C.O. Pharmaceutical use of cyclodextrines: perspectives for drug targeting and control of membrane interactions. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 65, p. 33-49, 2007.

DENADAI, A.M.L.; TEIXEIRA, K.I.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, A.M.C.; CORTÉS, M.E.; SINESTERRA, R.D. Supramolecular self-assembly of  $\beta$ -cyclodextrin: an effective

carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2286-2296, 2007.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products – A biosynthetic approach**. 3<sup>a</sup> ed. University of Nottingham, UK: Wiley, 2009, 539 p.

DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.J.; YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents & Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DIVAKAR, S.; MAHESWARAN, M. Structural studies on inclusion compounds of  $\beta$ -cyclodextrin with some substituted phenols. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 27, p. 113–126, 1997.

DOUROUMIS, D.; FATOUROS, D.G; BOUROPOULOS, N.; PAPAGELIS, K.; TASIS, D. Colloidal stability of carbon nanotubes in an aqueous dispersion of phospholipid. **International Journal of Nanomedicine**, v. 4, p. 761-766, 2007.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Research**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

EL ABDELLAOUI, S.; DESTANDAU, E.; TORIBIO, A.; ELFAKIR, C.; LAFOSSE, M.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; CANCELLIERI, P.; LANDEMARRE, L. Bioactive molecules in *Kalanchoe pinnata* leaves: extraction, purification, and identification. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1329-1338, 2010.

EL-SAYED, M.A. Some interesting properties of metals confined in time and nanometer space of different shapes. **Accounts of Chemical Research**, v. 34, p. 257-264, 2001.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FALCÃO, D.Q.; SANTOS, A.R.; OTRIZ-SILVA, B.; LOURO, R.P.; SEICEIRA, R.; FINOTELLI, P.V.; PEREIRA, J.L.P.; SIMONEA, S.G.; AMARAL, A.C.F. Development of Nanoencapsulation Forms from *Cymbopogon citratus* Essential Oil. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 4, p. 765-772, 2011.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2010.

FELIPPI, C.C. **Nanopartículas contendo isotretinoína: Preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação de penetração cutânea**. 2008. Dissertação

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

FERNANDES, C. M.; VIEIRA, M. T.; VEIGA, F. J. B. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine–cyclodextrins inclusion compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 79–88, 2002.

FERNÁNDEZ-NIEVES, A.; NIEVES, F.J.D.I. The role of  $\zeta$  potential in the colloidal stability of different TiO<sub>2</sub>/electrolyte solution interfaces. **Colloids and Surface A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 148, p. 231-243, 1999.

FERREIRA, F.R. **Estudo do encapsulamento de compostos antioxidantes em ciclodextrina por métodos eletroquímicos e espectroscópicos**. Maceió, 2009, 100 p. Dissertação (Mestrado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Universidade Federal de Alagoas, 2009.

FERREIRA, F.R.; VALENTIM, I.A.; RAMONES, E.D.L.; TREVISAN, M.T.S.; OLEA-AZAR, C.; CRUZ, F.P.; ABREU, F.C.; GOULART, M.O.F. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with  $\beta$ -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v.51, p. 129-134, 2013.

FILHO, V.C; YUNES, R.A Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99-105, 1997.

FOLCH-CANO, C.; GUERRERO, J.; SPEISKY, H.; JULLIAN, C.; OLEA-AZAR, C. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 78, p. 287-298, 2013.

FRANCO C, SCHWINGEL L, LULA I, SINISTERRA RD, KOESTER LS, BASSANI VL. Studies on coumestrol/ $\beta$ -cyclodextrin association: Inclusion complex Characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 5-11, 2009.

FRIDOVICH I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by xanthine oxidase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 4053-4057, 1970.

FUKUMASU, H.; LATORREL, A.O.; BRACCI, N.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 21, n. 2, p. 49-59, 2008.

GÁBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYAR, P.G.; WILLOUGH, D.A **Inflammation protocols**, New Jersey: Human Press, p. 129-131, 2003.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p.91-104, 2002.

GARCIA, E.J.; OLDONI, T.L.C.; ALENCAR, S.M.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D.; GRANDE, R.H.M. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. **Brazilian Dental Journal**, v. 23, n.1, p. 22-27, 2012.

GARCIA-LAFUENTE, A.; GUILLAMON, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M.A.; MARTYNEZ, J.A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537-552, 2009.

GARCIA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P.S.; ESTELLER, A.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUÑÓN, M.J.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang liver cells. **European Journal of Pharmacology**, v.557, p. 221-229, 2007.

GARCIA-PIÑERES, A.J.; CASTRO, V.; MORAES, G.; SCHMIDT, T. J.; STRUNCK, E.; PAHL, H.L.; MERFORT, I. Cysteine 38 in p65/NF-KB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p. 39713-39720, 2001.

GARRIDO, G.; GONZÁLEZ, D.; LEMUS, Y.; GARCÍA, D.; LODEIRO, L.; QUINTERO, G.; DELPORTE, C.; NÚÑEZ-SELLÉS, A.J.; DELGADO, R. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG). **Pharmacological Research**, v. 50, p. 143-149, 2004.

GEERIG, B.; STOECKLE, C.; CONUS, S.; SIMON, H. Living and dying for inflammation: neutrophils, eosinophils, basophils. **Cell Press**, p. 1-12, 2013.

GHANDEHARI, H. Phar 535: controlled drug release. Disponível em <[https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture\\_handouts/Intro\\_CR/Introduction%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf](https://rxsecure.umaryland.edu/courses/PHAR535/lecture_handouts/Intro_CR/Introduction%20to%20Controlled%20Drug%20Delivery.pdf)>. Acesso em julho de 2014.

GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.

GLASS, C.K.; OGAWA, S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews in Immunology**, v. 6, p. 44-55, 2006.

GOKBULUT, A.; OZHAN, O.; SATILMIS, B.; BATCIOGLU, K.; GUNAL, S.; SARER, R. Antioxidant and antimicrobial activities and phenolic compounds of selected *Inula* species from Turkey. **Natural Product Communications**, v. 8, p. 475-478, 2013.

GONTIJO, V.S.; JUDICE, W.A.S.; CODONHO, B.; PEREIRA, I.V.; ASSIS, D.M.; JANUÁRIO, J.P.; CAROSELLI, E.E.; JULIANO, M.A.; DOSATTI, A.C.; MARQUES, M.J.; JUNIOR, C.V.; SANTOS, M.H. Leishmanicidal, antiproteolytic and antioxidant evaluation of natural bioflavonoids isolated from *Garcinia brasiliensis* and their semisynthetic derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 613-623, 2012.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food Chemistry**, v. 48, p. 76-82, 2010.

GUILPAIN, P.; SERVETTAZ, A.; BATTEUX, F.; GUILLEVIN, L.; MOUTHON, L. Natural and disease associated anti-myeloperoxidase (MPO) autoantibodies. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p. 421-425, 2008.

GULÇIN, I. Antioxidant and antiradical of L-carnitin. **Life sciences**, v. 78, p. 803-811, 2006.

GULÇIN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimumbasilicum L.* Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. **Phytotherapeutic Research**, v.21, p. 354-361, 2007.

GUNDUC, N.; EL S.N. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkish food and drinks on *in vitro* low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Food Science**, v. 68, n.8, p. 2591-2595, 2003.

GUPTA, R.; LOHANI, M.; ARORA, S. Anti-inflammatory activity of the leaf extracts/fractions of *Bryophyllum pinnatum* saliv.syn. **International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 16-18, 2010.

GUPTA, S., BANERJEE, R. Radical scavenging potential of phenolics from *Bryophyllum pinnatum* (LAM.) Oken. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 305-319, 2011.

GUTERRES, S.S.; BENVENUTTI, E.V.; POHLMANN, A.R. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo, Ed. Artiber, 2006.

HAIYUN, D.; JIANBIN, C.; SHUANG, Z. G.; JINHAO, P. Preparation and spectralinvestigation on inclusion complex of  $\beta$ -cyclodextrin with rutin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 59, p.3421–3429, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3<sup>a</sup> ed. Clarendon: Oxford, 2000.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress.**Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Anti-inflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

HUBER, G. M.; RUPASINGHE, V.; SHAHIDI, F. Inhibition of oxidation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and fish oil by quercetin glycosides.**Food Chemistry**, v. 117, p. 290-295,2009.

JÄGER, A. K.; GAUGUIN, B.; ANDERSEN, J.; ADSERSEN, A.; GUDIKNEN, L.

Screening of plants used in Danish folk medicine to treat depression and anxiety for affinity to the serotonin transporter and inhibition of MAO-A. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, p. 822-825, 2012.

JULLIAN, C.; MOYANO, L; YÁÑEZ, C.; OLEA-AZAR, C. Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study. **SpectrochimicaActa Part A**, v. 67, p. 230-234, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAHRAMAN, A.; ERKASAP, N.; SERTESER, M.; KOKEN, T. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of Nephrology**, v.16, p. 219-224, 2003.

KALIA, N.Y.; GUY, R.H. Modeling transdermal drug release. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 28, n. 2-3, p.159-172, 2001.

KAMBOJ, A.; SALUJA, A.K. *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz.: Phytochemical and pharmacological profile: A review. **Pharmacognosy Review**, v. 3, n. 6, p. 364-374, 2009.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.; MOURTZINOS, I.; TROULLIDOU, E.; CHIOU, A.; KARATHANOS, V. T. Encapsulation of complex extracts in  $\beta$ -cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 603–613, 2009.

KALOGEROPOULOS, N.; YANNAKOPOULOU, K.; GIOXARI, A.; CHIOU, A.; MAKRIS, D.P. Polyphenol characterization and encapsulation in  $\beta$ -cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract. **Food Science Technology**, v. 43, p. 882-889, 2010.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KOHATA, S.; KOUKI, J.; AKIRSA, O. Thermal decomposition of cyclodextrins ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and modified  $\beta$ -CyD) and of metal-( $\beta$ -CyD) complexes in the solid phase. **Termochimica Acta**, v.217, p.187-198, 1993.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 8-17, 2002.

KRASNOVSKY, A. A.; BYSTROVA, M. I. Self-assembly of chlorophyll aggregated structures. **Biosystems**, v. 12, p. 181-194, 1980.

KRAWCZYK, S. The effects of hydrogen bonding and coordination interaction in visible absorption and vibrational spectra of chlorophyll a. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 976, p. 140–149, 1989.

KREUTER, J. Colloidal drug delivery systems. Ed. Marcel Dekker, New York, 1994.

KRISHNAIAH, D., SARBATLY, R., & NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p.217-233, 2011.

KÜHN, H.; BORCHERT, A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 33, p. 154-172, 2002.

KYUNGMI, M.S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 96-104, 2008.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; NOGUEIRA, T.C.M.L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/UFSC, 2010.

LEE, C.C.; SHEN, A.R.; LAJ, Y.J.; WU, S.C. Rutin and quercetin bioactive compounds from tartary buckwheat, prevent liver inflammation injury. **Food & Function**, v. 4, p. 794-802, 2013.

LI, X.; LI, H.; LIU, M.; LI, G.; LI, L.; SUN, D. From guest to ligand – A study on the competing interactions of antitumor drug resveratrol with  $\beta$ -cyclodextrin and bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, v. 521, p. 74–79, 2011.

LI, L.; ISHDORJ, G.; GIBSON, S.B. Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v.53, p. 1399-1410, 2012.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LOFTSSON T, DUCHENE D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, n. 1-2, p. 1-11, 2007.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 1. Drug Solubilization and Stabilization. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 163-171, 2007.

LOPES, G.C.; ROCHA, J.C.B.; ALMEIDA, G.C.; MELLO, J.C.P. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, v. 20, n. 6, p. 1103-1109, 2009.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on the chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v.763, p. 1-10, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**. 2. ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU Y, ZHANG X, LAI J, YIN Z, WU W. Physical characterization of meloxicam-  $\beta$  -cyclodextrin inclusion complex pellets prepared by a fluid-bed coating method. **Particuology**, v. 7, p. 1-8 2009.

LUE, B.M.; NIELSEN, N. S.; JACOBSEN, C.; HELLGREN, L.; GUO, Z.; XU, X. Antioxidant properties of modified rutin esters by DPPH, reducing power, iron chelation and human low density lipoprotein assays. **Food Chemistry**, v.123, p. 221–230, 2010.

MACEDO, E.V.; GEMAL, A.L. A produção de Fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, n. 4, p. 290-297, 2009.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.F.L.C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidante properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.

MAHATO, S.B.; SARKAR, S.K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v.27, p. 3037-3067, 1988.

MAJAZ, Q.; KHURSHID, M.; NAZIM, S.; RAHIL, K.; SIRAJ, S. Evaluation of antioxidant activity of *Kalanchoe pinnata*. **International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy**, v. 2, n. 6, p. 1772-1775, 2011.

MALLE, E.; FURTMÜLLER, P.G.; SATTLER, W.; OBINGER, C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p. 838-854, 2007.

MALVERN INSTRUMENTS (2005). Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations With. Disponível em: <<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1234>> Acesso em: 24 maio 2015.

MARKS, F.; FÜRSTENBERGER, G. The conversion stage of skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 11, n.12, p. 2085-92, 1990.

MARLIÉRE, L.D.P.; RIBEIRO, A.Q.; BRANDÃO, M.G.L.; KLEIN, C.H.; ACURCIO, F.A. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 754-760, 2008.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 33-54, 2002.

MELO, P. S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. São Paulo, 2010. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2010.

MENEZES, P.P.; SERAFINI, M.R.; SANTANA, B.V.; NUNES, R.S.; QUINTANS, L.J.; SILVA, G.S. Solidstate  $\beta$ cyclodextrin complexes containing geraniol. **Thermochimica Acta**, v. 548, p. 45-50, 2012.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C., COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MERCADER-ROS, M.T.; LUCAS-ABELLÁN, C.; FORTEA, M.I.; GALBADÓN, J.A.; NÚÑEZ-DELICADO, E. Effect of HP- $\beta$ -cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols. **Food Chemistry**, v. 118, p. 769-773, 2010.

MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A.N. Genu *Kalanchoe* (Crassulaceae): A review of its ethnomedical, botanical, chemical and pharmacological properties. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, n. 1, p. 86-104, 2014.

MILLER LA, CARRIER RL, AHMED I. Practical Considerations in Development of Solid Dosage Forms that Contain Cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 96. p. 1691-1707, 2007.

MOGHIMI, S.M.; HUNTER, A.C.; MURRAY, J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. **TheFASEB Journal.**, v. 19, p. 311-330, 2005.

MONACO, J.P. **Desenvolvimento de sistemas bio e mucoadesivos de uso intra-bucal: Avaliação in vitro da liberação de nimesulida**. 143 f. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto, SP, 2000.

MONTI, D., TAMPUCCI, S., CHETONI, P., BURGALASSI, S., SAINO, V., CENTINI, M. Permeation and distribution of ferulic acid and its  $\beta$ -cyclodextrin complex from different formulations in hairless rat skin. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, p. 514–520, 2011.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 1655-1666, 2009.

MOREIRA, L.M.; RODRIGUES, M.R.; OLIVEIRAS, H.P.M.; LIMA, A.; SOARES, R.R.S.; BATISTELA, V.R.; GEROLA, A.P.; HIOKA, N.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M.S.; MACHADO, A.E.H. Influência de diferentes sistemas de solvente água-etanol sobre as

propriedades físico-químicas e espectroscópicas dos compostos macrocíclicos feofitina e clorofila  $\alpha$ . **Química Nova**, v. 33, p. 258-262, 2010.

MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 489-501, 2001.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its qualification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MOTTA, E.V.S.; PINTO, N.C.C.; DUQUE, A.P.N.; MENDES, R.F.; BELLOZI, P.M.Q.; SCIO, E. Atividades antioxidantes, antinoceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MOURTZINOS, I.; SALTA, F.; YANNAKOPOULOU, K.; CHIOU, A.; KARATHANOS, V. T. Encapsulation of olive leaf extract in b-cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8088–8094, 2007.

MOURTZINOS, I.; MAKRIS, D. P.; YANNAKOPOULOU, K.; KALOGEROPOULOS, N.; MICHALI, I.; KARATHANOS, V. T. Thermal stability of *Hibiscus sabdariffa* L. anthocyanins in the presence of b-cyclodextrin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10303–10310, 2008.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.71, p. 1331-1336, 2006.

MURDOCK, R. C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A. M., SCHLAGER, J.J.; HUSSAIN S.M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to In Vitro Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. **Journal of Toxicological Science**, v. 101, p. 239–253, 2008.

MUZITANO, M.F.; BERGONZONI, M.C.; MELO, G.O.D.; LAGE, C.L.S.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoepinnata*. **Journal of Ethonopharmacology**, v. 133, p. 132-137, 2011.

NAKAMURA, Y.; KOZUKA, M.; NANIWA, K.; TAKABAYASHI, S.; TORIKAL, K.; HYASHI, R.; SATO, T.; OHIGASHI, H.; OSAWA, T. Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n.9, p. 997-1007, 2003.

NASCIMENTO, J.L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e  $\beta$ -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. 2013. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2013.

NASCIMENTO, L.O.; GOULART, P.P.;CORREA, J.L.; ABRISHAMKAR, A.; SILVA, J.G.; MANGRICH, A.S.; FRANÇA, A.A.; DENADAI, A.M.L. Molecular and supramolecular characterization of Ni(II)/Losartan Hydrophobic Nanoprecipitate. **Journal of Molecular Structure**, v.1074, p. 224-230, 2014.

NAYAK, B.S.; MARSHALL, J.R.; ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. leaf – A preliminary study. **Indian Journal of Exerimental Biology**, v. 48, p. 572-576, 2010.

NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C.B.Comentários sobre o registro de fitoterápicos. **RevistaFitos**, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.

NETO, J.D.N.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v.34, p. 125-130, 2013.

NEVES, L.C.; ALENCAR, S.M.; CARPES, S.T.; Determinação da atividade antioxidante e teor de componentes fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis melífera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, p.107-110, 2009.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NGUYEN, T.A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS, D.S.; HOOK, J.M.An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant of rutin/cyclodextrin inclusion complex.**FoodChemistry**, v. 136, p. 186-192, 2013.

NI, H.; AMME, R.C. Ion redistribution in an electric double layer. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 260, p. 344-348, 2003.

NITALIKAR, M.M.; SAKARKAR, D.; JAIN, P.V. The Cyclodextrins: A Review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 1, p. 01-06, 2012.

OHWELLER, O.A. **Fundamentos de Análise Instrumental**. 1ª ed. Rio de Janeiro, LTC, 1981.

OJEWOLE, J.A.O. Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum*(Clam) Oken leaf extracts. **American Journal of Hypertension**, v. 15, p. 34-39, 2002.

OJEWOLE, J.A. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiabetic effects of *Bryophyllum pinnatum* (Crussulaceae) leaf aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 13-19, 2005.

OKWU, D.E.; NMAMDI, F.C. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2011a.

OKWU, D.E.; NMAMDI, F.C.A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryopyllum pinnatum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 2, p. 27-33, 2011.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, G.L.; OLIVEIRA, A.F.M.; ANDRADADE, L.H.C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 24, p. 571-577, 2010.

OLIVEIRA, V. E.; ALMEIDA, E. W. C.; CASTRO, H. V.; EDWARDS, H. G. M.; DOS SANTOS, H. F.; L. DE OLIVEIRA, F. C. Carotenoids and  $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, p. 8511-8519, 2011.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Japanese Journal of Nutrition**, v. 44, p. 307-315, 1986.

OZOLUA, R.I.; EBOKA, C.J.; DURU, C.N.; UWAYA, D.O. Effects of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* on guinea pig tracheal ring contractility. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 149-157, 2010.

PAESE, K.; JAGER, A.; POLETTO, F.S.; PINTO, E.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Semisolid formulation containing nanoencapsulated sunscreen: effectiveness, in vitro photostability and immuneresponse. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, p. 1-7, 2009.

PARK, K.K.; PARK, J.H.; JUNG, Y.J.; CHUNG, W.Y.; Inhibitory effects of chlorophyllin, hermin and tetrakis (4-benzoic acid) porphtrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanisms. **Mutation Research**, v.542, p. 89-97, 2003.

PASCUAL, G.; GLASS, C.K. Nuclear receptor versus inflammation: mechanisms of transrepression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, p. 321-328, 2006.

PATEWAR, S.V. Kalanchoe pinnata: phytochemical and pharmacological profile. **International Journal of Phytopharmacy**, v.2, p. 1-8, 2012.

PELOZO, M.I.G.; CARDOSO, M.L.C.; MELLO, J.C.P. Spectrophotometric determination of tannins and caffeine in preparations from *Paullinia cupana var. sorbilis*. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 447-451, 2008.

PEREIRA, R.P. FACHINETTO, R.; PRESTES, A.S.; PUNTEL, R.L. SILVA, G.N.S.; HEINZMANN, B.M.; BOSCHETTI, T.K.; ATHAYDE, M.L.; BURGER, M.E.; MOREL, A.F.; MORSCH, V.M.; ROCHA, J.B.T. Antioxidant effects of diferente extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. **Neurochemical Research**, v. 34, p. 973-983, 2009.

PEREIRA, C.B.; MARIN, A.; DALMORA, S.L.; NECCHI, R.M.M.; MORESCO, R.N.; MAFRON, M.P. Atividade anti-inflamatória e avaliação da toxicidade do extrato

hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 34, n. 1, p. 43-46, 2013.

PHOSRITHONG, N.; SAMEE, W.; NUNTHANAVANIT, P.; UNGWITAYATORN, J. *In vitro* antioxidant activity study of novel chromonederivative. **Chemical Biology and Drug Design**, v.79, p.981-989, 2012.

PIETTA, P.G. J. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, p. 1035-1042, 2000.

PINCHUK, I.; SHOVAL, H.; LICHTENBERG, D.D. Evaluation of antioxidants: Scope, limitations and relevance of assays. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 638-647, 2012.

PINHO, E.; GROOTVELD, M.; SOARES, G.; HENRIQUES, M. Cyclodextrins as encapsulation agentes for plant bioactive compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 121-135, 2014.

PLAZA, R.C.; VICENTE, J.; GÓMEZ-LOPERA, S.; DELGADO, A.V. Stability of dispersions of colloidal nickel ferrite spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.242, p. 306-313, 2001.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 1-11, 2007.

PRICE, K.R.; JOHNSON, I.T.; FENWICK, G.R.; MALINOW, M.R. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Food Science and Nutrition**, v. 26, p. 27-135, 1987.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4306, 2005.

PYRZYNSKA, K.; PEKAL, A. Application of free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) to estimate the antioxidant capacity of food samples. **Analytical Methods**, v. 5, p. 4288-4295, 2013.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, p. 586-621, 2011.

QUINTANS, J. S. S ; MENEZES, P. P.; SANTOS, M. R. V.; BONJARDIM, L. R.; ALMEIDA, J. R. G. S.; GELAIN, D. P.; ARAUJO, A. A. S.; QUINTANS JUNIOR, L. J. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436– 440, 2013.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A.Q.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevent massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-

O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-biological Interactions**, v.172, n.3, p.195-205, 2008.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RASHEED, A., KUMAR, A. C. K., SRAVANTHI, V. V. N. S. S. Cyclodextrins as Drug Carrier Molecule: A Review. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, p. 567-598, 2009.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J.H.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MOTTA, S.L.P.; QUEIROZ, M.E.L.R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIJEK, E., OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.

ROCKS, N., BEKAERT, S., COIA, I., PAULISSEN, G., GUEDERS, M., EVRARD, B. Curcumin-cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an ortho-topic mouse model of lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 1083–1092, 2012.

RODINELLI, B. O.; LIMA, E. M. Avaliação do perfil de liberação do enalapril em comprimidos revestidos com HPMC. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 37-40, 2005.

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso de fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 311-318, 2011.

RUBIO-MORAGA, Á.; ARGANDOÑA, J.; MOTA, B.; PÉREZ, J.; VERDE, A.; FAJARDO, J.; GÓMEZ-NAVARRO, J.; CASTILLO-LÓPEZ, R.; AHRAZEM, O.; GÓMEZ-GÓMEZ, L. Screening for polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of extracts from eleven *Helianthemum* taxa (Cistaceae) used in folk medicine in south-eastern Spain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 287-296, 2013.

SADIK, C.D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 773-781, 2003.

SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SAKATA, S.; UCHIDA, K.; KAETSU, I.; KITA, Y. Programming control of intelligent drug releases in response to single and binary environmental stimulation signals using sensor and electroresponsive hydrogel. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, p. 733-737, 2007.

SANCHEZ, T.; MORENO, J.J. Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 877-879, 1999.

SANTI, M.M.; SANCHES, F.S.; SILVA, J.F.M. and SANTOS, P.M.L.. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD . **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, pp. 256-261, 2014.

SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.A.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.P.; LEITE, G.O.; KERNTOPF, M.R.; COSTA, J.G.M.; ROCHA, J.B.T.; TOMÉ, A.R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R.A. Topical anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae fruit fixed oil on mice ear edema induced by diferent irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 504-510, 2011.

SARGENT, M. G. Fiftyfold amplification of the Lowry protein assay. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 476-489, 1987.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANNII, A.R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, p. 726-737, 2003.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Drug Research**, v. 32, n. 3, p. 230-235, 1982.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: a imensa potencialidade desde pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 80-85, 2005.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. 2. ed. Karlsruhe: Artliber Editora, 2006.

SHUANG, S.; PAN, J.; GUO, S.; CAI, M.; LIU, C. Fluorescence studyon the inclusion complexes of rutin with  $\beta$ -cyclodextrin, hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and  $\gamma$ -cyclodextrin. **Analytical Letters**, v. 30, p. 2261–2270, 1997.

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; VALENTAO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel and seed) and jam: antioxidante activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.15, p. 4705-4712, 2004.

SILVA, C.D *Combretum leprosum* Mart (Combretaceae) – **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica em modelos de inflamação de pele agudo e crônico em camundongos**. 2009. 97 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

SILVA, O. A.; ALMEIDA, A. A. C.; CARVALHO, R. B. F.; NETO, J. D. N.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Potencial antioxidante *in vitro* do (-)- $\alpha$ -terpineol. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 08, n. 03, p. 14—152, 2012.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. São Paulo, LTC, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SINGH, M.; SHARMA, R.; Banerjee, U. C. Biotechnological applications of cyclodextrins. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 341–359, 2002.

SKOOG, D.A; WEST, D.M; HOLLER, F.J., STANLEY, R.C. **Fundamentos da Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo: Editora Thomson, 2007.

SOBREIRA, F. C. **Avaliação da Atividade Antiúlcera de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Crassulaceae)**. 2013. 105p. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SODERHJELM, L.; SAGFORS, P. E. Factors influencing the viscosity of kraft black liquor. **Journal of Pulp and paper science**, v. 20, p. J106-J110, 1994.

SODERHJELM, L.; KIISKILA, E.; SAGFORS, P. E. Factors influencing heat treatment of black liquor. **Journal of Pulp and Paper Science**, v. 25, p. 367-375, 1999.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI,V.L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAM, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; HIROSHI, K.; LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v.12, p. 376-390, 2013.

SOUSA, P.J.C.; ROCHA, J.C.S.; PESSOA, A.M.; ALVES, L.A.D.; CARVALHO, J.C.T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophyllum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 60-64, 2005.

SOUSA, R.M.F.; LIRA, C.S.; RODRIGUES, A.O.; MORAIS, S.A.L.; QUEIROZ, C.R.A.A.; CHANG, R.; AQUINO, F.J.T.; MUÑOZ, R.A.A.; OLIVEIRA, A. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pronóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos *in vitro*. **Bioscience Journal**, v.30, p. 448-457, 2014.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SPADA, G.; GAVINI, E.; COSSU, M.; RASSU, G.; CARTA, A.; GIUNCHEDI, P. Evaluation of the effect of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin on topical administration of milk thistle extract. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 40-47, 2013.

SRI, K. V.; KONDAIAH, A.; RATNA, J. V.; ANNAPURNA, A. Preparation and characterization of quercetin and rutin cyclodextrin inclusion complexes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 33, 245–253, 2007.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

STRAZISAR, M.; ANDRENESEK, S.; SMIDOVNIK, A. Effect of  $\beta$ -cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids. **Food Chemistry**, v. 110, p. 636-642, 2008.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SUN, L.; ZHANG, J.; LU, X.; ZHANG L.; ZHANG, Y.; Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extracts from persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2689-2696, 2011.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 1743-1753, 1998.

SZEJTLI, J. **Comprehensive Supramolecular Chemistry**. Pergamon: Oxford, 1996.

SZEJTLI, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulation is so slow. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 52, n. 1-2, p. 1-11, 2005.

TANFORD, C. **Physical Chemistry of Macromolecules**; John Wiley & Sons Inc: New York, 1962.

TANTRA, R.; SCHULZE, P.; QUINCEY, P. Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility. **Particuology**, v. 8, p. 279-285, 2010.

TATSIMI, S.J.N.; TAMOKOU, J.D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.R.; TANE, P. Kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BioMed Central Research Notes**, v. 5, p. 158, 2012.

TATSIMO, S.J.N.; TAMOKOU, J.D.D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; JUDIT, H.; KUIATE, J.R.; PIERRE, T. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BioMed Central Research Notes**, v.5, p. 1-13, 2012.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G.; NEUBERT, R.H.H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 3, p. 699-706, 2007.

THOMPSON, D. O. Cyclodextrins - Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, n. 1, p. 101-104, 1997.

TIRZITIS, G.; BARTOSZ, G. Determination of antiradical and antioxidante activity: basic principles and new insights. **Acta Bioquímica Polónia**, v. 57, n. 1, p. 139-142, 2010.

TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

TREML, T.L. **O uso da dexametasona e a fertilidade do touro**. 2010. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2010.

UCHOA-FERNANDES, A. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e clorofilina**. 2007. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, 2007.

UMEBESE, C.E., FALANA, F.D. Growth, phytochemicals and antifungal activity of *Bryophyllum pinnatum* Lam. subjected to water deficit stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 47, p. 6599-6604, 2013.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. **As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica**. Coimbra: Minerva Coimbra, 2006

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 do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.384-387, 2007.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VENTURINE, C.G.; NICOLINE, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VILLAS BÔAS, G.K.; GADELHA, C.A.G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463-1471, 2007.

VITALINI, S.; BERETTA, G.; IRITI, M.; ORSENIGO, S.; BASILICO, N.; DALL'ACQUA, S.; LORIZZI, M.; FICO, G. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, p. 203-209, 2011.

VLADKOVA, R. Chlorophyll *a* self-assembly in polar solvent-water mixtures. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, p. 71-83, 2000.

XIAO, Z.-P.; PENG, Z.-Y.; PENG, M.-J.; YAN, W.-B.; OUYANG, Y.-Z.; ZHU, H.-L. Flavonoids health benefits and their molecular mechanism. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.11, n. 2, p. 169-177, 2011.

XIE, J.; SCHAICH, K.M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Free Radical (DPPH) Assay for Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 4251-4260, 2014.

XU, R.L. Methods to resolve mobility from electrophoretic laser light scattering measurement. **Langmuir**, v. 9, p. 2955-2962, 1993.

WACHTER, R.; BRENNEISEN, R.; HAMBURGER, M.; MENNET, M.; SCHNELLE, M.; WOREL, A.M. Leaf press juice from *Bryophyllum pinnatum* (Lamarck) Oken induces myometrial relaxation. **Phytomedicine**, v. 19, n. 1, p. 74-82, 2011.

WALECZEK, K.J.; MARQUES, H.M.; HEMPEL, B.; SCHMIDT, P.C. Phase solubility studies of pure (2) $\alpha$ bisabolol and camomile essential oil with  $\beta$ -cyclodextrin. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, p. 247-251, 2003.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S., SHIVJI, G.M.; MAK, T. W.; SAUDER, D.N. CD4<sup>+</sup> Th1 and CD8<sup>+</sup> type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WEE, S. S.; SHIN, Y. W.; BAE, E. A.; KIM, D. H. Effect of chunghyuldan in chronic oxazolone-induced mouse dermatitis. **Biological Pharmacy Bulletin**; v. 28, p. 1079-1082, 2005.

WINYARD, P.G. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.3-4, 2003.

WORCESTER, D. L.; KATZ, J. J. In **Neutrons in Biology**; Schoenborn, B. P., Knott, R. B., Eds.; Plenum Press Div Plenum Publishing Corp: New York, 1996; Vol. 64, p 227.

WU, P.; MA, G.; LI, N.; DENG, Q.; YIN, Y. HUANG, R. Investigation of in vitro and in vivo antioxidante activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtustomentosa* (Ait) Hassk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 194-202, 2015.

YANAMOTO, Y.; GAYNOR, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**, v.107, n.2, p. 135-142, 2001.

YASIR, F.; WAQAR, M.A. Effect of indigenous plant extracts on calcium oxalate crystallization having a role in urolithiasis. **Urological Research**, v. 39, n. 5, p. 345-350, 2011.

YEMITAN, O.K.; SALAHDEEN, H.M. Neurosedative and muscle relaxant activities of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 187-193, 2005.

YEN, G.C.; DUH, P.D.; CHUANG, D.Y. Antioxidant activity of anthraquinones and anthrone. **Food Chemistry**, v. 70, p. 437-441, 2000.

YOKOYAMA, M.; OKANO, T. Targetable drug carries: present status and a future perspective. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, p. 77-80, 1996.

YOUNG, J.M.; WAGNER, B.; SPIRES, D.A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 48-52, 1983.

YOUNG, J.M., SPIRES, D.A., BEDORD, C.J., WAGNER, B., BALLRON, S.J., DE YOUNG, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367- 371, 1984.

YU, Z.; CUI, M.; YAN, C.; SONG, F.; LIU, Z.; LIU, S. Investigation of heptakis(2,6-di-O-methyl)-beta-cyclodextrin inclusion complexes with flavonoid glycosides by electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM**, v. 21, p.683–690, 2007.

ZANG, X.; WU, D.; LAI, J.; LU, Y.; YIN, Z.; WU, W. Piroxicam/2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating techning. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 98, p. 665-675, 2009.

ZHANG, Z.; JIANG, J.; YU, P.; ZENG, X.; LARRICK, J.W.; WANG, Y. Hipoglycemic and beta cell protective effects of andrographolide analogue for diabetes treatment. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, p. 62, 2003.

ZHANG, D.; CHU, L.; LIU, Y.; WANG, A.; JI, B.; WU, W.; ZHOU, F.; WEI, Y.; CHENG, O.; CAI, S.; XIE, L.; JIA G. Analysis of the Antioxidant Capacities of Flavonoids under Different Spectrophotometric Assays Using Cyclic Voltammetry and Density Functional Theory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 10277-10285, 2011.

ZHAO, M., WANG, H., YANG, B., TAO, H. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1138–1142, 2010.

ZHOU, Q.; WEI, X.; DOU, W.; CHOU, G.; WANG, Z. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. **Carbohydrate polymers**, v. 95, p. 733–739, 2013.

ZIA, V.; RAJEWSKI, R.A.; STELLA, V.J. Effect of cyclodextrin charge on complexation of neutral and charged substrates: comparison of sulfobutylether $\beta$ CD to HP $\beta$ CD. **Pharmacological Reviews**, v. 18, p. 668-673, 2001.

Disponível em: < <http://revistapesquisa.fapesp.br/2005/04/01/da-natureza-para-a-farmacia/>>.  
Acesso em: 15 junho 2014.

Disponível em: < <http://www.wipo.int/portal/en/index.html>>.  
Acesso em: 15 junho 2014.

Disponível em: < <http://www.uspto.gov/>>.  
Acesso em: 15 junho 2014.

Disponível em: < <http://www.inpi.gov.br/>>.  
Acesso em: 15 junho 2014.

