

LILIAN LÚCIO HIRATA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS  
DE *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, CESALPINIACEAE,  
EM *SERUM***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré M. Santos.

CURITIBA  
2004

# Nota Biográfica

---



A autora graduou-se em Farmácia Industrial pela Universidade Federal do Paraná em 1996. Neste mesmo ano atuou como farmacêutica responsável da Farmácia Mirante da Serra e, entre 1997 e 2000, trabalhou como farmacêutica responsável na Farmácia Makrofarma. Fez um treinamento em controle de qualidade de medicamentos, insumos farmacêuticos, fitoterápicos e cosméticos no Laboratório de Controle de Qualidade e Pesquisa (LCQPq) em 2000 e, em meados desse mesmo ano, iniciou seus trabalhos como farmacêutica responsável pelo controle de qualidade da Farmácia de Manipulação Biolife, responsável pelas análises da matéria-prima, controle de processos e produto acabado, controle do ambiente produtivo e funcionários envolvidos, e também o atendimento ao cliente e à classe médica. Em meados de 2002, iniciou seus trabalhos como professora, lecionando farmacologia para o curso técnico de Podologia no SENAC-Curitiba e também presta assessoria na atualização de material didático da mesma empresa. Em 2002 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Insumos, medicamentos e correlatos, onde desenvolveu estudo sobre a capacidade antioxidante de extratos de folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, cujos resultados estão contidos nesta dissertação e estão em parte publicados em *Acta Farmacéutica Bonaerense*.

Hirata LL, Sato MEO e Santos CAM (2004) Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **23**:418-424.

# *Dedicatória*

---

Dedico esta dissertação a todos os pesquisadores, que mesmo sem condições ótimas de trabalho, lutam pelo desenvolvimento científico brasileiro e a todos aqueles que farão uso deste trabalho.

# *Agradecimentos*

---

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua onipresença.

Ao Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos, pela orientação, amizade, paciência e dedicação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayumi Eliza Otsuka Sato, pela contribuição com o trabalho, indicação dos primeiros passos, esforço, amizade e pela gentileza em ceder o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, equipamentos, matérias-primas e ajuda na aquisição do padrão de isovitexina necessários ao andamento do trabalho.

Aos Prof. Tit. José Domingos Fontana, Prof. Dr. Roberto Pontarolo, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tânia Maria Bordin Bonfim, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Almeriane M. Weffort Santos pelo empréstimo de equipamentos, doação de reagentes e utilização dos respectivos laboratórios.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maique Weber Biavatti, da UNIVALI/SC, Prof. Silvio Franchi Miró e Prof. Claudemir Policarpo de Azevedo, ambos da PUC/PR, pela ajuda no desenvolvimento de algumas das metodologias utilizadas neste trabalho.

Ao Frigorífico Basso – Bateias/PR, que gentilmente cedeu as orelhas de porco para os testes de permeação.

Às alunas de graduação Mônica C. Pellizaro e Vivian M. E. Okiyama, pela inestimável ajuda no andamento da parte prática do trabalho.

Ao amigo de pós-graduação Waldemar de Paula Júnior e à aluna de graduação Lucielly Borges pela ajuda com o teste de eritrócitos.

Às auxiliares de laboratório, Maria do Rocio Baldon dos Reis, Geni Peruzzo e Irene Ermelino dos Santos, pela presteza de seus auxílios técnicos durante as experimentações.

À todos os professores, amigos e colegas da Pós-graduação e alunos da graduação que alegraram e cultivaram a minha amizade durante esse período.

Aos meus pais que ajudaram financeiramente nos três últimos meses do trabalho.



# Epígrafe

---



*“A pior coisa que pode acontecer na vida de uma pessoa não é quando seu projeto não dá certo, seu plano de ação não funciona ou quando a viagem termina no lugar errado. O pior é não começar. Esse é o maior naufrágio”.*  
(Amyr Klink – *Mar sem fim*, Cia. das Letras)

# Sumário

---

NOTA BIOGRÁFICA.....	ii
DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	ix
ESQUEMAS, TABELAS E ANEXOS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUÇÃO.....	1
Plantas medicinais e o desenvolvimento de fitopreparados.....	1
Estrutura e função da pele humana.....	3
Aspectos gerais do envelhecimento precoce.....	6
Estresse oxidativo e radicais livres.....	9
Antioxidantes.....	13
Antioxidantes vegetais.....	16
<i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae.....	18
Hidrogéis.....	22
Classificação.....	23
Estrutura reticular do hidrogel.....	24
<i>Serum</i> .....	24
Métodos para avaliar a absorção cutânea.....	25
Aparelhos utilizados no teste <i>in vitro</i> .....	26

Membranas utilizadas nos estudos de liberação e permeação cutânea <i>in vitro</i> de ativos contidos em produtos dermatológicos.....	27
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
Material.....	29
Solventes e soluções.....	29
Métodos.....	29
Obtenção do extrato hidroetanólico bruto das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	29
Obtenção do extrato liofilizado (EL) de folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	30
Obtenção do extrato atomizado (ESD) de folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	30
Desenvolvimento da forma farmacêutica.....	31
Avaliação do perfil cromatográfico das formulações de gel-base.....	32
Análise quantitativa do teor de flavonóides dos extratos.....	33
Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH <sup>*</sup> (1,1-difenil-2-picrato-hidrazila).....	34
Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico.....	34
Verificação da capacidade antioxidante pela prevenção do estresse oxidativo induzido em eritrócitos humanos.....	34
Caracterização físico-química das formulações de serum selecionadas....	37
Doseamento da isovitexina presente nos extratos, serum e solução tampão por meio de CLAE.....	38
Permeação cutânea <i>in vitro</i> do serum contendo extratos das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	39
Pesquisa de marcador (isovitexina) retido na pele de orelha de porco.....	41
Acetilação do extrato liofilizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	41
Perda por dessecação dos extratos preparados (EL e ESD).....	42
Análise estatística.....	42

RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
Perda por dessecação dos extratos preparados (EL e ESD).....	45
Análise do teor de flavonóides dos extratos.....	45
Métodos analíticos para a avaliação da atividade antioxidante.....	46
Determinação da capacidade antioxidante dos extratos de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride pelo método com DPPH*.....	47
Determinação da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico.....	52
Verificação da capacidade antioxidante dos extratos de folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride na prevenção do estresse oxidativo induzido em eritrócitos humanos.....	54
Avaliação por CLAE do perfil cromatográfico dos extratos hidroetanólico bruto, EL e ESD.....	58
Doseamento da isovitexina presente nos extratos por meio de CLAE.....	63
Forma farmacêutica <i>serum</i> .....	65
Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE das formulações de gel-base.....	65
Caracterização físico-química das formulações de <i>serum</i> selecionadas....	66
Determinação da capacidade antioxidante dos <i>serum</i> com extratos das folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico.....	68
Permeação cutânea.....	71
Liberação do marcador pela formulação de <i>serum</i> escolhida.....	73
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	86
ANEXO.....	96

# Lista de Figuras

---

1. Esquema geral de preparação de formas farmacêuticas derivadas de plantas medicinais.....	2
2. Desenho esquemático da estrutura da pele e seus anexos.....	4
3. Reações de glicosilação com formação de produtos finais de glicosilação avançada e algumas estruturas dos produtos finais de glicosilação.....	8
4. Formação de radicais livres por homólise e configuração da última camada de valência.....	9
5. Exemplo de reação em cadeia, em sistema fechado, gerada pela formação de radicais livres do metano e do cloro.....	9
6. Fontes dos radicais livres.....	10
7. Rede de trabalho dos antioxidantes de baixo peso molecular.....	15
8. Atividade antioxidante dos extratos das várias espécies de plantas medicinais encontradas na região da Usina Hidrelétrica de Salto Caxias, comparadas com a vitamina C e metabissulfito de sódio.....	19
9. Folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	19
10. Inflorescências de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	20
11. Fruto de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	20
12. Caules de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride com vestígios de ramos laterais.....	21
13. Desenho esquemático de uma célula de Franz modificada.....	26
14. Célula de Franz modificada.....	39
15. Equipamento Permeagear® acoplado à banho-maria, com quatro células de difusão <i>in vitro</i> .....	39
16. Pele de orelha de porco em processo de dissecação.....	40
17. Aspecto final das peles de orelha de porco.....	41
18. Perda por dessecação apresentada pelos extratos EL e ESD em g%.....	45
19. Flavonóides totais (g%) presentes na droga, fração hidrofílica (EH), EL e ESD.....	46
20. Atividade antioxidante do extrato clorofilado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride avaliada pelo método de redução do DPPH'.....	48
21. Comparação entre os valores de IC <sub>50</sub> apresentados pela vitamina C, EC, ESD e EL.....	51
22. Ensaio da capacidade antioxidante de extratos em diferentes concentrações por meio da redução do complexo fosfomolibdênico.....	52
23. Comparação da atividade antioxidante de EC, ESD e EL pelo ensaio da redução do complexo fosfomolibdênico.....	53

<b>24.</b> Formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com fenilhidrazina, vitamina C e extrato liofilizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	56
<b>25.</b> Redução na formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com vitamina C e extrato liofilizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	56
<b>26.</b> Formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com fenilhidrazina, vitamina C e de extrato atomizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	57
<b>27.</b> Redução na formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com vitamina C e extrato atomizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride.....	57
<b>28.</b> Estrutura química geral de um flavonóide indicando os aspectos que o fazem ter função captadora de radicais livres.....	59
<b>29.</b> Perfil cromatográfico de extrato metanólico purificado de <i>Passiflora actinia</i> apresentando pico característico de isovitexina por CLAE.....	60
<b>30.</b> Perfis cromatográficos de: A) extrato metanólico purificado de <i>Passiflora actinia</i> , B) fração hidrofílica de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride e C) extrato liofilizado de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride, apresentando os picos característicos de isovitexina e vitexina por CLAE.....	60
<b>31.</b> Cromatograma da co-injeção do EL de <i>B. microstachya</i> (Raddi) Macbride e extrato metanólico purificado de <i>P. actinia</i> mostrando a sobreposição dos picos de isovitexina por CLAE.....	61
<b>32.</b> Cromatogramas do EL de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride; extrato metanólico purificado de <i>Passiflora actinia</i> e co-injeção dos extratos EL e <i>P. actinia</i> por CLAE.....	61
<b>33.</b> Perfil cromatográfico de: A) extrato hidroetanólico bruto de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride e B) EL, apresentando os picos de isovitexina e vitexina com co-injeção dos padrões por CLAE.....	62
<b>34.</b> Curva de calibração do padrão de isovitexina em CLAE nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/ml.....	64
<b>35.</b> Perfil cromatográfico das diversas fórmulas de gel-base testadas, com EDTA dissódico por CLAE.....	66
<b>36.</b> Comparação das atividades antioxidantes relativas dos <i>serum</i> adicionados de ESD e da vitamina C (200 µg/ml) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.....	69
<b>37.</b> Comparação das atividades antioxidantes relativas dos <i>serum</i> adicionados de EL e da vitamina C (200 µg/ml) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.....	69
<b>38.</b> Comparação das atividades antioxidantes relativas dos <i>serum</i> adicionados de ESD e da vitamina C (utilizada na mesma concentração do extrato) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.....	70

<b>39.</b> Comparação das atividades antioxidantes relativas dos <i>serum</i> adicionados de EL e da vitamina C (utilizada na mesma concentração do extrato) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico.....	71
<b>40.</b> Perfil cromatográfico da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) utilizada nos ensaios de permeação cutânea <i>in vitro</i> por CLAE.....	74
<b>41.</b> Perfis cromatográficos dos <i>serum</i> de Carbopol 934 <sup>®</sup> adicionados de (A) ESD e (B) EL por CLAE.....	75
<b>42.</b> Cromatogramas das amostras (A) 12 h e (B) 24 h do teste de liberação <i>in vitro</i> de <i>serum</i> Carbopol 934 <sup>®</sup> com ESD por CLAE.....	75
<b>43.</b> Cromatogramas das amostras (A) 12 h e (B) 24 h do teste de liberação <i>in vitro</i> de <i>serum</i> Carbopol 934 <sup>®</sup> com EL por CLAE.....	76
<b>44.</b> Cromatograma da solução obtida da membrana utilizada no experimento da permeação cutânea <i>in vitro</i> do <i>serum</i> de Carbopol 934 <sup>®</sup> com ESD.....	77
<b>45.</b> Cromatogramas das soluções obtidas das membranas utilizadas no teste de liberação <i>in vitro</i> de (A) EL e (B) ESD.....	78
<b>46.</b> Perfil cromatográfico do extrato acetilado de folhas de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride, em coluna C-8, por CLAE.....	79
<b>47.</b> Cromatogramas da formulação de <i>serum</i> Carbopol 934 <sup>®</sup> com EA, antes e após 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> por CLAE.....	80
<b>48.</b> Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> de formulação de <i>serum</i> de carbopol 934 <sup>®</sup> com EA por CLAE.....	80
<b>49.</b> Cromatogramas da formulação de <i>serum</i> de Pemulen TR2 <sup>®</sup> com EA, antes e após 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> por CLAE.....	80
<b>50.</b> Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> da formulação de <i>serum</i> Pemulen TR2 <sup>®</sup> contendo EA por CLAE.....	81
<b>51.</b> Cromatogramas da formulação de <i>serum</i> de Pemulen TR2 <sup>®</sup> com ESD, antes e após 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> por CLAE.....	81
<b>52.</b> Cromatograma da amostra no tempo de 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> com formulação de <i>serum</i> de Pemulen TR2 <sup>®</sup> com ESD por CLAE.....	81
<b>53.</b> Cromatogramas da formulação de <i>serum</i> de Pemulen TR2 <sup>®</sup> com EL, antes e após 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> por CLAE.....	82
<b>54.</b> Cromatograma da amostra no tempo de 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> com formulação de <i>serum</i> de Pemulen TR2 <sup>®</sup> com EL por CLAE.....	82
<b>55.</b> Perfil cromatográfico da vitamina C (Sigma <sup>®</sup> ) em coluna C-8 por CLAE.....	83
<b>56.</b> Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> de formulação de <i>serum</i> de Carbopol 934 <sup>®</sup> com vitamina C, mostrando pico característico da vitamina C.....	83
<b>57.</b> Cromatograma da co-injeção da vitamina C padrão na amostra do tempo 12 h do teste de liberação <i>in vitro</i> de formulação de Carbopol 934 <sup>®</sup> com vitamina C....	84
<b>58.</b> Cromatogramas de: amostra do tempo 12h do teste de liberação <i>in vitro</i> de formulação de Carbopol 934 <sup>®</sup> com vitamina C e da co-injeção da mesma com vitamina C padrão.....	84

## Esquemas

---

1. Cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria.....	11
2. Reação de Fenton.....	14
3. Provável rota de reação para substâncias fenólicas com o radical DPPH'.....	49

## Tabela

---

1. Avaliação físico-química das formulações de <i>serum</i> com extratos ESD e EL de <i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride: pH , densidade, viscosidade e espalhabilidade.....	67
--	----

## Anexo

---

A. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.....	96
--	----



# *Lista de abreviaturas, siglas e símbolos*

---

No presente trabalho foi adotado o Sistema Internacional de Pesos e medidas, apenas atentando para o fato de que  $1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3$ .

ABPM	antioxidantes de baixo peso molecular
AFGP	1-alquil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol
ATP	adenosina trifosfato
A/O	água/óleo
°C	graus Celsius
CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	ácido acético
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CML	carboximetil lisina
DNA	ácido desoxirribonucléico
DPPH	1,1-difenil-2-picrato-hidrazila
e <sup>-</sup>	elétron
EA	extrato acetilado
EC	extrato clorofilado
EH	fração hidrofílica
EDTA – Na <sub>2</sub>	ácido etilenodiaminotetracético dissódico
EL	extrato liofilizado
ERO	espécies reativas de oxigênio
ESD	extrato atomizado em spray-dryer
FA	fator A
FB	fator B
FD	fator D
Fe <sup>2+</sup>	ferroso
Fe <sup>3+</sup>	férrico
FFI	2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1- <i>H</i> -imidazol
FH	cloridrato de fenil-hidrazina
Fosfato-Mo <sup>+5</sup>	fosfato molibdênico
<i>g</i>	gravidade
°GL	graus Gay-Lussac
GSH	glutaciona reduzida
IC <sub>50</sub>	concentração inibitória 50%
K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	ferricianeto de potássio

kgf/cm <sup>2</sup>	kilograma-força/centímetro quadrado
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	fosfato de potássio monobásico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de potássio dibásico
λ	comprimento de onda
LDL	lipoproteína de baixa densidade
M	molar
metaHb	metahemoglobina
mM	mili molar
mmHg	milímetros de mercúrio
MnSOD	manganês superóxido-dismutase
NAD <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP <sup>+</sup>	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NO	radical nitro
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	fosfato de sódio dibásico
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	fosfato de sódio monobásico dihidratado
O <sub>2</sub>	oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>1</sup>	oxigênio singlete
O <sub>2</sub> <sup>-·</sup>	radical superóxido
OH <sup>·</sup>	radical hidroxila
O/A	óleo/água
PBS	solução salina tamponada com fosfato
pH	potencial hidrogeniônico
PMT	peroxidação mediada por α-tocoferol
p/v	peso/volume
q. s. p.	quantidade suficiente para
®	marca registrada
RO <sup>·</sup>	radical oxigenado
rpm	rotações por minuto
SOD	superóxido dismutase
UV	ultravioleta
UV/VIS	ultravioleta/visível
UVA	ultravioleta A
UVB	ultravioleta B
v/v	volume/volume

## Resumo

---

As folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride Macbride, Cesalpiniaceae, popularmente conhecida como escada-de-macaco, possuem capacidade antioxidante elevada podendo ser úteis na prevenção do envelhecimento precoce da pele provocado pelo estresse oxidativo, utilizando uma formulação de uso tópico, o *serum*. Para verificar a manutenção da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride obtidos por maceração com etanol 77°GL e submetidos à secagem por liofilização e por atomização foram avaliados pela reação com o radical DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e pela prevenção da formação de metahemoglobina induzida por fenil-hidrazina em eritrócitos humanos, antes e após incorporação nas diferentes formulações de *serum*. Os resultados confirmaram o alto poder antioxidante dos extratos das folhas, em especial para aquele obtido por atomização. O perfil cromatográfico dos extratos por CLAE permitiu a identificação de isovitexina após co-injeção com um padrão primário puro, utilizado como substância marcadora para a espécie *B. microstachya* (Raddi) Macbride. Os extratos foram adicionados a formulações de *serum* contendo Natrosol<sup>®</sup>, Carbopol<sup>®</sup> - 934, 940 e 2001, Ultrez 10, ETD 2020, Pemulen TR2<sup>®</sup> e *serum* de silicones (DC 9040<sup>®</sup> associado ao DC 245<sup>®</sup>) como agentes gelificantes, os quais não interferiram sobre o potencial antioxidante dos extratos. A formulação contendo Carbopol 934<sup>®</sup> apresentou maior potencial antioxidante para ambos extratos. Entretanto, experimentos de liberação *in vitro* com a formulação contendo Carbopol 934<sup>®</sup>, demonstraram retenção do marcador, mesmo após várias modificações na formulação original.

# Abstract

---

The leaves of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride Macbride, Cesalpiniaceae, known as escada-de-macaco by the popular medicine, present high antioxidant capacity that can be useful in preventing skin ageing induced by oxidative stress through a topic formulation *serum*. The antioxidant activity against DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) free radicals, by the phosphomolybdenum method and by the human erythrocyte methahemoglobin formation inhibition induced by phenyl-hydrazine were performed with leaves extracts obtained from maceration in ethanol 77°GL, dried by freeze and spray drying process, were performed before and after incorporation in *serum* formulation. The results confirmed the antioxidant capacity of the extracts, mainly in the spray-dried one. HPLC profiles from both extracts showed the presence of isovitexin after co-injection with commercial standard sample. The extracts were incorporated in different formulations of *serum* using Natrosol<sup>®</sup>, Carbopol<sup>®</sup> - 934, 940 and 2001, Ultrez 10, ETD 2020, Pemulen TR2<sup>®</sup> and silicones (DC 9040<sup>®</sup> associated with DC 245<sup>®</sup>) as gelling agents. None of the gelling agents interfere in antioxidant capacity of both extracts and the *serum* prepared with Carbopol 934<sup>®</sup> presented the highest antioxidant activity. However, *in vitro* skin permeation experiments using the Carbopol 934<sup>®</sup> gelling agent was not able to liberate the marker isovitexin to any extent and even after several modifications in the original formula.

# *Introdução*

---

## ***Plantas medicinais e o desenvolvimento de fitopreparados***

A Resolução nº. 48 de 16 de março de 2004, do Ministério da Saúde, define produto fitoterápico como “todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança é validada através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentações tecnocientíficas em publicações ou ensaios clínicos Fase III. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”, podendo ser adicionado de adjuvantes (“substância de origem natural ou sintética adicionada ao medicamento com a finalidade de prevenir alterações, corrigir e/ou melhorar as características organolépticas, biofarmacotécnicas e tecnológicas do medicamento”) (ANVISA, 2004) e levando-se em conta que estes podem modificar o efeito das substâncias ativas, por exemplo influenciando sua estabilidade ou biodisponibilidade (Schulz et al., 2002).

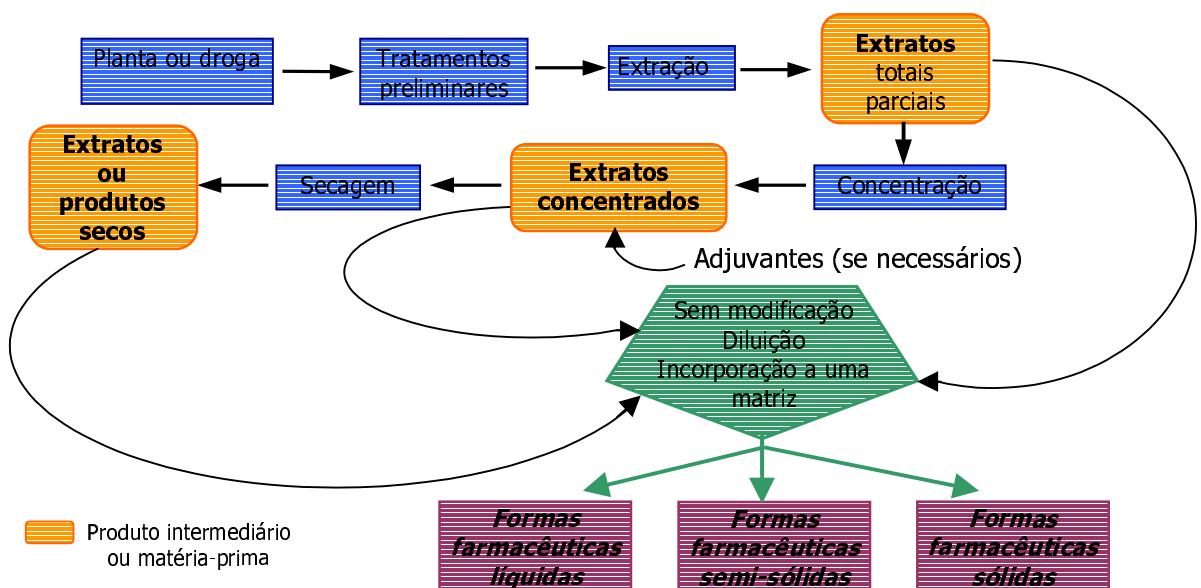
O problema é que a maioria das plantas brasileiras em uso não está descrita em literaturas oficiais, além disso, as que constam nas farmacopéias não foram avaliadas quanto a sua segurança e eficácia e o desenvolvimento de um novo medicamento envolve um processo complexo de alto custo e de longo prazo. Normalmente, leva-se em torno de 10 a 25 anos para que um novo medicamento seja desenvolvido.

Para o desenvolvimento tecnológico de um produto fitoterápico são necessários estudos prévios em diversas áreas do conhecimento como: botânica, agronomia, fitoquímica, farmacologia, toxicologia, tecnologia farmacêutica, desenvolvimento de metodologias analíticas para avaliação do teor da substância ou grupo de substâncias ativas e do perfil qualitativo dos constituintes químicos de interesse presentes na matéria-prima, produtos intermediários e produtos finais; avaliação das características físicas e físico-químicas dos produtos tecnologicamente transformados (Sonaglio et al., 1999).

O primeiro passo envolve a pesquisa etnobotânica, ou seja, a observação do uso popular de plantas nas diferentes culturas. Também pode-se selecionar uma planta através de pesquisa quimiotaxonômica.

Atualmente preconiza-se a padronização das culturas de plantas medicinais e o uso de marcadores que indicam a presença dos componentes químicos na planta. Isso conduz à obtenção de extratos padronizados, com quantidades definidas de compostos químicos. Conforme a legislação vigente (ANVISA, 2004), "marcadores são componentes ou classes de compostos químicos (por exemplo: alcalóides, flavonóides e ácidos graxos) presentes na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos".

A obtenção de formas farmacêuticas derivadas de matérias-primas vegetais necessita também de um planejamento inicial, com a finalidade de decidir a matéria-prima vegetal e os adjuvantes mais adequados, a seqüência de ações de transformação e os pontos e metodologias de controle mais apropriados. Em geral, o produto intermediário que inicia o processamento da forma farmacêutica trata-se de um produto oriundo da transformação da planta ou da droga (Figura 1) (Sonaglio et al., 1999).



**Figura 1:** Esquema geral de preparação de formas farmacêuticas derivadas de plantas medicinais, adaptado de (Sonaglio et al., 1999).

Uma vez que a maior parte do peso seco das plantas medicinais consiste de substâncias que formam a estrutura da planta, mais de 80% dos fitoterápicos atualmente

em uso são produzidos a partir de extratos. Na maioria das preparações líquidas são utilizados extratos fluidos e a maior parte das preparações sólidas, extratos secos. Relativamente poucos produtos fitoterápicos são fabricados a partir de sucos frescos de plantas ou de destilados (Schulz et al., 2002).

No caso específico deste trabalho, optou-se pela utilização de extratos secos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride veiculados em *serum*, uma forma farmacêutica semi-sólida, de característica geilificada fluida.

## ***Estrutura e função da pele humana***

A pele constitui-se de um sistema cinético altamente organizado e em renovação constante, com as células em processo de migração, divisão, diferenciação e morte. Toda essa atividade metabólica intensa traduz-se pela manutenção de uma barreira eficaz de proteção dos órgãos subjacentes, pela coesão das células epidérmicas e um sistema de ligação da epiderme à derme, a junção dermoepidérmica.

Devido à arquitetura e propriedades físicas, químicas e biológicas de suas várias estruturas, a pele como membrana envolvente e isolante é um órgão capacitado à execução de múltiplas funções, tais como:

➤ Proteção: constitui a barreira de proteção das estruturas internas do organismo à ação de agentes externos e, ao mesmo tempo, impede perdas de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno. As barreiras da permeabilidade estão situadas em várias camadas das células que formam a superfície da epiderme; a proteção mecânica é proporcionada pela derme subjacente. Também possui proteção imunológica, sendo um órgão de grande atividade, onde atuam intensamente os componentes da imunidade celular.

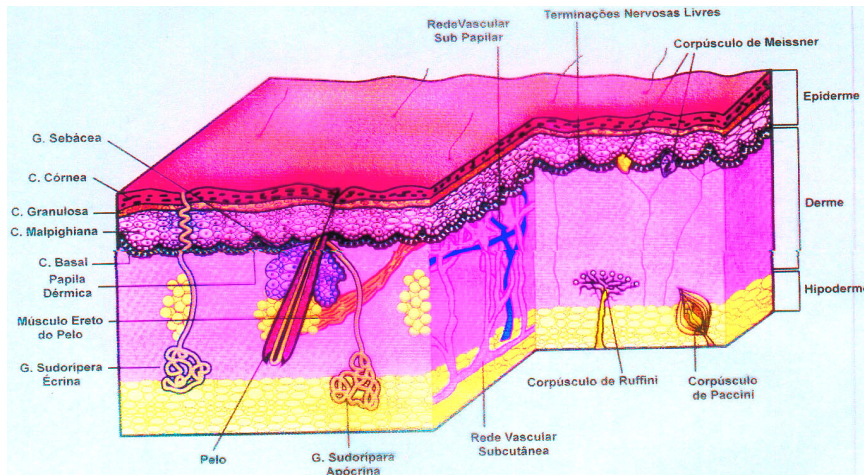
➤ Termorregulação: devido à sudorese, constrição e dilatação da rede vascular cutânea, a pele processa o controle homeostático da temperatura corpórea.

➤ Percepção: por meio da complexa e especializada rede nervosa cutânea, a pele é o órgão receptor sensível do calor, frio, dor e tato.

➤ Secreção: a secreção sebácea é importante para a manutenção eutrófica da própria pele, particularmente da camada córnea evitando a perda de água. Além disso, tem propriedades antimicrobianas e contém substâncias precursoras da vitamina D (Sampaio e Rivitti, 2001).

A pele representa mais de 15% do peso corpóreo com variações ao longo de sua extensão, sendo por vezes mais flexível e elástica, ou mais rígida. É lisa em algumas zonas e rugosa ou pregueada em outras. A superfície total da pele oscila entre 2.500 cm<sup>2</sup>, no recém-nascido a 18.000 cm<sup>2</sup> no adulto (Sampaio e Rivitti, 2001).

A pele divide-se em três partes: a camada superior mais externa, sendo representada pela epiderme; uma intermediária, derme ou córion; e uma camada profunda, hipoderme ou tecido celular subcutâneo (Figura 2) (Urmacher, 1997).



**Figura 2:** Estrutura esquemática da pele e seus anexos (Sampaio e Rivitti, 2001).

Histologicamente, a epiderme é formada por um epitélio estratificado escamoso queratinizado que contém quatro tipos de células: queratinócitos, melanócitos, células de Merkel e células de Langerhans e formada por camadas bem definidas, as quais, do interior para o exterior, são:

i) *Camada germinativa ou basal:* camada contínua composta de células basais (as quais originam os queratinócitos) e melanócitos (10% do total de células da camada basal), as quais encontram-se justapostas constituindo fileira única que repousa sobre a membrana basal. As células da camada basal multiplicam-se por mitose em células cornificadas superficiais que se desprendem, ocorrendo um processo de diferenciação e de morte celular.

ii) *Camada malpighiana ou camada de células espinhosas:* composta por quatro a oito fileiras de células poligonais ligeiramente achatadas, apresentando como característica as pontes intercelulares que garantem a coesão entre as células adjacentes e resistência da epiderme ao atrito. É uma área de grande atividade metabólica.



iii) *Camada granulosa*: compõe-se de uma a quatro fileiras de células alongadas, paralelas à superfície cutânea com grânulos de queratohialina.

iv) *Camada lúcida*: encontrada apenas nas regiões palmar e plantar e evidenciada por fina camada semitransparente.

v) *Camada córnea*: formada por células mortas anucleadas, desidratadas, com aspecto de finas lâminas superpostas, sendo as mais superficiais eliminadas.

Para que um queratinócito basal se transforme em um corneócito, são necessários de 26 a 42 dias e, para que essa mesma célula transite através da camada córnea e descame, são necessários mais quinze dias (Bechelli e Curban, 1988).

As células renovam-se periodicamente e especializam-se para cumprir a função de proteção pela elaboração de uma proteína chamada queratina (*queratos* = córneo), elaborada pelos queratinócitos, que constituem 95% da epiderme e cornificam a superfície cutânea. Também sintetiza um pigmento conhecido como melanina (*melas* = negro), pelos melanócitos, que protege o organismo contra as radiações UV à medida que as células ascendem da camada mais interna - basal, para a mais externa - córnea. A epiderme não possui vasos sanguíneos próprios e recebe elementos nutritivos oriundos dos capilares da derme (Wilkinson e Moore, 1990). As células de Langerhans são histiócitos com prolongamentos citoplasmáticos especializados com a função de apresentação de antígenos para os linfócitos T (importância em reação de hipersensibilidade cutânea) (Urmacher, 1997). As células de Merkel possuem funções neuroendócrinas. Não são observadas em colorações histológicas de rotina, mas somente por métodos imunohistoquímicos (Sampaio e Rivitti, 2001).

A derme, segunda camada tissular, também denominada córion, compreende denso estroma fibro-elástico no qual situam-se as estruturas vasculares, nervosas e os anexos cutâneos da pele: glândulas sebáceas, sudoríparas e folículos pilosos (Sampaio e Rivitti, 2001). Constitui-se de um tecido eminentemente fibroso (70% de fibras colágenas, 2 a 4% de fibras elásticas e reticulares). É cerca de trinta vezes mais espessa que a epiderme e apresenta também uma substância coloidal amorfa, fundamental, constituída de mucopolissacarídeos. Possuem poucas células que são de natureza conjuntiva como os fibroblastos (células jovens), que secretam os componentes dérmicos; fibrócitos (células maduras); mastócitos; histiócitos ou macrófagos e melanócitos. Também a derme alberga os sistemas nervoso, linfático e sanguíneo e rodeia os apêndices epidérmicos invaginados, isto é, os folículos pilosos com suas glândulas associadas e as glândulas sudoríparas écrinas. Possuem fibras nervosas que terminam em ramificações encapsuladas. A derme possui ainda, as papilas dérmicas que desenvolvem papel importante por aumentarem a

superfície de contato entre a derme e a epiderme favorecendo o intercâmbio entre elas. Apresenta como funções principais: sustentação, preenchimento, defesa contra microorganismos e nutrição (Wilkinson e Moore, 1990; Viglioglia e Rubin, 1991).

A hipoderme, ou panículo adiposo, é a camada mais profunda da pele, de espessura variável, composta exclusivamente por tecido adiposo, formando lóbulos que são separados por traves conjuntivo-vasculares. Relacionam-se em sua porção superior, com a derme profunda, constituindo-se a junção dermohipodérmica, em geral, sede das porções secretoras das glândulas apócrinas ou écrinas, dos bulbos dos pêlos, vasos e nervos. Funcionalmente, além de reserva nutritiva, participa do isolamento térmico e da proteção mecânica do organismo às pressões e traumatismos externos e facilita a mobilidade da pele em relação às estruturas subjacentes (Sampaio e Rivitti, 2001).

## ***Aspectos gerais do envelhecimento precoce***

Dois grupos de teorias tentam explicar o processo do envelhecimento. O primeiro inclui as teorias que postulam um determinado programa genético e cronológico para a gradual mudança no fenótipo. O segundo assume que a exposição repetitiva às influências danosas são a explicação para as mudanças que levam ao envelhecimento (Boukamp, 2001; Ma et al., 2001; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001).

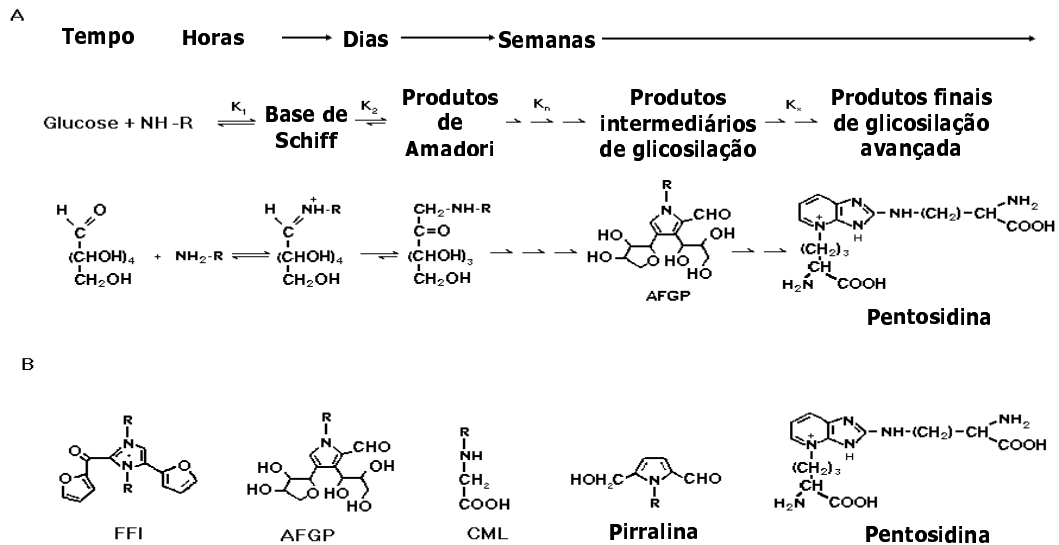
Os princípios básicos que norteiam o envelhecimento cutâneo também possuem relevância em doenças degenerativas comuns do tecido conectivo, como a osteoartrite, osteoporose e arteriosclerose. O envelhecimento cronológico (intrínseco) afeta a pele de maneira similar a outros órgãos (Ma et al., 2001). Devido a deficiências durante a replicação do DNA, os telômeros continuamente perdem parte de suas seqüências, e supõe-se que esta perda seja um fator de limitação para a capacidade replicativa celular, isto é, a perda telomérica é um mecanismo de contagem – o relógio interno do envelhecimento. Entretanto, as principais mudanças na pele, relacionadas ao envelhecimento, são as alterações da matriz e mudanças no padrão da expressão dos fibroblastos que, na derme, permanecem em fase estacionária por um longo período de tempo e somente precisam proliferar quando existe estimulação, como no caso de cicatrização, não ocorrendo o encurtamento dos telômeros. Os fatores derivados dos fibroblastos são essenciais para o crescimento normal e diferenciação dos queratinócitos, sendo, estes sim, afetados pela perda telomérica. Isso aumenta a possibilidade de que a contínua proliferação é vantajosa na substituição de células deficientes (envelhecidas). O

encurtamento telomérico, que está claramente em estado avançado na epiderme quando comparado com a derme, pode ser apenas uma consequência menor do envelhecimento da pele (Boukamp, 2001). Sobrepondo-se a esse processo inato, regulado em maior parte por androgênios e outros hormônios, o envelhecimento extrínseco está relacionado a danos ambientais, principalmente à indução por raios ultravioleta, no tecido conectivo dérmico da pele, por exposição solar crônica (fotoenvelhecimento) sendo responsável por 90% das mudanças que ocorrem na pele (Ma et al., 2001; Zouboulis e Boschnakow, 2001). Há evidências que esses processos de envelhecimento, intrínseco e extrínseco, possuem mecanismos biológicos, bioquímicos e moleculares, em parte sobrepostos. Mudanças celulares como alterações qualitativas e quantitativas das proteínas da matriz extracelular estão envolvidas, resultando na perda da capacidade de retração e do poder tensor com a formação de rugas, aumento da fragilidade e diminuição da cicatrização de feridas (Ma et al., 2001; Jenkins, 2002). A pele torna-se mais fina, pálida, seca e há um aumento de rugas. O sistema superficial capilar torna-se visível, desordens pigmentares aparecem, a pele perde a firmeza e as suas propriedades mecânicas. Células cutâneas se proliferam na epiderme dando aparência irregular. Há menos colágeno e fibras elásticas, resultando na diminuição da elasticidade da pele. Os fibroblastos e os queratinócitos se reproduzem mais lentamente (Soussolier e Berthon, 1988). Os sinais da dermatoheliose – incluindo hiperqueratinização, rugas, pigmentação irregular e lesões capilares – tornam-se mais visíveis. A função de barreira da pele é diminuída e o sistema de defesa da pele é menos eficiente, isto é, as células de Langerhans são exauridas e aquelas que restam são menos ativas e as enzimas antioxidantes perdem sua atividade. A atividade do fibroblasto é diminuída, com síntese lenta de colágeno. Esta síntese é controlada por hormônios e mensageiros como citocinas, as quais também se tornam menos ativas. O colágeno sofre ligação cruzada pela glucose no fenômeno da glicosilação (Figura 3) (Soussolier e Berthon, 1988).

A partir dos 30 anos de idade, a produção de fibras elásticas diminui, enquanto que os fibroblastos produzem mais elastase, a qual destrói a elastina. As células exaustam seu potencial de divisão e a replicação contínua danifica seu genoma, levando a uma diminuição na produção de queratinócitos na epiderme. Como a renovação da epiderme é mais lenta, ela induz a uma descamação irregular e ao afinamento da epiderme (Soussolier e Berthon, 1988).

Há um decréscimo geral no número de folículos pilosos no corpo com o envelhecimento, e observa-se a atrofia e a fibrose dos mesmos. Em adição, têm sido

descrito um acréscimo do número de folículos pilosos na fase telogênica ou estacionária do ciclo celular do pêlo (Bologna, 1995).



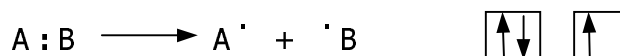
**Figura 3:** (A) Reações de glicosilação com formação de produtos finais de glicosilação avançada e (B) algumas estruturas dos produtos finais de glicosilação, onde: FFI = 2-(2-furoil)-4(5)-furanil-1-*H*-imidazol, AFGP = 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirrol, CML = carboximetil lisina (Huttunen, 1996) citado em Picheth (Picheth et al., 2002).

Estudos iniciais da produção sebácea relatam que a secreção sebácea na mulher diminui gradualmente após a menopausa, com pouca variação após os setenta anos, enquanto que no homem, os níveis de sebo permanecem em geral invariáveis até a idade de oitenta anos. Geralmente, o número de glândulas sebáceas permanece aproximadamente o mesmo durante toda a vida, enquanto que o tamanho tende a mudar com a idade. As diferenças na secreção sebácea, nos vários tempos de vida, estão associadas, em particular, com mudanças concomitantes na produção de androgênios. As células da glândula sebácea são normalmente renovadas completamente a cada mês. Níveis reduzidos de androgênios levam a um decréscimo da renovação celular em glândulas sebáceas envelhecidas da face, resultando em hiperplasia glandular na velhice. O fotoenvelhecimento está associado ao desenvolvimento de tumores sebáceos benignos e malignos (Bologna, 1995; Zouboulis e Boschnakow, 2001).

Quanto aos queratinócitos, o tempo de renovação epidermal diminui aproximadamente 50%, da idade de vinte para setenta anos e o tempo de reposição do estrato córneo é aproximadamente o dobro na velhice (Bologna, 1995).

## Estresse oxidativo e radicais livres

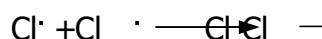
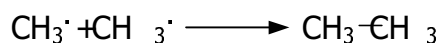
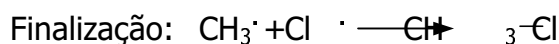
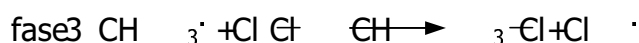
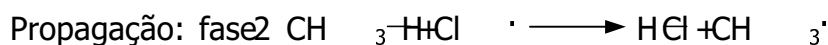
A idéia de que o envelhecimento é resultado de danos causados por radicais livres é creditada a Denham Harman (citado em Wickens, 2001) que em 1956 baseou sua teoria na observação de que a irradiação em seres vivos levava à indução da formação de radicais livres, os quais diminuíaam o tempo de vida desses seres e produziam mudanças semelhantes ao envelhecimento. Quando os radicais livres foram reconhecidos como um subproduto natural do metabolismo aeróbico (cerca de 2-3% do oxigênio consumido pela célula é convertida em radicais livres), Harman propôs que o envelhecimento e as doenças relacionadas à ele, poderiam ser causadas pelos efeitos a longo prazo dos danos oxidativos, os quais, por sua vez, eram modificados por fatores genéticos e ambientais (Wickens, 2001). De acordo com esta teoria, o lento desenvolvimento de danos celulares irreversíveis leva ao envelhecimento (Podda e Grundmann-Kollmann, 2001). Um radical livre é qualquer espécie química (átomo, molécula ou íon) que contém um elétron desemparelhado ou excedente em sua camada de valência (Figura 4).



**Figura 4:** Formação de radicais livres por homólise e configuração da última camada de valência.

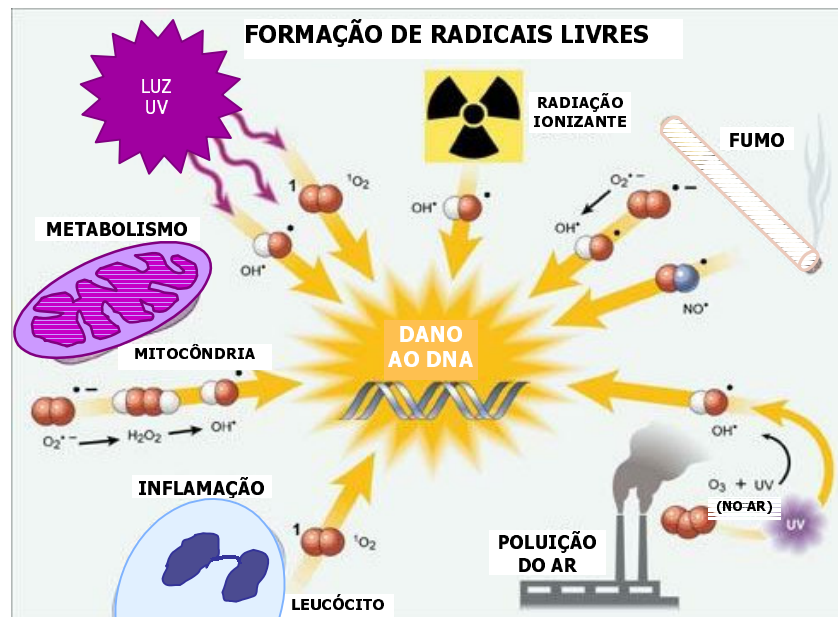
Este estado deixa subentendido que os radicais livres são energeticamente e cineticamente instáveis. Eles retornam ao estado estável doando um elétron para outra molécula ou retirando um elétron de outra molécula (Figura 5), podendo ser agentes redutores (doando um elétron) ou oxidantes (retirando um elétron) (Jay et al., 1998; Wickens, 2001).

Reação em cadeia:



**Figura 5:** Exemplo de reação em cadeia, em sistema fechado, gerada pela formação de radicais livres do metano e do cloro.

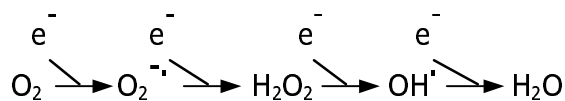
Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres aceleram o fenômeno do envelhecimento. De fato, os radicais livres são considerados os compostos que mais agem no envelhecimento, danificando o DNA e atuando na desidrogenação, hidroxilação e na glicosilação protéica. A última reação envolve a perda das funções biológicas de proteínas, como o colágeno e proteoglicanas, que resultam em alterações da estrutura da membrana e aumento da flacidez da pele (Jay et al., 1998). A fonte desses radicais livres pode ser endógena, associada às reações metabólicas (reação de oxidação na mitocôndria com a interrupção do transporte de elétron, fagocitose excessiva durante o processo de inflamação, ativação do metabolismo do ácido araquidônico) e exógena (devido à radiação ultravioleta – em especial o UVA que reage com fotossensibilizadores e com cromóforos da pele como a melanina), com fatores ambientais – pesticidas, poluição, fumaça de cigarro -, medicamentos antitumorais e estilos de vida não saudáveis (Figura 6) (Soussolier e Berthon, 1988; Jay et al., 1998; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001).



**Figura 6:** Fontes dos radicais livres. Fonte endógena: mitocôndrias e processos inflamatórios. Fonte exógena: poluição, cigarro, luz ultravioleta e radiações ionizantes. Todas levando à danos no material genético.

Há várias maneiras pelas quais os radicais livres podem ser formados, sendo a mais abundante fonte geradora, as mitocôndrias (que usam cerca de 90% do  $O_2$  – oxigênio – usado pelo corpo humano) onde o oxigênio é reduzido em etapas seqüenciais para produzir água (Esquema 1). Ou seja, ele participa da cadeia de transporte de

elétrons da mitocôndria, onde é reduzido pela citocromo oxidase em água e o NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) é oxidado a  $\text{NAD}^+$ , para que ocorra a produção de ATP. Para a completa redução de uma molécula de oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna. Entretanto, 1-2% desses elétrons são perdidos durante o transporte, levando a formação de superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e subseqüentemente a outras numerosas espécies reativas de oxigênio (ERO) como o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicais hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ). Em concentrações apropriadamente elevadas, as ERO têm a capacidade de oxidar e danificar componentes celulares, enquanto que em concentrações medianas agem como mediadores e moléculas de mediação de transdução, sendo reguladores celulares (Soussolier e Berthon, 1988; Jay et al., 1998; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Sharma e Morgan, 2001; Wickens, 2001; Yamamoto, 2001). Existe, também, o oxigênio singlete ( $\text{O}_2^1$ ), obtido pela ação da luz na presença de um fotossensibilizador (Soussolier e Berthon, 1988; Jay et al., 1998; Ma, 2001 #13; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Yamamoto, 2001).



**Esquema 1:** Cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria. O oxigênio é reduzido em seqüência para produzir água.

As mitocôndrias são as organelas que mais suportam os danos causados pelos radicais livres. Elas não apenas contêm uma vulnerável membrana lipídica e, pelo menos cerca de uma centena de enzimas diferentes que estão envolvidas na produção de energia, mas também abrigam seu próprio material genético, o qual é altamente susceptível ao dano por radicais livres. O reparo no DNA é muito menos eficiente na mitocôndria do que no núcleo. Uma conseqüência desse desgaste é a redução da produção de ATP, que reduz a energia para manter muitos dos processos químicos celulares. Um resultado disso pode ser o esgotamento energético e a degeneração do tecido, sendo que ambos são indicações do envelhecimento (Wickens, 2001). Além disso, mitocôndrias com deficiências enzimáticas na cadeia respiratória podem liberar quantidades excessivas de radicais livres para o citoplasma e expor o núcleo e outros componentes celulares ao estresse oxidativo (Sharma e Morgan, 2001).

Outra fonte endógena, além das mitocôndrias supra citadas, inclui enzimas que podem indiretamente produzir ERO. Por exemplo, a enzima xantina oxidase que converte xantina a ácido úrico, também converte oxigênio a radicais superóxido durante esse processo. A enzima óxido nítrico sintetase pode produzir radicais NO diretamente na pele. Outras fontes de danos oxidativos podem incluir processos isquêmicos e pós-isquêmicos, os quais podem levar à uma superprodução de ERO, que por sua vez geram o dano oxidativo (Kohen, 1999). A pele também pode sofrer mudanças oxidativas induzidas por danos físicos como queimaduras e ferimentos (Kohen, 1999; Wickens, 2001). A destruição de tecido normal é uma das conseqüências de reações inflamatórias. Dos vários componentes do processo inflamatório, as ERO têm sido consideradas como a causa da morte celular. As ERO são produzidas pelos neutrófilos sangüíneos, eosinófilos, ou por monócitos/macrófagos que estão acumulados nos sítios de inflamação. Quando estimulados, as células fagocíticas liberam  $O_2^{\cdot-}$  no ambiente extracelular, o qual participa de reações que produzem  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$  e possivelmente  $O_2^1$ , sendo o  $H_2O_2$  o agente responsável pela morte celular (o peróxido de hidrogênio sendo uma molécula pequena e sem carga pode atravessar facilmente as membranas celulares). Há dois mecanismos gerais pelos quais o  $H_2O_2$  pode matar as células. Primeiro, uma quantidade de  $H_2O_2$  pode penetrar na célula e danificar um componente interno vital após exaurir os mecanismos de proteção. Alternativamente, a membrana celular externa que é relativamente desprotegida pode receber uma lesão fatal enquanto os constituintes internos continuam intactos devido à proteção enzimática da catalase e peroxidase (Simon et al., 1981; Ma et al., 2001).

Dentre as várias fontes exógenas de radicais livres, o fotoenvelhecimento é a mais importante causa do envelhecimento, a qual é causada em especial pela luz ultravioleta, que produz radicais livres (Soussolier e Berthon, 1988; Kohen, 1999; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Wickens, 2001). A radiação ultravioleta B (UVB, 280-320nm) e a ultravioleta A (UVA, 320-400nm) são componentes essenciais da luz solar que geram severo estresse oxidativo nas células cutâneas via interação com cromóforos intracelulares e fotossensibilizadores, resultando em danos genéticos transitórios e permanentes relacionados ao crescimento, diferenciação, senescência replicativa e degradação do tecido conectivo. Além da absorção direta de fótons do UVB pelo DNA e subseqüentes mudanças estruturais, a geração de ERO logo após a irradiação com UVA e UVB requer a absorção de fótons por moléculas fotossensibilizadoras endógenas. O fotossensibilizador excitado subseqüentemente reage com o oxigênio, resultando na



geração de ERO, incluindo o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e o oxigênio singlete ( $O_2^1$ ). Estes também podem ser produzidos por neutrófilos que estão em número aumentado na pele fotodanificada e contribuem para o estado pró-oxidante geral (Ma et al., 2001).

Um local que é particularmente susceptível à reações de peroxidação são as membranas celulares. Peróxidos lipídicos são conhecidos como produtores de perda irreversível da fluidez e elasticidade da membrana, a qual pode levar à ruptura da célula. Os produtos da quebra da peroxidação lipídica contribuem para a produção de lipofucsina, um pigmento granular marrom amarelado estruturalmente heterogêneo que se acumula com a idade e parece ser uma correlação universal de senescência animal. A produção de lipofucsina é particularmente notada em células pós-mitóticas e tem sido demonstrado que próximo à idade de 90 anos, cerca de 7% do volume intracelular de células miocárdicas humanas podem estar preenchidas por este pigmento. Ainda, a lipofucsina mostra algumas das evidências mais fortes de que o processo oxidativo ocorre *in vivo* e, além disso, sua formação no citoplasma compromete a função celular (Wickens, 2001).

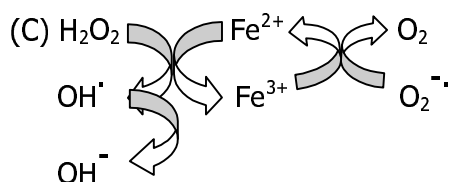
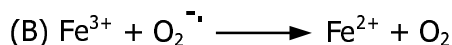
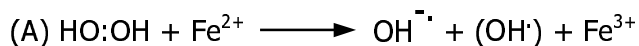
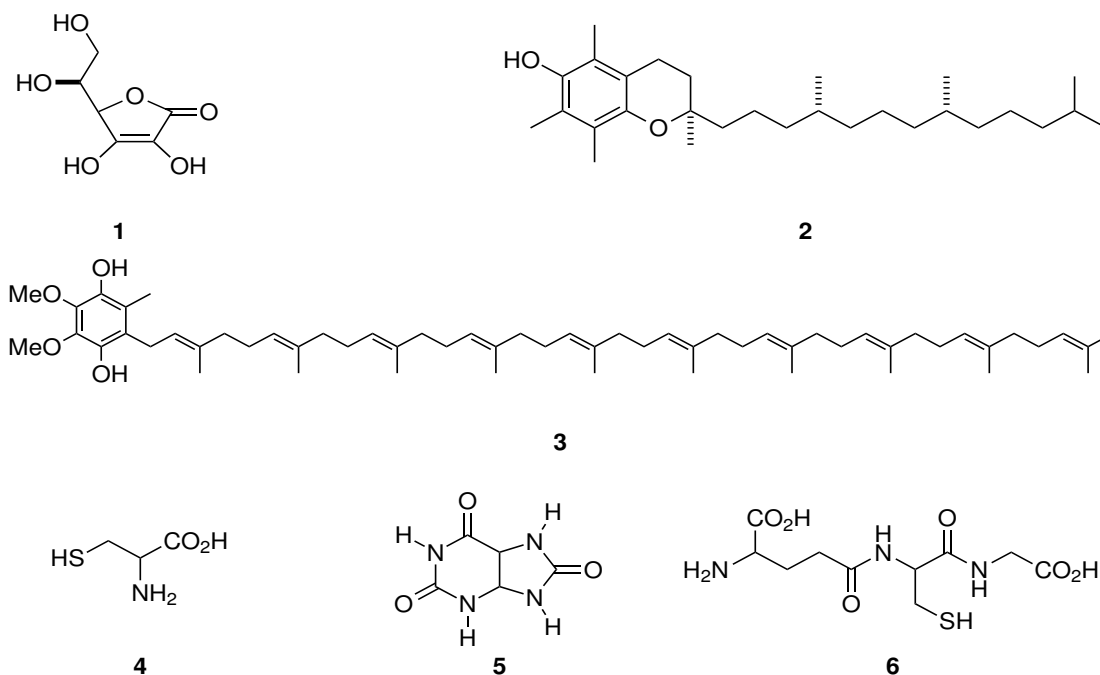
A atividade dos radicais livres também mostra a capacidade de oxidar e fazer ligações cruzadas com proteínas, incluindo enzimas, e tecido conectivo. Em particular, os resíduos de aminoácidos são altamente susceptíveis ao ataque oxidativo e tem sido demonstrado que existe um progressivo (quase exponencial) aumento nessa forma de dano nas células e tecidos do corpo em função da idade. Outro tipo de molécula que é altamente susceptível ao ataque por radicais livres é o DNA. A reação de um radical oxigênio com o DNA pode retirar uma base ou causar uma quebra na fita dupla, o qual possui potencial para produzir um evento prejudicial ou até mesmo letal. Lesões oxidativas no DNA se acumulam com a idade, e parece ser uma contribuição importante para o processo de envelhecimento (Wickens, 2001).

## ***Antioxidantes***

Enquanto a pele não pode controlar a exposição externa às espécies reativas, ela pode reduzir a produção das fontes internas. Isso pode ser obtido pela alteração da atividade de enzimas que produzem indiretamente metabólitos do oxigênio (Kohen, 1999).

O perigo do estresse oxidativo no organismo é tão grande que uma defesa antioxidante e sistemas de reparo estão envolvidos nas células para a proteção contra a destruição por radicais livres. Essas defesas incluem enzimas da superóxido dismutase,

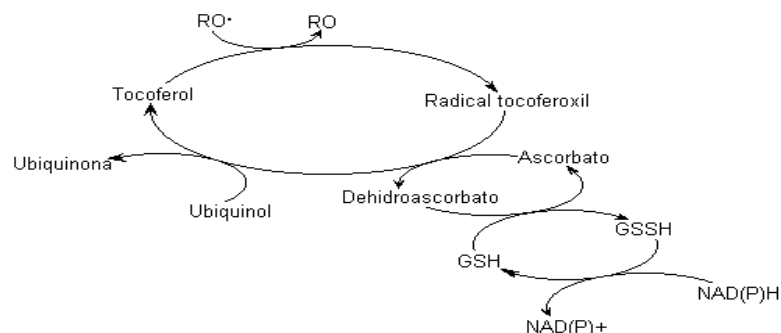
junto com a catalase e a glutationa peroxidase que detoxificam os radicais peróxido, peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos, respectivamente. A célula também é protegida por vários captadores não enzimáticos, incluindo carotenóides, a vitamina C (ácido ascórbico) (1), a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (2), ubiquinol-10 (coenzima Q<sub>10</sub>) (3) e outras substâncias como cisteína (4), ácido úrico (5) e glutationa (6) e também substâncias quelantes de íons metálicos, para prevenir a reação de Fenton (Esquema 2). A eficiência desses sistemas de proteção tendem a decrescer com a idade, indicando que a geração de radicais livres e o declínio das defesas antioxidantes têm de ser consideradas contribuidores potenciais importantes para o processo de envelhecimento (Soussolier e Berthon, 1988; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Wickens, 2001; Yamamoto, 2001).



**Esquema 2:** (A) Reação de Fenton. Produção de ERO na presença de íon metálico (Fe<sup>2+</sup>). (B) Com a produção de OH<sup>·</sup>, uma reação em cadeia ocorre. Ela pode ser interrompida pela exaustão do Fe<sup>2+</sup> quando oxidado a Fe<sup>3+</sup>, mas o superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) reduz o Fe<sup>3+</sup>. (C) A presença simultânea do ferro, superóxido e peróxido de hidrogênio permite a rotação do ciclo de Haber-Weiss, produzindo OH<sup>·</sup>, sendo este ferro dependente (adaptado de Jay et al., 1998).

Esse sistema antioxidante foi desenvolvido com o decorrer do processo evolutivo como uma resposta ao aumento da concentração de oxigênio, e foi projetado para interagir diretamente com as ERO, com a finalidade de prevenir a aproximação e o ataque aos sítios biológicos. O sistema de defesa pode ser classificado em dois grupos: o grupo enzimático e o grupo dos antioxidantes de baixo peso molecular (ABPM). As enzimas antioxidantes contêm um número limitado de proteínas. O grupo dos ABPM contém um grande número de compostos capazes de prevenir o dano oxidativo por interações diretas e indiretas com as ERO. Enquanto que o mecanismo indireto envolve a quelação de metais de transição, prevenindo sua participação em reações mediadas por metais, as moléculas que agem diretamente compartilham uma peculiaridade química semelhante que as permitem doar um elétron ao radical oxigênio. Agindo desse modo, eles podem captar o radical, prevenindo o ataque do alvo biológico. Para que esse mecanismo ocorra, a concentração do captador antioxidante deve ser suficientemente alta para competir com o alvo biológico das espécies prejudiciais (Kohen, 1999).

Durante o estresse oxidativo, o ácido ascórbico é esgotado primeiro, seguido do ubiquinol-10, indicando que esses dois antioxidantes são muito sensíveis ao estresse oxidativo. O antioxidante lipossolúvel melhor conhecido, o  $\alpha$ -tocoferol, permanece inalterado, o que não significa que ele seja um antioxidante ruim. Preferentemente o  $\alpha$ -tocoferol requer o ácido ascórbico e o ubiquinol-10 como co-antioxidantes. O  $\alpha$ -tocoferol capta dois radicais peroxil-lipídicos, por meio da chamada peroxidação mediada por  $\alpha$ -tocoferol (PMT), que resulta na formação de uma molécula de radical  $\alpha$ -tocoferol e de várias moléculas de hidroperóxido lipídico. Quando o ácido ascórbico e o ubiquinol-10 estão presentes, eles rapidamente reduzem o radical  $\alpha$ -tocoferol e cessam a PMT (Figura 7) (Yamamoto, 2001).



**Figura 7:** Rede de trabalho dos ABPM (antioxidantes de baixo peso molecular). Uma ERO é reduzida pelo  $\alpha$ -tocoferol em radical tocoferoxil (tocoferol oxidado) que pode ser novamente reduzido por outro ABPM lipossolúvel, como o ubiquinol. Porém, devido à carga do tocoferoxil ele também poderá ser novamente reduzido pelo ascorbato. O dehidroascorbato pode ser reconvertido pela glutathione (GSH) e finalmente o NADPH é reduzido ao seu estado ativo. Adaptado de (Podda e Grundmann-Kollmann, 2001).

Ainda, durante o metabolismo oxidativo normal, as enzimas da matriz manganês superóxido dismutase (MnSOD) e glutaciona peroxidase extinguem os radicais livres produzidos na mitocôndria. Entretanto, 20% dos radicais peróxido escapam para o citoplasma onde são neutralizados por um número de antioxidantes, incluindo o ascorbato. Essa vitamina pode servir também como uma primeira linha de defesa contra danos oxidativos celulares porque, em comparação com o ubiquinol-10 e com a vitamina E, o ascorbato é o primeiro antioxidante a ser consumido e ele não é sintetizado pelos fibroblastos, os quais, entretanto, têm a habilidade de transportar o ascorbato extracelular por meio de um sistema carreador mediado sódio-dependente (Sharma e Morgan, 2001).

Na pele humana, muitos ABPM estão presentes ( $\alpha$ -tocoferol, ubiquinona, glutaciona, ascorbato e urato) e alguns desses são detectáveis em concentrações relevantes mesmo no estrato córneo. Apesar desses ABPM estarem em altas concentrações, especialmente na epiderme, se o estresse oxidativo subjugar a pele, como por exemplo, os antioxidantes consumidos pela irradiação ultravioleta, pode ocorrer queda dessa concentração com um associado aumento na formação de componentes celulares oxidados. Em adição a medidas físicas ou químicas para a proteção contra a luz ultravioleta, baseando-se na teoria dos radicais livres, o uso de ABPM para a prevenção de envelhecimento cutâneo prematuro parece ser apropriado. Isso pode ser fornecido à pele via dieta rica em frutas e vegetais ou por meio de administração tópica ou oral dos ABPM. A atual eficácia de um antioxidante aplicado topicamente é limitada por sua penetração em concentrações relevantes (Podda e Grundmann-Kollmann, 2001).

## ***Antioxidantes vegetais***

Vários compostos isolados de plantas, de natureza química diversificada promovem ação antioxidante reconhecida, em potencial aqueles que possuem, na sua estrutura, um grupamento fenólico, representados por taninos (Carvalho et al., 2000; Gil et al., 2000; Lin et al., 2001; Demirezer et al., 2001), cumarinas (Carvalho et al., 2000; Fabre et al., 2000; Kontogiorgis e Hadjipavlou-Litina, 2003), antraquinonas (Carvalho et al., 2000; Demirezer et al., 2001; Kim et al., 2003; Spilkova e Dusek, 1996). Na última década, especial atenção tem sido dada ao potencial antioxidante dos flavonóides, em paralelo as suas propriedades antiinflamatórias (Hertog et al., 1993), antivirais e antibacteriana (Hanasaki et al., 1994; Zuanazzi, 2000), reduzindo o risco de

desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Burns et al., 2000; Zuanazzi, 2000), câncer (Havsteen, 2002), do envelhecimento precoce (Yamamoto, 2001) e no tratamento de fragilidade capilar e insuficiência venolinfática (Charpentier et al., 2002).

O termo flavonóide engloba um grupo de compostos fenólicos com estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado (Wilhelm-Filho et al., 1999; Carvalho et al., 2000; Zuanazzi, 2000), que, na natureza, possui distribuição ampla, sendo encontrado em praticamente todas as plantas e frutas, estando presente abundantemente na dieta do homem (Bravo, 1998; van Acker et al., 1998).

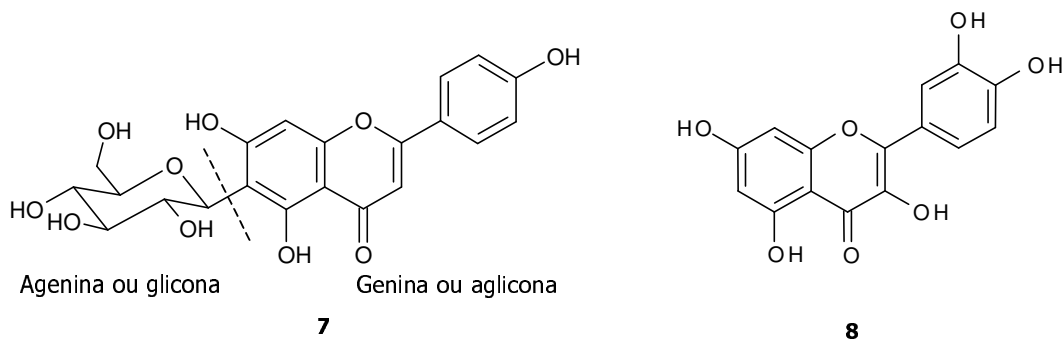
Os flavonóides parecem ter um papel importante nos tratamentos médicos de sucesso desde tempos remotos. O recente interesse nas propriedades dos flavonóides tem muitas explicações convergentes:

1) Sabe-se que os flavonóides são pigmentos altamente diversificados, assim como são facilmente separáveis com equipamentos cromatográficos modernos, tendo os botânicos usado de longa data a ocorrência destes compostos para estudos taxonômicos.

2) Outra razão para o aumento do interesse nos flavonóides é que a indústria farmacêutica, devido à sua tradição, está sempre à procura de novas plantas medicinais, onde os compostos funcionais destas podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de derivados otimizados. Durante tal procedimento de pesquisa, flavonóides com propriedades interessantes foram descobertos.

3) Uma terceira razão para a crescente atividade no campo da bioquímica dos flavonóides é o persistente apelo de muitos praticantes da medicina popular para os efeitos benéficos dos tratamentos com produtos naturais, que provaram serem ricos em flavonóides. Alguns bioquímicos de reconhecidos laboratórios científicos se sentiram compelidos à testar algumas das afirmações convenientemente exageradas feitas por essas pessoas e confirmaram a existência de muitos efeitos interessantes dos flavonóides (Havsteen, 2002).

Os flavonóides de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares (glicosídeos). No glicosídeo, a porção açúcar é denominada de glicona ou agenina, sendo a outra, aglicona ou genina (Zuanazzi, 2000). Exemplo de um glicosídeo é a isovitexina (7), onde a glicona em C-6 é a glucose e a genina é a apigenina. Uma das geninas mais conhecidas é a quercetina (8)

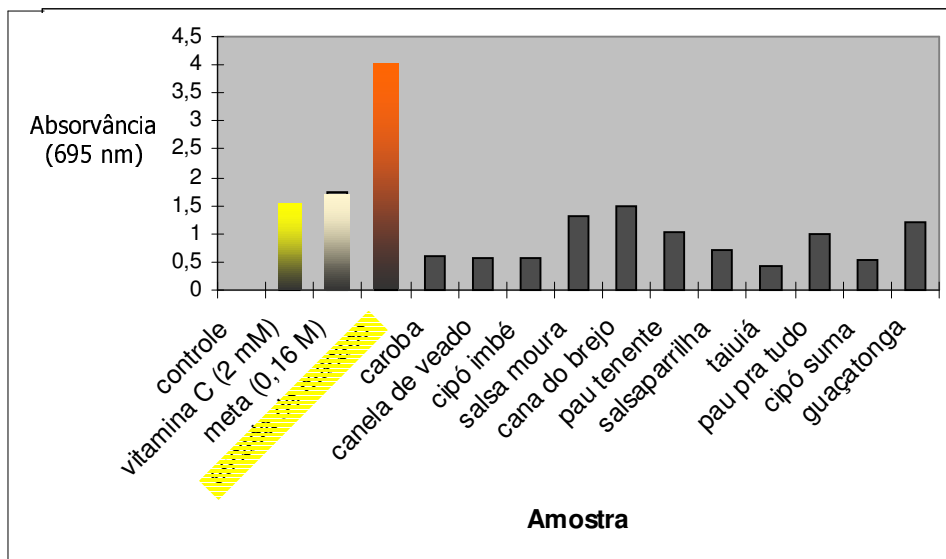


Estudos *in vitro* têm sugerido que o potencial antioxidante dos flavonóides possa estar associado às hidroxilas fenólicas presentes na sua estrutura, possibilitando a doação de elétrons dos grupos OH para os radicais livres (Chen, 1996; Heijnen et al., 2001), estabilizando-os, além da quelação de íons metálicos, particularmente os divalentes, como o  $\text{Cu}^{+2}$  e o  $\text{Zn}^{+2}$  (Havsteen, 1983; Rice-Evans et al., 1996; Magnani et al., 2000; Leake, 2001). Neste contexto, é possível que a atividade antioxidante atribuída aos flavonóides seja a neutralização de radicais livres, inibindo a peroxidação lipídica (Anderson, 1996; Benavente-Garcia et al., 2000).

## ***Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae**

Folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, objeto deste estudo, ainda não foram bem estudadas. A sua escolha baseia-se na elevada capacidade antioxidante do extrato de suas folhas por meio dos ensaios com DPPH e redução complexo fosfomolibdênico, como demonstrado em estudo de Menezes e colaboradores (2004), sobre a atividade antioxidante de quatorze espécies de plantas nativas de uso medicinal da região da Usina Hidrelétrica de Salto Caxias (Figura 8).

É conhecida também pelas suas sinonímias: *Schnella microstachya* Raddi (1919); *Bauhinia tomentosa* Velloso (1829); *Bauhinia scandens* Velloso (1831); *Bauhinia langsdorffiana* Bongard (1838); *Bauhinia bahiensis* Bongard (ano desconhecido); *Bauhinia spicata* Vogel (1839); *Bauhinia vogeliana* Steudel (1840); *Bauhinia langsdorffiana* Bongard var. *bahiensis* (1870); *Bauhinia lagesiana* Harms (1907); *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (1976) (Fortunato, 1986).



**Figura 8:** Atividade antioxidante dos extratos das várias espécies de plantas medicinais encontradas na região da Usina Hidrelétrica de Salto Caxias, comparadas com a vitamina C e metabissulfito de sódio por meio do método da redução do complexo fosfomolibdênio (Menezes et al., 2004).

Posição taxonômica da espécie segundo Cronquist: Divisão – Magnoliophyta; Classe – Magnoliopsida; Subclasse – Rosidae; Ordem – Fabales; Família – Cesalpiniaceae; Gênero – *Bauhinia*; Espécie - *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (Cronquist, 1988).

A *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride é um arbusto escandente ou liana, folha sempre bilobada (Figura 9), inflorescência paniculada (Figura 10). Botão floral globoso e liso, fruto indeiscente, oblongo a elíptico estreito, do tipo legume (Figura 11) (Vaz, 1993).



**Figura 9:** Folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.



**Figura 10:** Inflorescências de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride. (Fonte: Missouri Botanical Garden Museum)



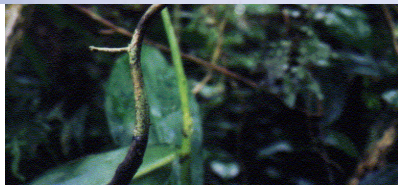
**Figura 11:** Fruto de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride. (Foto: Éverson M. Bianco)

A estrutura anômala do caule deste cipó foi demonstrada por Schenk em 1892, ainda sob o nome de *Bauhinia langsdorffiana* Bongard var. *bahiensis* (Vaz, 1993). Devido o formato de seu caule (Figura 12), a espécie no Brasil é conhecida popularmente por cipó-escada ou escada-de-macaco, sendo muitas vezes confundida com outras cinco espécies trepadeiras também conhecidas por escada-de-macaco, *Bauhinia angulosa* Vogel, *Bauhinia radiata* Vell., *Bauhinia smilliciana* Steudel, *Bauhinia microstachya* var. *massambensis* Vaz e *Bauhinia splendens* H. B. K. (Vaz, 1993).

Um caráter adicional para a identificação da espécie no campo é a presença de vestígios dos ramos laterais já definidos, em forma de projeções lenhosas pontiagudas lembrando espinhos (Figura 12) (Fortunato, 1986). Em março quando floresce, suas flores branco-amareladas destacam-se entre a vegetação, facilitando também a identificação e coleta da espécie. Frutifica a partir de abril. Geralmente é encontrada em



formações florestais ombrófilas e de capoeiras e suas folhas podem apresentar variações dependendo dos níveis de claridade e competição de sua vizinhança. Estende-se desde o nível do mar até 1.000 m de altitude (Vaz, 1993).

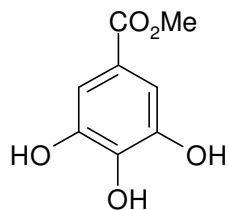


**Figura 12:** Caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride com vestígios de ramos laterais. (Foto: Éverson M. Bianco)

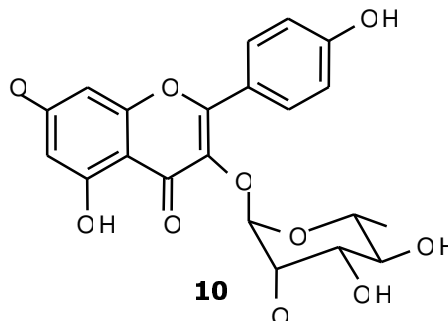
Possui ampla distribuição geográfica, desde a América Central, no Panamá, Guatemala e Belize, até a região norte da Argentina, passando pela Colômbia, Venezuela, Perú, Paraguai e Bolívia. No Brasil, há registros de coletas na Amazônia, Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Fortunato, 1986). No Paraná, segundo levantamento nos herbários do Museu Botânico da Prefeitura Municipal de Curitiba e Universidade Federal do Paraná, há registros de coleta nas regiões de Morretes, Antonina, Guaraqueçaba, Guaratuba, Paranaguá, Estrada da Graciosa, Laranjeiras do Sul, Cascavel, Medianeira, São Miguel do Iguaçu e Foz do Iguaçu (Bianco, 2003).

Estudos fitoquímicos preliminares revelaram que plantas do gênero *Bauhinia* são constituídas particularmente por glicosídeos esteroidais, triterpenos, lactonas e flavonóides. Na *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, foi demonstrado que as folhas apresentam compostos fenólicos como: galato de metila (**9**), canferol-3-*O*-ramnosil (**10**), quercetina-3-*O*-ramnosil (**11**) e mirecitina-3-*O*-ramnosil (**12**). Estes dois últimos apresentaram atividade antinociceptiva (Meyre-Silva et al., 2001). Bianco e Santos demonstraram a presença de vitexina (**13**), galato de metila (**9**) e hexatriacontano (**14**) nas folhas dessa espécie (Bianco e Santos, 2003). Desta forma, surgiu o interesse em se

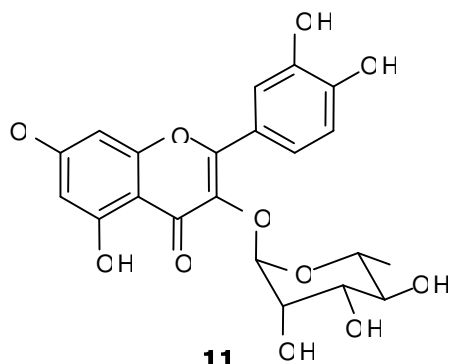
testar os extratos dessa espécie em formas farmacêuticas de uso tópico, para a prevenção do envelhecimento precoce da pele por meio da inibição da formação de radicais livres e as reações em cadeia geradas subsequentemente, impedindo o estresse oxidativo.



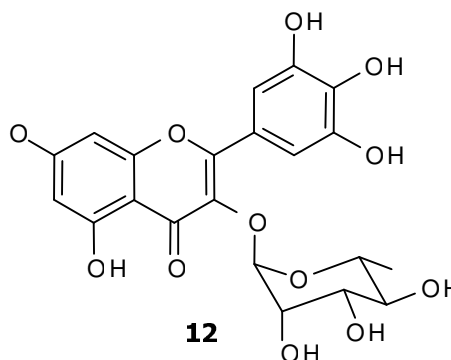
**9**



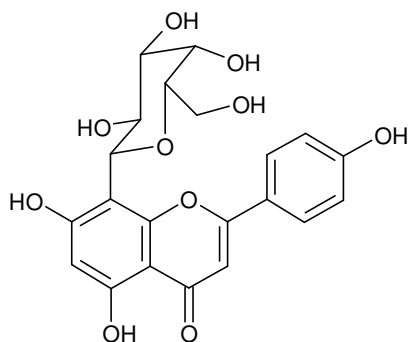
**10**



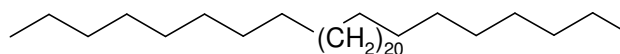
**11**



**12**



**13**



**14**

## ***Hidrogéis***

Hidrogéis ou géis aquosos são complexos reticulares poliméricos tridimensionais, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. São compostos de homopolímeros ou copolímeros, insolúveis devido à presença de ligações químicas cruzadas (entrelaçamentos, junções), por meio de reações entre um ou mais monômeros,

por pontes de hidrogênio e por interações de van der Waals; ou ligações físicas cruzadas (emaranhados ou rede cristalina). Estas últimas são responsáveis pela estrutura do complexo reticular e pela integridade física do mesmo. Os hidrogéis exibem uma compatibilidade termodinâmica com a água permitindo o seu intumescimento, podendo ser formados de uma ampla gama de polímeros gelificantes tanto de origem biológica quanto sintética e são formados quando os polímeros são introduzidos em um ambiente gelificante com cisalhamento. Isso cria partículas gelificadas, as quais, dependendo do grau de cisalhamento formam géis com proporções micrométricas (Peppas et al., 2000).

As características dos hidrogéis dependem, além da escolha do polímero, da concentração e da força iônica do mesmo (Norton et al., 1999). Há numerosas aplicações para os hidrogéis, em particular nos setores médicos e farmacêuticos, por exemplo, em lentes de contato, membranas para biosensores, revestimentos para corações artificiais, material para peles artificiais e dispositivo para liberação de medicamentos (Peppas et al., 2000). Estes veículos têm sido muito investigados como carreadores de fármacos, devido às seguintes características: a) grande compatibilidade com os tecidos vivos pela mínima irritação mecânica resultante do seu alto conteúdo aquoso; e b) propriedades de transporte de massa dos hidrogéis manipulados por níveis ou cinética de intumescimento (Bentley, 1994).

Os polímeros usados para preparar hidrogéis incluem as gomas naturais adraganta, pectina, carragena, agar, ácido algínico e materiais sintéticos e semi-sintéticos como a metilcelulose, a hidroxietilcelulose, a carboximetilcelulose, os carbopóis, que são polímeros sintéticos de vinil com grupos carboxílicos ionizáveis (Idson e Lazarus, 2001) e aqueles derivados de monômeros sintéticos, sendo os mais utilizados hidroxietilmetacrilato, hidroxietoxietilmetacrilato, hidroxidietoxietilmetacrilato, metoxietilmetacrilato, metoxietoxietilmetacrilato, metoxidietilmetacrilato, etilenoglicol dimetilacrilato, *n*-vinil-2-pirrolidona, *n*-isopropil acrilamida, vinilacetato, ácido acrílico, ácido metacrílico, *n*-(2-hidroxipropil) metacrilamida, etilenoglicol, polietilenoglicolacrilato, polietilenoglicolmetacrilato, polietilenoglicoldiacrilato e polietilenoglicoldimetilacrilato (Peppas et al., 2000).

## **Classificação**

Os hidrogéis podem ser classificados:

- De acordo com a natureza dos grupos ligados: Neutros, iônicos (catiônicos e aniônicos) ou anfóteros;
- Com base em suas características mecânicas e estruturais: Moldados ou aparentes;
- Dependendo da natureza do polímero usado: Homopolímeros (utiliza apenas um tipo de monômero), copolímeros (utiliza dois tipos de monômeros sendo no mínimo um hidrofílico), multipolimérico (utiliza mais de três tipos de monômeros) ou polímeros interpenetrantes (intumescimento de uma rede polimérica<sub>1</sub> em um monômero<sub>2</sub>, ocorrendo formação de uma rede entrelaçada de polímero<sub>1</sub> e polímero<sub>2</sub>);
- Conforme sua estrutura física: Amorfos (cadeias randomicamente arranjadas), semicristalinos (regiões densas de macromoléculas ordenadas) ou arranjos por pontes de hidrogênio (Peppas et al., 2000; Akkus, 2002).

## **Estrutura reticular do hidrogel**

A adequação de um hidrogel como dispositivo para a liberação de medicamentos e sua performance em uma aplicação particular depende sobremaneira de sua estrutura volumosa. Os parâmetros mais importantes usados para caracterizar a estrutura reticular dos hidrogéis são a fração de volume do polímero no estado de intumescência, o peso molecular da cadeia do polímero entre dois pontos de ligação e o tamanho da rede correspondente.

A fração de volume do polímero no estado de intumescência é a medida da quantidade de fluido embebido e retido pelo hidrogel. O peso molecular da cadeia do polímero entre dois pontos de ligação, a qual pode ser tanto de natureza química quanto física, é a medida do grau de ligações cruzadas do polímero e a distância entre ligações adjacentes fornece o espaço disponível entre as cadeias para a difusão do medicamento (Peppas et al., 2000).

## ***Serum***

*Serum* é uma forma farmacêutica derivada dos hidrogéis, possuindo em sua composição 15% do gel-base (Galena, 2003a; Galena, 2003b). É muito utilizado devido às

suas características sensoriais, estabilidade e facilidade de utilização. Sua baixa viscosidade e alta fluidez resulta em alta espalhabilidade, facilitando a evaporação da água, proporcionando, conseqüentemente, uma secagem rápida. Ocorre a formação de uma película fina devido à presença dos polímeros geificantes, os quais retêm os ativos, liberando-os gradualmente. Devido à esse alto grau de espalhabilidade, é uma formulação econômica, pois é capaz de cobrir grandes extensões de pele com pouca quantidade de produto. São exemplos de formulações de *serum* comercializados atualmente: "Renew *Serum* de vitamina C" Avon<sup>®</sup>, "Densité *Serum*" Biotherm<sup>®</sup>, "Firm Profile *Sérum*" Givenchy<sup>®</sup>, Dermotensor Intimidade<sup>®</sup>, "*Sérum* Anti-fadigue Absolu" Orlane Paris<sup>®</sup>, "*Sérum* Fermeté Intense" Orlane<sup>®</sup>, *Serum* para cabelos quimicamente tratados Citré Shine<sup>®</sup>, "*Sérum* Bust Fermeté" Lancôme<sup>®</sup>, "*Sérum* Ultra Minceur" Lancôme<sup>®</sup>, "Capture X R 60/80 Extra *Sérum* Réparateur" Christian Dior<sup>®</sup>, "Force C Premium 5%" Helena Rubstein<sup>®</sup>, "Collagenist *Serum*" Helena Rubstein<sup>®</sup>, "Expressionist *Serum* Visible Skin Refining" Helena Rubstein<sup>®</sup>, "Correct Vitamin Enriched *Serum*" Zirh<sup>®</sup>, "*Sérum* Corps Peau Neuve" Clarins<sup>®</sup>, "Vinolift *Serum*" Caudalie<sup>®</sup>, "Nivea Visage Perfect Contour" Nivea<sup>®</sup>, "*Sérum* Anti-Âge" Anna Pegova<sup>®</sup>, "Cellular Lipo-Sculpting Body *Serum*" La Prairie<sup>®</sup>.

Apesar da grande quantidade de produtos sob esta forma farmacêutica, há pouca informação sobre o mesmo na literatura especializada devido ao sigilo industrial das empresas que os desenvolvem, surgindo, desta maneira, o interesse de se pesquisar o *serum* neste trabalho.

## ***Métodos para avaliar a absorção cutânea***

A absorção cutânea tem sido avaliada por dois métodos principais:

- *in vitro* em células de difusão;
- *in vivo*, que geralmente usam compostos radiolábeis.

As técnicas *in vitro* envolvem o estudo com pele humana, animal ou membranas artificiais em um compartimento de difusão contendo salina fisiológica ou tampão fosfato pH 7,4. O composto sob investigação é colocado sobre a pele em estudo e avaliado em intervalos regulares na solução receptora. A pele deverá estar intacta com epiderme e derme ou separada a epiderme da derme. As vantagens da técnica *in vitro* são a facilidade de execução e os resultados obtidos com rapidez. A maior desvantagem é a

limitação das condições presentes no sistema *in vitro* para aquelas encontradas em humanos (Wester e Maibach, 1994).

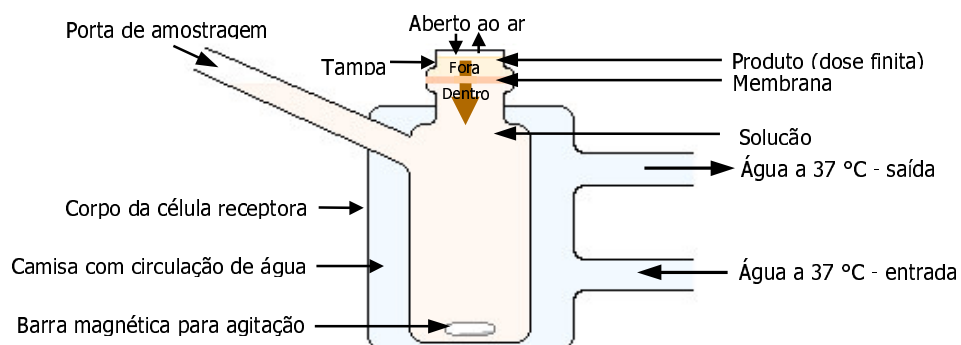
O estudo de permeação cutânea *in vivo* geralmente é determinada por método indireto de avaliação da radioatividade na excreta, seguido da aplicação tópica de um composto radiolábil. Em estudos humanos, os níveis plasmáticos de um composto aplicado topicamente são, em geral, extremamente baixos, sendo por esta razão, utilizada metodologia capaz de detectar traços da substância permeada (Wester e Maibach, 1994).

## *Aparelhos utilizados nos testes in vitro*

Há uma grande variedade de aparelhos, nos mais diferentes modelos, que têm sido usados em estudos de cinética de liberação e/ou permeação dos fármacos contidos em produtos de ação transdérmica e dermatológicos, conforme revisado por Gomara (2003). Esses aparelhos podem ser chamados de células de liberação ou difusão, cujos modelos e funcionamento são os mais variados, sendo o funcionamento, de uma forma geral, realizado por: a) Fluxo contínuo, onde a solução receptora é bombeada continuamente e b) Fluxo estático, onde a solução receptora apresenta o mesmo volume durante todo o experimento.

De acordo com Gummer e colaboradores (1987), citado em Gomara (2003), há diferenças no desempenho das várias células de difusão utilizadas nos estudo *in vitro* de liberação e permeação cutânea. Os autores fizeram um estudo comparativo com diversas células de difusão quanto à uniformidade de agitação no compartimento receptor, bem como o volume da fase receptora.

Uma célula de difusão amplamente utilizada para estudos *in vitro* de liberação e permeação cutânea de fármacos é a célula de Franz modificada (Figura 13) que contribuiu para solucionar os problemas de homogeneização da fase receptora que haviam na célula de Franz original (TOJO, 1987 citado em Gomara, 2003).



**Figura 13:** Desenho esquemático de uma célula de Franz modificada.

### ***Membranas utilizadas nos estudos de liberação e permeação cutânea in vitro de ativos contidos em produtos dermatológicos***

Os estudos de permeação *in vitro* se aproximam mais das condições *in vivo* quando se utilizam sistemas com membranas.

A membrana de acetato de celulose (Dias et al., 1999) tem sido utilizada como uma membrana de características hidrófilas em células de difusão *in vitro*. Também se utilizam membranas de nitrato de celulose, com características mais lipofílicas, de celulose regenerada (hidrofílica), de dimetil-polissiloxano (lipofílica), de silicone (lipofílica) (Dias et al., 1999) e de poli-(2-hidroxietilmetacrilato) (anfótera). Elas podem ser usadas isoladamente ou formando sistemas (Gomara, 2003).

Dentre as membranas de origem natural, a pele humana é insubstituível nos estudos de penetração e permeação cutânea. Mas, devido à dificuldade na obtenção e variabilidade na permeabilidade destas membranas devido à diferenças individuais, raça e sexo, as peles de animais como ratos (Shah et al., 1994; Shah, 1996; Ogiso et al., 1997; Porzio et al., 1998; Babu et al., 2003), camundongos com e sem pêlo (Ogiso et al., 1997), coelhos, cobaias (Wang et al., 2004), porcos, cães sem pêlo e macacos têm sido empregadas como membranas naturais (Gomara, 2003). Para os estudos de permeação cutânea, a pele que será utilizada como membrana é armazenada sob condições de congelamento e relatos contraditórios existem na literatura sobre os efeitos das condições de armazenamento na permeação cutânea *in vitro* de fármacos. Enquanto muitos relatos sugerem que o congelamento da pele altera significativamente a permeação de fármacos, alguns pesquisadores têm demonstrado que a permeabilidade de pele de cadáver humano não é afetada após longo período de congelamento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 466 dias (Babu et al., 2003).

# Objetivos

---

## **Objetivo geral**

- Avaliação da capacidade antioxidante dos extratos atomizado e liofilizado das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em *serum*.

## **Objetivos específicos**

- Verificar a capacidade antioxidante dos extratos atomizado e liofilizado das folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride.
- Definir uma formulação de *serum* que mantenha a capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride após sua incorporação.
- Verificar a capacidade de liberação do marcador pelas formulações escolhidas por meio de testes de permeação cutânea.



# *Material e métodos*

---

## **Material**

Todos os sais e solventes utilizados são pró-análise e a água foi ultrapurificada em sistema Puritech/Permuton<sup>®</sup> (salvo indicação contrária). Os solventes para CLAE (grau CLAE) e fases móveis (feitas no momento do uso) foram pré-filtrados em conjunto para filtração de solventes Sartorius<sup>®</sup> com filtros RC (18406 --47-----N) Sartorius AG<sup>®</sup> e sonicados por 30 min em aparelho de ultra-som Elma<sup>®</sup> (35 kHz), acoplado a vácuo. Os resultados espectrofotométricos foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu<sup>®</sup> UV 1601 nos comprimentos de onda descritos para cada análise. Os resultados cromatográficos foram obtidos por equipamento para CLAE Varian Pro Star<sup>®</sup>, acoplado a detector UV-Vis e com coluna cromatográfica Varian<sup>®</sup>, R0 086200 C5, microsorb-MV 100-5 C-18, 250x4,6 mm (salvo indicação contrária), *loop* de injeção de 20 µl e leitura nos comprimentos de onda 250 nm (para as análises com vitamina C – Sigma<sup>®</sup>) e 340 nm (para as análises com os extratos e padrão de isovitexina – Extrasynthese<sup>®</sup>).

## **Métodos**

### ***Obtenção do extrato hidroetanólico bruto das folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride***

Foram coletadas as partes aéreas superiores (caules e folhas) de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride em setembro de 2002, em Morretes/PR. A identificação foi realizada pelo botânico Gerdt Hatschbach do Museu Botânico Municipal de Curitiba e exsicata depositada sob nº 277280.

As folhas foram separadas dos caules e colocadas para secar em temperatura ambiente por uma semana, durante a qual eram revolvidas periodicamente para secagem uniforme, sendo posteriormente levadas à estabilização em estufa (sem circulação de ar) a 50 °C por um período de 4 h. Após esse período, foram levadas à moagem e o pó (1,17 kg) foi armazenado em frascos de vidro hermeticamente fechados, mantidos à

temperatura ambiente e protegidos da exposição solar direta. As folhas moídas passaram por processo de desengorduramento, por meio de extração com *n*-hexano em aparelhos de Soxhlet. A produção do extrato hidroetanólico bruto foi realizado por maceração das folhas em etanol 77 °GL {etanol P.A. 96,3 °GL em água destilada (799,6 ml)}. O extrato foi concentrado sob pressão reduzida em rotavapor.

Ao extrato hidroetanólico bruto, foi adicionado água destilada na proporção de 1:8 e agitado com agitador mecânico, em banho de gelo, por um período de 8 h. Após esse período, foi mantido a  $\pm 4$  °C por 12 h para decantar a fração lipofílica e a fração hidrofílica (8 l) foi obtida por filtração simples.

Uma parte da fração hidrofílica foi liofilizada, dando origem ao *Extrato L* e outra parte foi atomizada em *spray-dryer*, dando origem ao *Extrato SD*.

### ***Obtenção do extrato liofilizado (EL) de folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride***

Alíquotas da fração hidrofílica (100 ml) obtido no item anterior, foram previamente congeladas e levadas à liofilização em liofilizador Labconco® (modelo Freeze-drying 4.5), em pressão de 640 mmHg, durante 48 h. Logo após, os extratos liofilizados foram pesados e armazenados em frasco âmbar sob refrigeração.

### ***Obtenção do extrato atomizado (ESD) de folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride***

Alíquotas da fração hidrofílica (1000 ml) obtida anteriormente foram acrescidas de 0,5% de Aerosil® e levadas à atomização em *spray-dryer* Yamato®.

Após a estabilização do equipamento, foi colocada a fração hidrofílica adicionada de Aerosil®. Por este ser insolúvel em água, formando suspensão, fez-se uso de um agitador magnético para manter a homogeneidade da suspensão formada. As condições utilizadas para a atomização foram as seguintes: temperatura de injeção 210 °C, temperatura de saída 60 °C, pressão de atomização do ar 1,30 kgf/cm<sup>2</sup>, vazão do ar 0,32 m<sup>3</sup>/min, sendo estes mantidos constantes durante todo o processo.

O extrato atomizado obtido foi retirado do frasco receptor, pesado e armazenado em frasco plástico azul opaco hermeticamente fechado e mantido em temperatura ambiente.

## ***Desenvolvimento da forma farmacêutica***

A fórmula do *serum* é constituída por: 15% de gel base e o restante de água destilada, ao qual foi adicionado os extratos na concentração equivalente a 10% do extrato hidroetanólico bruto 1:1 (1,284 g de ESD e 0,726 g de EL, respectivamente, para cada 100 g de *serum*).

Foram testadas várias formulações de géis base, contendo os seguintes agentes geilificantes:

1. Natrosol 250 HHR<sup>®</sup> a 1%,
2. Carbopol 940<sup>®</sup> a 1,5%,
3. Carbopol ETD 2020<sup>®</sup> a 1,5%,
4. Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> a 1,5%,
5. Carbopol 2001<sup>®</sup> a 1,5%,
6. Carbopol 934<sup>®</sup> a 1,5%,
7. Pemulen TR2<sup>®</sup> a 1,4%,
8. Silicones DC 245<sup>®</sup> (30%) e DC 9040<sup>®</sup> (70%).

Foram desenvolvidas duas formulações de cada gel base, uma contendo um agente quelante, o EDTA dissódico, e outra sem o agente quelante.

As fórmulas de cada gel foram preparadas da seguinte forma:

Formulação base de todos os géis com EDTA dissódico (excluindo o de silicones): agente geificante, EDTA dissódico 0,2%, Phenova<sup>®</sup> 0,5%, propilenoglicol 5%, água destilada q.s.p. 100 ml e pH final ajustado entre 6,0 a 7,0. Os géis base sem EDTA - Na<sub>2</sub> apresentam a mesma composição dos géis com EDTA - Na<sub>2</sub>, excluindo-se apenas este componente.

Os métodos de preparo dos géis base são os seguintes:

- Formulações com EDTA dissódico:

Adicionou-se EDTA dissódico em água destilada (80 ml) sendo a solução levada a aquecimento em banho-maria a 60 °C. Em seguida foi adicionado o agente geificante, sendo misturado até completa geilificação. Após o resfriamento, foram adicionados o Phenova<sup>®</sup> e o propilenoglicol com homogeneização por agitador mecânico e foi adicionada água destilada até completar o volume, homogeneizando-se novamente. O pH foi medido e, quando necessário, foi feita a correção do mesmo para 6,0 a 7,0, utilizando solução de NaOH 50% (p/v).

- Formulações sem o EDTA dissódico:

Água destilada (80 ml) foi levada ao aquecimento em banho-maria a 60 °C sendo adicionado o agente gelificante e misturado até completa gelificação. Após o resfriamento, foram adicionados o Phenova® e o propilenoglicol com homogeneização por agitador mecânico e foi adicionada água destilada até completar o volume, homogeneizando-se novamente. O pH foi medido e, quando necessário, foi feita a correção do mesmo para 6,0 a 7,0, utilizando solução de NaOH 50% (p/v).

- Formulação com os silicones:

Misturaram-se os silicones nas devidas proporções para 100 ml até completa homogeneização.

Foram obtidas, portanto, quatorze formulações com os agentes gelificantes citados, contendo ou não o agente quelante, e mais uma formulação de silicones.

### ***Avaliação do perfil cromatográfico das formulações de gel-base***

Essa análise foi realizada com o intuito de verificar se algum componente das formulações de gel-base poderia gerar picos interferentes, os quais poderiam futuramente surgir nos mesmos tempos de retenção dos picos oriundos dos extratos.

As condições cromatográficas utilizadas foram:

- Fase móvel: isopropanol:tetrahidrofurano:água (5:15:85);
- Fluxo: 0,5 ml/min;
- Comprimento de onda: 340 nm;
- Tempo de análise: 50 min;

As amostras foram preparadas por meio da diluição das mesmas na proporção de 1:1000 na fase móvel. Elas foram previamente sonicadas por 15 min e filtradas por filtro 0,22 µm da Millipore® antes de cada injeção. Os cromatogramas foram obtidos pelo software do próprio equipamento (Star Chromatography Workstation 6.0®).

### ***Análise quantitativa do teor de flavonóides dos extratos*** (Suisse, 1995)

Em um balão de fundo redondo foi colocado o extrato em análise (600 mg), juntamente com solução de hexametilenotetramina a 0,5% (p/v) (1 ml) , acetona (20 ml) e solução de ácido clorídrico a 25% (v/v) (2 ml) e levado a ebulição sob refluxo por 30 min. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada sob algodão hidrófilo para um balão

volumétrico de 100 ml. Ao balão contendo o resíduo, foi adicionado acetona (20 ml) e novamente levado a refluxo por 10 min. A seguir a mistura foi resfriada e filtrada para o balão volumétrico. Essa etapa foi repetida novamente e o volume do balão volumétrico foi completado para 100 ml com acetona. Foram transferidos 20 ml desta solução para um funil de separação, ao qual foi adicionado água (20 ml) e extraídos com acetato de etila (4 x 10 ml). Os extratos orgânicos obtidos foram reunidos em outro funil de separação e as impurezas extraídas com água (2 x 50 ml). O extrato orgânico foi colocado em um balão volumétrico de 50 ml e completado com acetato de etila.

Solução a ser doseada: uma alíquota da solução obtida (10 ml), foi transferida para um balão volumétrico de 25 ml ao qual foi adicionado solução reativa de cloreto de alumínio (20 g/100 ml em solução de ácido acético 5% em metanol v/v) (1 ml). O volume foi então completado para 25 ml com solução de ácido acético glacial 5% em metanol v/v.

Solução de compensação: em um balão volumétrico de 25 ml, foi colocado uma alíquota da solução primeiramente obtida (10 ml) e o volume final foi completado com solução de ácido acético glacial 5% em metanol.

Após um período de 30 min, foi realizada a leitura da absorvância à 422 nm em aparelho espectrofotômetro (Shimadzu® UV 1601). A determinação do conteúdo total de flavonóides de cada amostra analisada foi determinada pela fórmula:

$$\text{Teor \% flavonóides} = (A \times 1,25)/M$$

Onde: A = absorvância à 422 nm

M = massa da amostra em gramas

Os resultados do conteúdo de flavonóides foram expressos em hiperosídeo ( $C_{21}H_{20}O_{12}$ , PM 464,4).

Os ensaios foram realizadas em triplicata.

### ***Determinação da capacidade antioxidante pelo método com DPPH (1,1-difenil-2-picrato-hidrazila)*** (Mensoretal,2001)

Soluções estoque dos extratos (1 mg/ml) foram diluídas a concentrações de 250, 125, 50, 25, 10 e 5 µg/ml, em solvente etanol, constituindo as soluções amostra. Solução

etanólica de DPPH 0,3 mM (1 ml) foi adicionada à amostra (2,5 ml) nas diferentes concentrações, e deixou-se reagir em temperatura ambiente. Etanol (1,0 ml) e a solução amostra (2,5 ml) foram usados como branco. Solução de DPPH 0,3 mM (1,0 ml) (DPPH 0,3 mM em etanol) e etanol (2,5 ml) foram usados como controle negativo, e os controles positivos foram as soluções padrão (vitamina C). Após 30 min os valores de absorvância foram medidos a 518 nm e convertidos em porcentagem de atividade antioxidante ou porcentagem de DPPH consumido (AA%), utilizando-se para isso a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

Onde: Abs= absorvância

### ***Determinação da capacidade antioxidante pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico (Priettoetal.,1999)***

Uma alíquota (0,3 ml) da solução amostra (extratos a 200 µg/ml) foi misturada em um tubo de ensaio com a solução reagente (3 ml) {ácido sulfúrico (0,6 M), fosfato de sódio (28 mM) e molibdato de amônio (4 mM) em água destilada}. Os tubos foram incubados em banho-maria 95 °C, por 90 min. Após resfriamento, a absorvância foi lida a 695 nm contra o branco (3 ml de solução reagente e 0,3 ml de água destilada). A capacidade antioxidante dos extratos foi expressa em relação ao ácido ascórbico (0,3 ml de solução 2 mM), usado como padrão, cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1 (100%).

### ***Verificação da capacidade antioxidante pela prevenção do estresse oxidativo induzido em eritrócitos humanos***

Foi realizado ensaio de inibição de formação de metahemoglobina induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina (FH) em eritrócitos humanos, segundo Evelyn e Malloy (1938) modificado por Beutler e colaboradores (1995). Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada tubo-teste e sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Almeriane M. Weffort Santos.

Amostras de sangue periférico foram coletadas por punção venosa após consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres

Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, registro CEP/SD 2.039.SI.003/04-01 (Anexo A).

A obtenção e isolamento de eritrócitos humanos foi realizado segundo Ciccoli e colaboradores (1994) e Ferrali e colaboradores (1997):

Sangue venoso humano (20 ml), adicionado do anticoagulante EDTA-K<sub>3</sub>, coletado de voluntários adultos considerados saudáveis por não apresentarem nenhum sinal ou sintoma de enfermidade, com idade variando entre vinte e cinquenta anos, foi centrifugado (25 min, 800 *g*) a temperatura ambiente, para retirada do plasma e da camada leucocitária, sendo, em seguida, lavado (5 min, 800 *g*) duas vezes com PBS {pH 7,4, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (123mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (27 mM) e NaCl (123 mM) em água}. Os eritrócitos foram, então, ressuspensos em PBS e o volume globular ajustado para 35%, usando-se o método do microhematócrito (Dacie e Lewis, 1995).

O tratamento das amostras foi realizado de acordo com Ferrali e colaboradores (1997) e Claro (2002):

Alíquotas da suspensão de eritrócitos (1 ml) foram tratadas com solução de vitamina C {concentração final 20mM em PBS glicosado (pH 7,6, PBS acrescido de glucose (200 ml/dl)} ou com extratos vegetais (concentrações finais de 0,01 a 5 mg/ml em PBS glicosado), por 1 h sob homogeneização contínua ou com solução de cloridrato de fenil-hidrazina (concentração final 1 mM em PBS glicosado), por 20 min, a temperatura ambiente, sob homogeneização contínua, após serem aeradas com auxílio de pipeta Pasteur. Em alguns experimentos, primeiramente, trataram-se os eritrócitos com vitamina C ou com diferentes concentrações dos extratos por 30 min a temperatura ambiente e, em seguida, com solução de FH por 20 min, ambos sob homogeneização contínua.

A obtenção dos fatores FA, FB e FD foi realizada segundo Beutler e colaboradores (1995):

Alíquotas de sangue total (50 µl) recém coletados foram diluídas em tampão fosfato M/60 (5 ml) {diluição 1:4 (v/v) do tampão M/15 - pH 6,6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (67 mM) em água} e adicionadas de solução de ferricianeto de potássio 20% p/v (25 µl). Após homogeneização por 5 min a temperatura ambiente, as absorvâncias da metaHb formada foram obtidas em 630 nm (FA), contra água. Em seguida, adicionou-se cianeto neutralizado p/v (25 µl) {NaCN (1 g) em água (10 ml) diluído 1:1 em ácido acético 12% (v/v)} e, após 5 min de repouso, procedeu-se nova leitura em 630 nm (FB), usando-se água como branco.

Alíquotas das soluções anteriores (1 ml) foram transferidas para outra série de tubos contendo tampão fosfato M/15 (4 ml) {pH 6,6, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (67 mM) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (67 mM)

em água} e soluções de ferricianeto de potássio 20% (25 µl) e de cianeto de sódio 10% p/v (25µl) foram adicionadas. Após homogeneização, realizou-se leitura da cianometahemoglobina a 540 nm (FD), utilizando-se, como branco, uma solução de tampão fosfato M/15 (10 ml), solução ferricianeto de potássio 20% (50 µl) e cianeto de sódio 10% (50 µl). Os resultados foram obtidos segundo a fórmula abaixo e cada fator obtido corresponde à média aritmética de quatro determinações independentes.

$$FB = \frac{D \times 100}{A - B}$$

Onde:

A: absorvância obtida em 630 nm, leitura da metaHb.

B: absorvância obtida em 630 nm, desaparecimento da metaHb.

D: absorvância obtida em 540 nm, leitura da cianometahemoglobina.

Para a determinação da formação de metahemoglobina (metaHb), em tubo de ensaio, adicionou-se tampão fosfato M/60 (5 ml) e suspensão de eritrócitos (50 µl) previamente tratados ou não com FH, vitamina C ou com diferentes concentrações dos extratos EL e ESD. As amostras foram homogeneizadas por 5 min a temperatura ambiente e as absorvâncias para metahemoglobina foram obtidas em 630 nm, utilizando-se água como branco (A). Em seguida, adicionou-se cianeto neutralizado (25 µl) em cada amostra, homogeneizou-se e, após 5 min de repouso, procedeu-se nova leitura em 630 nm, utilizando-se água como branco (B).

Alíquotas das soluções anteriores (1 ml) foram transferidas para outra série de tubos contendo tampão fosfato M/15 (4 ml), onde adicionou-se solução de ferricianeto de potássio 20% (25 µl) e de cianeto de sódio 10% (25 µl). Após homogeneização e repouso a temperatura ambiente por 5 min, realizou-se leitura em 540 nm (D), utilizando-se, como branco, uma mistura de tampão fosfato M/15 (10 ml), solução ferricianeto de potássio 20% (50 µl) e cianeto de sódio 10% (50 µl).

A concentração de metahemoglobina foi determinada de acordo com a fórmula abaixo:

$$MetaHb\% = \frac{A - B}{D} \times FB$$

Onde:



A: absorvância obtida em 630 nm, leitura da metaHb.

B: absorvância obtida em 630 nm, desaparecimento da metaHb.

D: absorvância obtida em 540 nm, leitura da cianometahemoglobina.

FB: fator variável de acordo com o espectrofotômetro utilizado.

### ***Caracterização físico-química das formulações de serum selecionadas adicionados ou não de EL e de ESD***

Avaliação do pH final foi feita por meio de leitura direta do mesmo nas amostras de *serum* (50 g) em pHmetro Gehaka PG2000® em temperatura entre 20 – 25 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação da densidade relativa: com a utilização de picnômetro de alumínio polido Universal® (25 g), pesaram-se as formulações de *serum*, as quais foram comparadas ao peso da água destilada, aferida no mesmo picnômetro, mantendo-se as mesmas condições de temperatura para todas as amostras (24 °C). Para o cálculo da densidade relativa, fez-se uso da seguinte fórmula:

$$d_r = \text{peso do picnômetro com serum} / \text{peso do picnômetro com água}$$

Onde  $d_r$  = densidade relativa.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação da viscosidade: Foi realizada com uso de viscosímetro rotacional Brookfield RVDV II+®. Condições da análise: spindle SC4-21 (para os *serum* adicionados dos extratos), spindle 70 acoplado a acessório AS-1Y (para os *serum* sem adição dos extratos), temperatura entre 20-25 °C, rotação 90 rpm, sendo os dados analisados pelo programa Wingather V1.1® Brookfield Engineering Laboratories. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Avaliação da espalhabilidade: Condições do ensaio: tempo de leitura 1 min, peso da placa 370 g. As amostras foram colocadas no orifício central da placa molde, a qual se encontrava sobre a placa de leitura, preenchendo completamente o espaço do orifício. A seguir, a placa molde foi retirada, deixando a amostra sobre a placa de leitura. Foi

colocada a placa-peso sobre a amostra e contado o tempo de análise. Após esse intervalo, os raios foram medidos em cm e a espalhabilidade calculada de acordo com a fórmula:

$$E_i = \pi \times r^2$$

Onde:  $E_i$  = espalhabilidade da formulação (área) em  $\text{cm}^2$ ,

$\pi$  = constante (3,14),

$r^2$  = raio em cm.

Os ensaios foram realizados em triplicata.

### ***Doseamento da isovitexina presente nos extratos, serum e solução tampão por meio de CLAE***

Condições do ensaio:

- Fase móvel: isopropanol:tetrahydrofurano:água (5:15:85);
- Fluxo: 0,4 ml/min;
- Comprimento de onda: 340 nm;
- Tempo de análise: 50 min;

As análises foram realizadas em triplicatas.

As amostras foram previamente filtradas por filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  da Millipore® e sonicadas por 15 min. No caso das amostras retiradas da permeação, elas foram previamente sonicadas por 15 min e centrifugadas por 20 min (10.000 rpm).

Foi feita a curva padrão da isovitexina, sendo construída com cinco pontos (25, 50, 100, 150 e 200  $\mu\text{g/ml}$ ). A isovitexina foi pesada e diluída na fase móvel acima descrita, dando origem à uma solução concentrada (200  $\mu\text{g/ml}$ ) a qual originou as soluções finais (25, 50, 100 e 150  $\mu\text{g/ml}$ ) por meio de diluição e as leituras foram feitas em triplicata. A curva foi construída graficamente relacionando os valores das áreas dos picos obtidos em função da concentração das soluções. O valor do coeficiente de correlação ( $r^2$ ) e a equação da reta foram obtidos pelo programa Star Chromatography Workstation 6.0®.

Para os ensaios de confirmação dos picos de isovitexina e vitexina, realizados no Laboratório de Produção e Análise de Medicamentos (UNIVALI), foram utilizadas as seguintes condições:

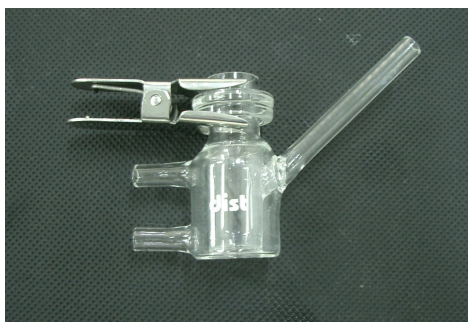
- Fase móvel: isopropanol:tetrahydrofurano:água (5:15:85);

- Fluxo: 1,5 ml/min;
- Comprimento de onda: 340 nm;
- Tempo de análise: 30 min;

As análises foram realizadas em triplicata em aparelho para cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu LC-10<sup>®</sup>, coluna C-18 Phenomenex<sup>®</sup>, Luna 5  $\mu$  (250 x 4,60 mm), termostaticado a 30 °C e os cromatogramas foram obtidos pelo programa Class VP do próprio equipamento.

### ***Permeação cutânea in vitro do serum contendo extratos das folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride***

A célula de difusão *in vitro* (Franz modificada) (Gomara, 2003) foi confeccionada em vidro PIREX, apresentando um compartimento receptor de 11 ml, uma área disponível para a difusão de 1,89 cm<sup>2</sup> (Figura 14). O sistema de difusão é estático e acoplado a banho-maria com circulação externa para a manutenção da temperatura do sistema (37 °C). Esse sistema foi montado no aparelho de permeação cutânea Permeagear<sup>®</sup> (modelo V6), o qual possui seis estações para as células de difusão *in vitro* com agitação magnética (Figura 15).



**Figura 14:** Célula de Franz modificada utilizada no presente trabalho.



**Figura 15:** Equipamento Permeagear<sup>®</sup> acoplado à banho-maria, com quatro células de difusão *in vitro*.

Utilizou-se membrana natural obtida por dissecação da pele de orelha de porcos, após o sacrifício do animal (antes do processo de escalde). A superfície da pele foi lavada com água destilada, os pêlos foram cortados com tesoura e a pele foi retirada com auxílio de bisturi e pinça para dissecação. Em seguida foram removidos os tecidos subcutâneo e gorduroso presentes abaixo da epiderme e certificou-se da integridade da pele (Figura 16). Foram selecionadas peles íntegras, livres de qualquer tipo de lesão ou alterações. As amostras de pele dissecadas e íntegras foram embrulhadas em filme plástico e em papel alumínio e posteriormente congeladas (Figura 17). Quando necessário essas amostras eram descongeladas à temperatura ambiente e colocadas nas células de difusão *in vitro* para a realização dos ensaios.

A solução receptora, tampão fosfato isotônico pH 7,4 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M em água), foi colocada no interior das células de difusão, evitando-se a formação de bolhas. Sobre a extremidade superior das células foram esticadas as membranas, cuidando para que o lado da derme ficasse em contato com a solução receptora. Ligou-se o banho-maria com circulação externa e quando a temperatura da célula foi equilibrada em 37 °C, espalhou-se uniformemente sobre toda a área da membrana 2 g do *serum*.

O sistema de agitação foi acionado e amostras de 500  $\mu\text{l}$  da solução receptora foram coletados em intervalos de 30 min durante 3 h para a determinação do tempo lag, correspondente ao tempo que o marcador leva para permear a membrana e atingir a solução receptora, a cada 1 h durante 9 h e uma no tempo 24 h para determinação da cinética de difusão. Após essa determinação, a coleta foi efetuada nos tempos de 12 e 24 h. Para manter o volume constante, a cada coleta adicionou-se ao sistema 500  $\mu\text{l}$  de solução receptora nova. As leituras foram feitas em triplicata e como controle foi realizado outro experimento contendo o mesmo *serum* isento de extrato e acrescido de vitamina C 10%.



**Figura 16:** Pele de orelha de porco em processo de dissecação.



**Figura 17:** Aspecto final das peles de orelha de porco.

### ***Pesquisa de marcador (isovitexina) na pele de orelha de porco***

Após o teste de permeação *in vitro*, a pele de orelha de porco foi retirada da célula de difusão. A superfície da pele sobre a qual foi depositado o *serum* foi limpa utilizando-se algodão embebido em água para retirar o excesso de produto da pele. Após a limpeza, recortou-se a área da pele exposta à difusão e em seguida foi pesada e picotada. Os fragmentos obtidos foram transferidos para um tubo Falcon contendo 10 ml de fase móvel. Estes foram triturados em homogeneizador de tecidos (Ultraturrax®) até a dilaceração total da pele. A suspensão resultante foi submetida a sonicação em ultra-som de alta frequência (Elma®) durante 45 s, em intervalos de 15 s, para ocorrer o rompimento das células. O produto obtido foi filtrado em papel de filtro para um balão volumétrico de 25 ml e o volume foi completado com fase móvel (Gomara, 2003).

### ***Acetilação do extrato liofilizado de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride***

Ao extrato liofilizado (EL) (1 g) foi adicionado piridina (5 ml) e anidrido acético (10ml), sendo deixado em ambiente escuro e livre de umidade durante 12 h. Após esse período, o conteúdo foi solubilizado em clorofórmio (100 ml) e lavado com solução de HCl 2% v/v (3 x 100 ml) e com água destilada (3 x 100 ml). As fases orgânicas foram reunidas em erlenmeyer, secas com sulfato de sódio anidro e concentradas até *secura* em rotavapor. O extrato acetilado solubilizado em clorofórmio foi posteriormente filtrado em coluna de alumina (óxido de alumínio deativado com ácido acético) e o produto resultante foi evaporado à *secura*, resultando em 0,81 g do extrato acetilado (EA).

## **Perda por dessecação dos extratos preparados (EL e ESD)**

Cápsulas de porcelana foram colocadas em estufa a 110 °C durante 6 h, resfriadas em dessecador, tendo o peso aferido após o resfriamento e adicionadas de 0,5 g de EL ou de ESD (ambos em triplicata), pesadas novamente e levadas à estufa a 110 °C durante 6 h. Após esse período, foram resfriadas em dessecador e o peso aferido.

## **Análise estatística**

Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  o desvio padrão da média (DP) para um número de amostra (n) de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se o teste *t* de Student, o teste de regressão simples e intervalos de confiança, quando indicado e foram considerados significativos quando  $p \leq 0,005$ . Também foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA) quando comparados três ou mais amostras, por meio do Programa de análise estatística GraphPad Prism 3.03<sup>®</sup>.

# Resultados e Discussão

---

As folhas secas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, família Cesalpiniaceae, possuem alta capacidade antioxidante, verificada pelos métodos *in vitro* da reação com o radical DPPH<sup>•</sup> e da redução do complexo fosfomolibdênico (Bianco, 2003; Menezes et al., 2004) e há muito pouco estudo até o presente com esta espécie. Com base nessa afirmativa, formulou-se a hipótese de que extratos da mesma, em uma forma farmacêutica adequada, poderiam ser utilizados como preventivos do envelhecimento precoce da pele, prevenindo o estresse oxidativo das células, pois, percebe-se que o envelhecimento cutâneo é muito mais afetado pela formação de radicais livres que pelo programa genético e cronológico (Soussolier e Berthon, 1988; Anderson, 1996; Jay et al., 1998; Podda et al., 1998; Ma et al., 2001; Podda e Grundmann-Kollmann, 2001; Jenkins, 2002; Rittié e Fisher, 2002). Para tanto, foi escolhida uma forma farmacêutica de uso tópico, *serum*, para veicular o extrato e que atendesse alguns critérios fundamentais para uma boa formulação, dentre os quais: i) viável economicamente; ii) características sensoriais adequadas; iii) estabilidade; iv) facilidade de aplicação e ainda, v) cedência do ativo para que este apresente um fluxo adequado pelo tecido cutâneo, atingindo os sítios específicos de ação, onde ocorrem os fenômenos de estresse oxidativo.

Com a finalidade de facilitar a incorporação do extrato à forma farmacêutica e contornar os problemas inerentes aos extratos líquidos e aquosos (susceptibilidade à degradação e à contaminação microbiana) (Sonaglio et al., 1999; Anchisi et al., 2001; Schulz et al., 2002), efetuou-se a secagem da fração hidrofílica por dois processos tecnológicos usualmente empregados na indústria farmacêutica: liofilização e atomização.

A liofilização baseia-se no princípio do congelamento da fase aquosa e subsequente sublimação à pressão reduzida, enquanto que a atomização baseia-se no uso de calor associado a sistema de redução de pressão (Sonaglio et al., 1999). A liofilização é utilizada quando se deseja secar produtos de interesse farmacêutico que são termossensíveis ou que reagem com o oxigênio. O produto liofilizado é facilmente redissolvido ou ressuspenso por adição de água, técnica conhecida por reconstituição. A liofilização depende do fenômeno de sublimação quando a água passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor sem passar pelo estado líquido e é levada a cabo a temperaturas e pressões bastante abaixo do ponto eutético<sup>1</sup> para prevenir que o gelo se funda, o que levaria à formação de espuma quando o líquido e o sólido se vaporizam

---

<sup>1</sup> Pressão e temperatura para os quais o sólido congelado vaporiza sem passagem pelo estado líquido.

simultaneamente. Os equipamentos utilizados são compostos por quatro elementos básicos: câmara para secagem a vácuo, fonte de vácuo, fonte de calor e sistema para remoção do vapor. A câmara de secagem é concebida normalmente para o funcionamento por lotes, funcionamento contínuo só é possível em equipamentos que possuam mecanismo especial de entrada e saída do material (Rankell et al., 2001).

A secagem em torre de aspersão ou *spray-drying* baseia-se no princípio do aumento da superfície específica da solução, suspensão ou emulsão a secar, por meio de sua atomização, elevando assim a área de contato com o fluido de secagem. Ocorre a nebulização do extrato líquido em um cilindro de secagem, no qual é injetada, por meio de um difusor, uma corrente de ar quente suficiente para realizar a evaporação da água ou da parte líquida (Sonaglio et al., 1999; Farid, 2003). Para prevenir posterior absorção de umidade pelo extrato atomizado, foi adicionado 0,5% de Aerosil®. O volume de produção, as características físico-químicas do produto seco atomizado e a facilidade operacional constituem algumas das vantagens, porém, exige um aporte energético considerável (Sonaglio et al., 1999). A importância da atomização está também relacionada às características de aplicação apresentadas pelo produto atomizado, tais como a facilidade de manipulação em relação à outras formas extrativas, maior estabilidade e uma padronização adequada, facilitando a posologia (Souza e Ortega, 1997).

O rendimento do extrato em pó pelo método da liofilização foi de 1,44 g% de extrato liofilizado (EL); pelo processo de atomização obteve-se 2,86 g% de extrato atomizado (ESD), sendo 1,86 g% de extrato e 1,00 g% de excipiente, dióxido de silício coloidal (Aerosil®) 0,5% em relação à fração hidrofílica, ou seja, obteve-se um extrato 13:7, ambos correspondendo a 6,307 g de folhas secas moídas.

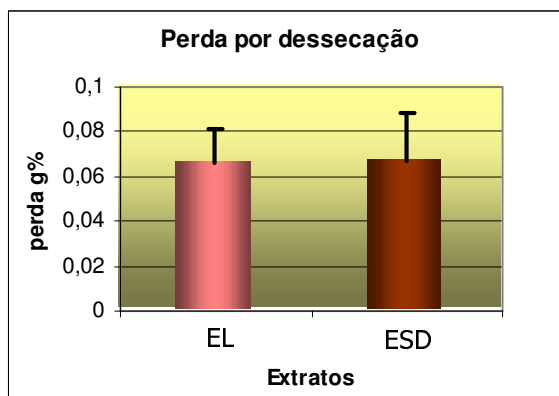
Uma vez obtidos os extratos, foram realizadas análises de suas capacidades antioxidantes pela reação com o radical DPPH', redução do complexo fosfomolibdênico e redução da formação de metahemoglobina formada em eritrócitos humanos induzida pela fenil-hidrazina; perda por dessecação, doseamento dos flavonóides totais, segundo Pharmacopéia Helvética, e do marcador por CLAE. Além disso, depois de adicionados nas formulações de *serum*, verificou-se a manutenção da capacidade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênico e a liberação do marcador pelas formulações por meio de teste de liberação *in vitro*.



## **Perda por dessecação dos extratos preparados (EL e ESD)**

Devido a presença de água nos extratos aumentar a susceptibilidade da degradação de seus componentes e da contaminação microbiana (Sonaglio et al., 1999; Anchisi et al., 2001; Schulz et al., 2002), foi realizada a perda por dessecação de ambos extratos com a finalidade de verificar a quantidade de umidade presente nos mesmos.

Após análise, verificou-se que os extratos possuíam perdas semelhantes, apresentando os valores de  $0,0661\text{g}\% \pm 0,0149$  (EL) e  $0,0667\text{g}\% \pm 0,0220$  (ESD) (Figura 18). Estatisticamente não há diferença significativa entre os valores apresentados.



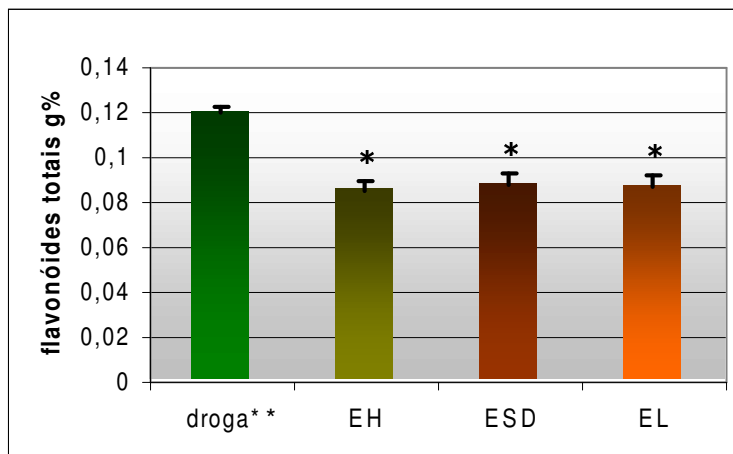
**Figura 18:** Perda por dessecação apresentada pelos extratos EL ( $0,0661 \pm 0,0149$ ) e ESD ( $0,0667 \pm 0,0220$ ) em g%. Análise realizada em triplicata.

## **Análise do teor de flavonóides dos extratos**

A capacidade antioxidante do extrato de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride pode ser devida à presença de flavonóides, apresentando  $0,12\text{ g}\%$  na droga (Bianco, 2003). Para quantificar, no geral, os flavonóides presentes nos extratos preparados, realizou-se o doseamento segundo metodologia da Farmacopéia Helvética (Suisse, 1995) para *Passiflora incarnata* (maracujá). Os resultados obtidos encontram-se sumarizados na Figura 19, onde a fração hidrofílica (EH) apresentou um teor de  $0,0852\text{ g}\% \pm 0,004$ ,  $0,0871\text{ g}\% \pm 0,005$  para o extrato liofilizado (EL) e,  $0,0882\text{ g}\% \pm 0,005$  para o extrato atomizado (ESD).

Nota-se, pela análise estatística, que não existe diferença significativa entre os teores de flavonóides dos extratos, sendo a metodologia utilizada para o doseamento

válida e que a perda de flavonóides ocorrida durante o processamento dos extratos foi relativamente pequena.



\*diferença significativa com relação à droga para  $p \leq 0,005$  ( $n=3$ ).  
\*\*dado de (Bianco, 2003).

**Figura 19:** Flavonóides totais (g%) presentes na droga (0,12 ± 0,003), fração hidrofílica (EH) (0,0852 ± 0,004), EL (0,0871 ± 0,005) e ESD (0,0882 ± 0,005).

A diferença de teores de flavonóides totais entre a droga e os extratos pode ocorrer devido ao fato da extração dos flavonóides não ter sido completa, pois o processo de maceração não permite o esgotamento da planta (Sonaglio et al., 1999). Além disso, esta técnica de doseamento não permite a avaliação de flavonóides C-glicosilados, pois os mesmos resistem à hidrólise ácida, não sendo extraídos com acetato de etila e, conseqüentemente, não determinados (Rehwald et al., 1994b; Rehwald et al., 1994a). Um outro fator que pode justificar essa perda foi a precipitação de alguns flavonóides junto com a clorofila e outros componentes lipofílicos durante o processo de deslipidificação do extrato hidroetanólico bruto, ficando na fração hidrofílica apenas os flavonóides que têm esta característica. Deve-se ressaltar ainda que há interferência da fração lipofílica e da clorofila que absorvem na mesma faixa de absorção do método (420 nm), aumentando a absorvância da amostra (Petry et al., 1998).

## ***Métodos analíticos para a avaliação da atividade antioxidante***

Devido ao reconhecido efeito dos radicais livres contribuindo na patogênese de várias doenças humanas (Holley e Cheeseman, 1993), com conseqüências muitas vezes prejudiciais às células, a procura por substâncias que possam atenuar ou mesmo impedir suas ações tem se ampliando, assim como os métodos para avaliar o potencial antioxidante dessas substâncias, de origem natural ou sintética.

De modo geral, pode-se estudar os efeitos antioxidantes das substâncias por meio de sistemas químicos e biológicos, estes últimos podem ser *in vivo* e *in vitro*. Para todos eles é necessário estabelecer modelos de indução de oxidação, selecionar o agente indutor do dano oxidativo e o modo de se mensurar o efeito exercido pelo(s) antioxidante(s) ou sua extensão (Lon et al., 1999).

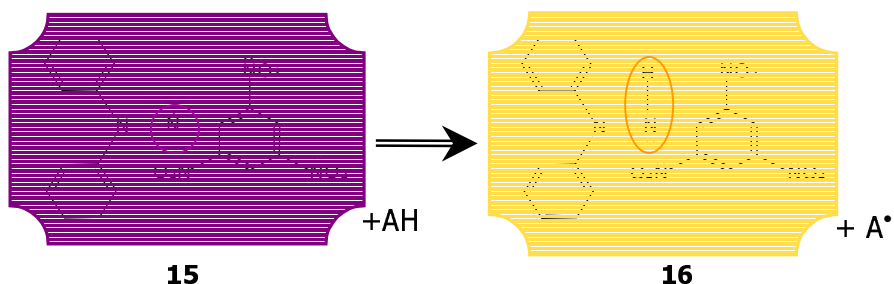
A atividade antioxidante de uma substância não pode ser avaliada diretamente, mas por meio dos seus efeitos sobre um substrato ou sistema passível de ser monitorado. A maioria desses métodos utiliza processos oxidativos, os quais envolvem a adição de um agente iniciador (temperatura, agitação ou uma pressão parcial de O<sub>2</sub>, um metal de transição ou mesmo exposição à luz) para acelerar o processo, e uma fonte de radicais livres específica. Esses radicais são, então, oxidados sob condições padronizadas e o grau de oxidação, ou sua extensão, medido (Antolovich et al., 2002).

Muitos métodos têm sido utilizados para expressar a capacidade antioxidante de extratos obtidos de plantas, onde o efeito de várias concentrações é comparado ao efeito exercido por uma substância de atividade reconhecida, como por exemplo, as vitaminas C ou a E, ou com um composto puro, como a quercitina e a rutina. Contudo, a distinção entre atividade antioxidante e capacidade antioxidante deve estar presente quando se interpreta os resultados, uma vez que esta se refere à somatória de todas as atividades antioxidantes exercidas individualmente por cada componente presente em uma mistura, como é o caso de extratos (Antolovich et al., 2002).

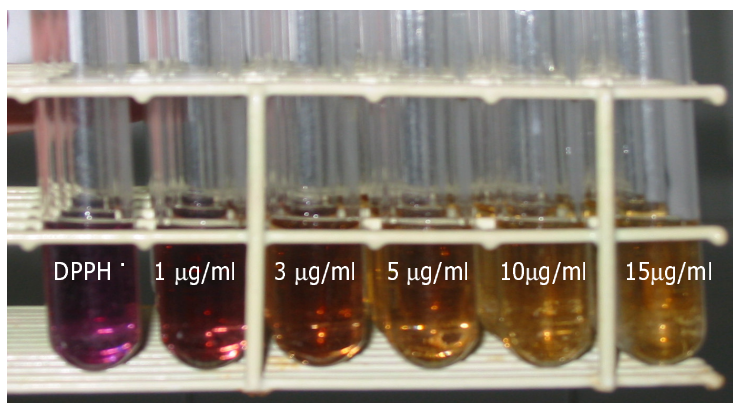
### ***Determinação da capacidade antioxidante dos extratos de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride pelo método com DPPH'***

Dentre os métodos químicos usados para a determinação da atividade antioxidante, destaca-se o método que utiliza o radical DPPH\* (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (15), o qual é um radical livre estável que, na presença de um antioxidante

doador de hidrogênio (AH), pode ser reduzido em meio alcoólico, formando difenil picrilhidrazina (**16**) (Koleva et al., 2002). Esta redução pode ser acompanhada espectrometricamente em 518 nm, pela diminuição da absorvância, com simultânea mudança da coloração violeta escura original do radical para uma coloração amarela do produto reduzido, descorando à medida que a reação se processa. Quanto maior a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, o DPPH<sup>•</sup> residual, mensurado após um tempo, corresponde inversamente à atividade antioxidante da substância analisada. A intensidade dessa mudança de coloração é proporcional à concentração da(s) substância(s) com potencial antioxidante presente(s), de conformidade com as leis de Lambert e Beer (Figura 20). Essa descoloração gradativa deve-se ao pareamento, também gradativo, dos elétrons de DPPH<sup>•</sup> disponíveis (Blois, 1958).



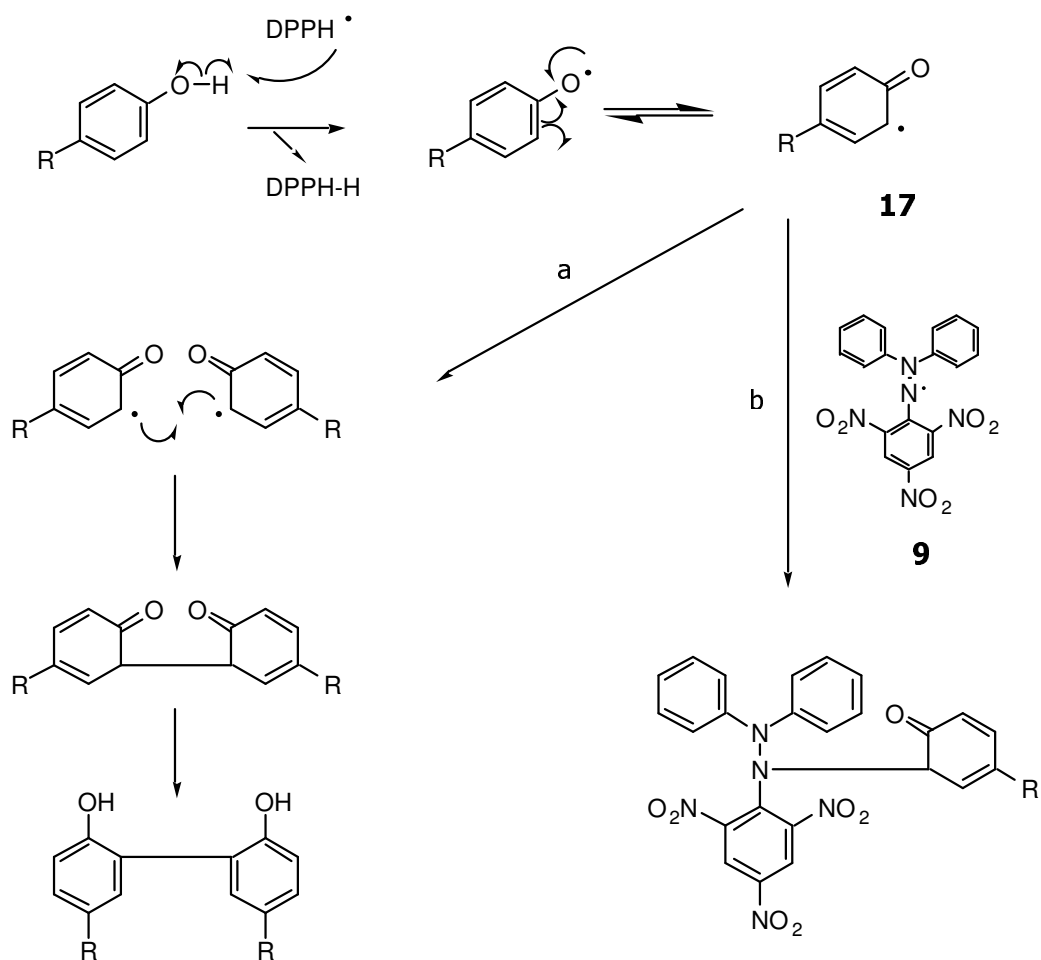
O método do DPPH<sup>•</sup> mostra-se como uma alternativa rápida, pois ocorre em aproximadamente 30 min, com reagentes de custo acessível e por não necessitar de equipamentos sofisticados. Além disso, neste método, a eficiência antioxidante é mensurada em temperatura ambiente, eliminando-se o risco de degradação térmica de algumas das substâncias analisadas (Bondet et al., 1997).



**Figura 20:** Atividade antioxidante do extrato clorofilado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride avaliada pelo método de redução do DPPH<sup>•</sup>, nas concentrações de 1, 3, 5, 10 e 15 µg/ml, tratadas com solução de DPPH<sup>•</sup> por 30 min à temperatura ambiente e a mudança de coloração de violeta para amarela foi proporcional à concentração do extrato.

O ensaio de redução do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazila (DPPH<sup>•</sup>) (Blois, 1958) tem sido amplamente utilizado como um método químico para a investigação do potencial antioxidante de produtos naturais, como extratos de plantas medicinais (Holley e Cheeseman, 1993; Braca et al., 2001; Lu e Food, 2001; Mensor et al., 2001; Braca et al., 2002).

Os mecanismos de reação propostos para o método do DPPH<sup>•</sup>, descritos por Brand-Williams e colaboradores (1995) para substâncias fenólicas ilustrados a seguir, parecem envolver, de forma isolada ou combinada, a (a) dimerização por acoplamento oxidativo de dois radicais formados (**17**), seguida da regeneração de dois grupos hidroxila pela transferência do hidrogênio, podendo novamente reagir com DPPH<sup>•</sup> e (b) um radical de DPPH<sup>•</sup> (**9**) pode se estabilizar com um radical aril (Esquema 3).



**Esquema 3:** Provável rota de reação para substâncias fenólicas com o radical DPPH<sup>•</sup>: (a) dimerização por acoplamento oxidativo entre dois radicais formados, e (b) estabilização de um radical DPPH<sup>•</sup> com um radical aril.

Quando o método do DPPH\* é utilizado, variação acentuada no modo de apresentação dos resultados concernentes à atividade antioxidante investigada é observada, dificultando comparações. Por exemplo, pode-se expressar os resultados como a capacidade de seqüestrar/reduzir o radical DPPH\* em porcentagem (Holley e Cheeseman, 1993; Lu e Food, 2001; Choi et al., 2002), pelo valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, a quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH\* (Brand-Williams et al., 1995) ou, ainda, pelo poder antioxidante ou poder anti-radical, o qual expressa a relação inversa da IC<sub>50</sub> (Brand-Williams et al., 1995).

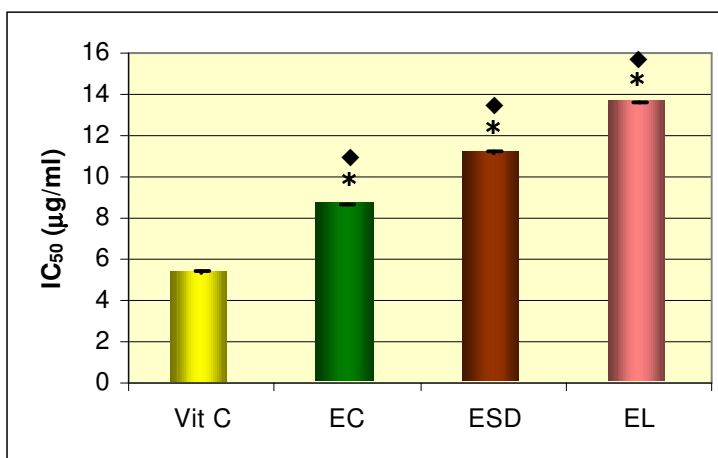
Neste trabalho, os resultados da capacidade antioxidante dos extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride estudados por esta metodologia estão apresentados por meio da IC<sub>50</sub>, quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH\* e quanto menor o seu valor, maior a capacidade antioxidante da droga.

Os valores da IC<sub>50</sub> encontrados para os diferentes extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride foram 11,1501 µg/ml ± 0,0412 para ESD, 13,5860 µg/ml ± 0,0385 para EL e de 8,6403 µg/ml ± 0,0342 para o extrato clorofilado (Figura 21).

Pode-se dizer que os extratos preparados, de uma forma geral, mantém alta capacidade antioxidante da droga quando compara-se com os valores obtidos de outras espécies, como é o caso da *Rauvolfia sellowii* (pau-para-tudo) (IC<sub>50</sub> de 30,27 µg/ml), *Jacaranda micrantha* (caroba) (IC<sub>50</sub> de 46,29 µg/ml), *Phoradendron falcifrons* (salsamoura) (IC<sub>50</sub> de 60,05 µg/ml), *Anchietea pyrifolia* (cipó-suma) (IC<sub>50</sub> de 91,81 µg/ml), *Wilbrandia ebracteata* (taiuiá) (IC<sub>50</sub> de 170,41 µg/ml), *Discorea granulosa* (salsaparrilha) (IC<sub>50</sub> de 260,88 µg/ml) e *Casearia sylvestris* (guaçatonga) (IC<sub>50</sub> de 471,80 µg/ml) (Menezes et al., 2004). É interessante notar que, quando comparados à substâncias de reconhecida ação antioxidante, como quercetina (IC<sub>50</sub> de 1,6 µg/ml), rutina (IC<sub>50</sub> de 8,13 µg/ml) (Bianco, 2003) e vitamina C (IC<sub>50</sub> de 5,38 µg/ml), pode-se afirmar que os resultados apresentados pelos extratos preparados apresentam alta capacidade antioxidante, levando-se em consideração, ainda, que se trata de uma mistura de compostos comparados a substâncias antioxidantes puras. Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos preparados, foi usado também como referência o extrato hidroetanólico (EC) que apresentou IC<sub>50</sub> = 8,6403 µg/ml, atividade menor que a vitamina C e maior que os extratos preparados. Esse resultado corrobora com os valores encontrados no doseamento de flavonóides apresentados na Figura 19, onde a presença em maior quantidade destes compostos fenólicos resulta no incremento da capacidade antioxidante. Uma alternativa poderia ser também devido à presença de clorofila no

extrato EC, a qual possui atividade antioxidante e sua retirada causa um decréscimo na capacidade antioxidante do extrato. Extratos de quatro espécies de *Baccharis* após a remoção da clorofila reduziram em 90% a atividade antioxidante quando avaliados pelo método do DPPH\* (Boas et al., 2003).

Estatisticamente, há diferença significativa ( $p \leq 0,005$ ) entre os  $IC_{50}$  apresentados pelos extratos e a vitamina C. Nota-se, também, uma diferença significativa entre os  $IC_{50}$  dos extratos preparados, sendo o de maior capacidade o ESD (Figura 21). Pode ter ocorrido uma concentração das substâncias antioxidantes desse extrato pela volatilização de substâncias não antioxidantes durante o processo de atomização e ainda a proteção do ESD pelo Aerosil®, evitando a degradação de seus compostos ativos como discutido por Vasiljevic e Jelen (2003). Em seu trabalho, Vasiljevic e Jelen pesquisaram a influência de adjuvantes na atividade catalítica da enzima  $\beta$ -galactosidase (obtida de extrato de *Lactobacillus delbreckii* ssp. *bulgaricus* 11842) seca pelos processos de atomização e liofilização. Os pesquisadores concluíram que a adição desses adjuvantes protege a enzima da degradação causada pelos procedimentos de secagem, no caso da atomização a degradação pela exposição à alta temperatura e no caso da liofilização a degradação por desnaturação protéica pelo congelamento, indicando, portanto, o uso destes agentes protetores para a manutenção da atividade catalítica da mesma e sugere que a adição de adjuvantes a outras substâncias antes da sua secagem pode protegê-las dos danos causados pela degradação por alteração de temperatura.



\*diferença entre a vitamina C e os extratos  $p \leq 0,005$ ;

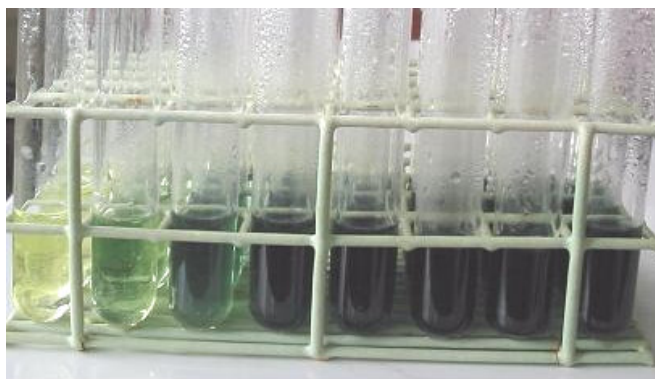
♦diferença entre os extratos  $p \leq 0,005$

**Figura 21:** Comparação entre os valores de  $IC_{50}$  apresentados pela vitamina C ( $5,38 \mu\text{g/ml} \pm 0,020$ ), EC ( $8,6403 \mu\text{g/ml} \pm 0,0342$ ), ESD ( $11,1501 \mu\text{g/ml} \pm 0,0412$ ) e EL ( $13,586 \mu\text{g/ml} \pm 0,0385$ ). Extratos ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) foram preparados e seu potencial antioxidante investigado pelo método da reação com DPPH\*. Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão da  $IC_{50}$  em relação àquela da vitamina C, usada como padrão ( $200 \mu\text{g/ml}$ ), obtida de três ensaios independentes, realizados em triplicata.

## ***Determinação da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride pelo método da redução do complexo fosfomolibdênio***

Outro método freqüentemente usado para avaliar a capacidade antioxidante é o ensaio do fosfomolibdênio, o qual baseia-se na redução do  $\text{Mo}^{+6}$  para  $\text{Mo}^{+5}$ , com subsequente formação de um complexo fosfato- $\text{Mo}^{+5}$  (Prietto et al., 1999; Lu e Food, 2001). Em contraste com o método do DPPH' acima descrito, esta reação se processa a temperaturas elevadas e por tempo prolongado (Prietto et al., 1999).

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio é um método considerado simples, de baixo custo e usado quando se deseja avaliar e comparar a capacidade antioxidante de uma variedade de extratos. Assim, concentrações crescentes de EL, ESD e EC foram submetidas à reação de óxido-redução como previamente descrito. A solução teste inicial possui coloração amarela tornando-se verde à medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz, sendo lida em 695 nm (Figura 22) (Prietto et al., 1999).



**Figura 22:** Ensaio da capacidade antioxidante de extratos em diferentes concentrações após redução do complexo fosfomolibdênio. As colorações mais claras são resultantes de pouca transferência de elétrons, tornando-se mais escuras à medida que ocorre maior transferência de elétrons.

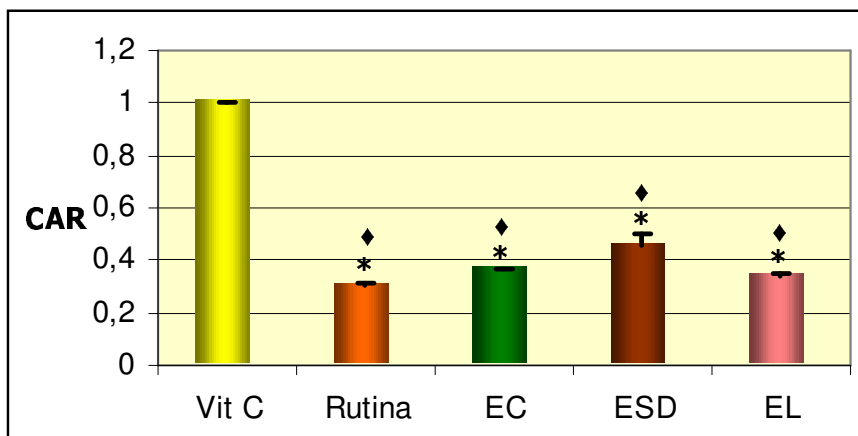
A Figura 23 mostra os valores encontrados para a capacidade antioxidante desses extratos em relação à vitamina C (200  $\mu\text{g/ml}$ ), substância reconhecida pelo seu poder antioxidante que assume o valor da unidade (May, 1999; VanDuijn et al., 2001; VanDuijn et al., 2002) e freqüentemente utilizada como referência neste tipo de ensaio experimental (Prietto et al., 1999). Dessa forma, pode-se observar que a Capacidade Antioxidante Relativa (CAR) de todos os extratos foram menores que a referência mas



mostraram capacidade semelhante à rutina, flavonóide abundante em frutas e vegetais e dotado de comprovada atividade antioxidante (Afanas'ev et al., 1989; Ferrali et al., 1997; Fiorani et al., 2002).

Dentre os extratos estudados, o que apresentou maior potencial para reduzir o complexo fosfomolibdênico também foi o ESD, cuja atividade foi de  $0,461 \pm 0,0364$ . Em uma escala decrescente de valores para a capacidade antioxidante, seguiu-se o EC ( $0,363 \pm 0,0075$ ) e o EL ( $0,338 \pm 0,0072$ ), enquanto que a rutina apresentou um valor de  $0,302 \pm 0,0091$ . Pela análise estatística nota-se a diferença significativa entre a CAR da vitamina C quando comparados aos extratos e à rutina e, também uma diferença significativa entre os valores de CAR do ESD quando comparado ao EC, EL e rutina ( $p \leq 0,005$ ). Já entre os extratos e a rutina não houve diferença significativa.

Esses resultados permitiram observar também que há variação no potencial antioxidante entre os extratos obtidos pelos dois processos de secagem utilizados. O resultado é semelhante ao obtido pelo método do DPPH\*, podendo-se também justificar pelo que já foi discutido anteriormente segundo Vasiljevic e Jelen (2003).



\*diferença com relação à vitamina C  $p \leq 0,005$   
♦diferença com relação ao ESD  $p \leq 0,005$ .

**Figura 23:** Comparação da atividade antioxidante de EC, ESD e EL. Extratos ( $200\mu\text{g/ml}$ ) foram preparados e seu potencial antioxidante investigado pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Cada coluna representa a média  $\pm$  desvio padrão da capacidade antioxidante em relação a atividade desempenhada pela vitamina C (CAR), usada como padrão ( $200\mu\text{g/ml}$ ) e rutina ( $200\mu\text{g/ml}$ ), obtida de três ensaios independentes, realizados em triplicada

Nota-se aqui também a boa capacidade antioxidante dos extratos quando comparados aos valores de CAR obtidos por Menezes e colaboradores (2004) usando o mesmo método para outras espécies, como no caso de *Philodendron bipinnatifidum* (cipó-

imbé) (0,37), *Jacaranda micrantha* (caroba) (0,38), *Wilbrandia ebracteata* (taiuiá) (0,28) e com outros resultados obtidos por Pellizzaro (2003), como *Zingiber officinale* (gengibre) (0,295) e *Origanum vulgare* (orégano) (0,16). Para o extrato etanólico bruto de *B. microstachya* (Raddi) Macbride, Menezes e colaboradores (2004) encontraram uma CAR de 2,6, muito acima do valor da referência, enquanto que os resultados obtidos por BIANCO (Bianco, 2003) para os extratos das folhas são semelhantes aos encontrados neste trabalho. A CAR 0,31 para os extratos clorofórmico e hidroetanólico bruto, 0,45 para o extrato hidroetanólico desclorofilado, e 0,49 para o extrato *n*-hexânico.

### ***Verificação da capacidade antioxidante dos extratos de folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride na prevenção do estresse oxidativo induzido em eritrócitos humanos***

Em contraste com os métodos químicos, os radicais livres biológicos de interesse são extremamente reativos e de vida curta, pois, sendo produzidos *in vivo*, reagem no local ou próximo à sua fonte de geração. Como consequência, sua atividade é medida por métodos indiretos, onde se avalia a interação desses com componentes lipídicos ou protéicos das células. Além disso, quando substâncias antioxidantes são administradas em animais ou em humanos, o ambiente químico no qual atuam é altamente controlado e seus níveis são limitados pelos seus índices de absorção e excreção. Assim, há maiores dificuldades em induzir-lhes um estresse oxidativo ou medir seu efeito (Anderson e Phillips, 1999).

As técnicas atualmente disponíveis para a medição do efeito dos antioxidantes frente à ação de radicais livres *in vivo* estão limitadas a ensaios semi-quantitativos do dano oxidativo residual impostos a diferentes classes de biomoléculas (Holley e Cheeseman, 1993). Por exemplo, tecidos são mantidos sob condições constantes de estresse oxidativo e a atividade de enzimas antioxidantes endógenas pode ser mensurada, possibilitando a investigação dos efeitos exercidos pelo antioxidante em teste (Anderson e Phillips, 1999).

Os métodos *in vitro* para avaliar a capacidade antioxidante são muito sensíveis ao ambiente químico em que eles ocorrem, particularmente na concentração de oxigênio, presença de metais de transição e de numerosos compostos 'redox' ativos (Anderson e Phillips, 1999). Desta maneira, vários testes podem ser utilizados como, por exemplo, os sistemas xantina-xantina oxidase (Chang et al., 1993; Chang et al., 1994), peroxidação do

ácido linolêico (Kuo et al., 1999), substâncias reativas aos produtos de oxidação do ácido tiobarbitúrico (TBA) (Holley e Cheeseman, 1993).

Recentemente, foram investigados os efeitos protetor e oxidante da vitamina C (Claro, 2002), do extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera*, rutina e quercitina (Comar, 2002) e de extratos de vegetais da família Brassicaceae de diferentes cultivos (Arbos, 2003) sobre o estresse oxidativo induzido pela fenil-hidrazina (FH) em eritrócitos humanos através dos níveis de metahemoglobina (metaHb) formada. Este sistema tornou-se alvo de interesse com a finalidade de se estabelecer um método biológico alternativo para ser utilizado no estudo da atividade antioxidante de extratos de vegetais e plantas medicinais devido às suas propriedades morfofisiológicas, relativa estabilidade quando preservados *in vitro* e, principalmente, facilidade de obtenção do substrato (Ferrali et al., 1992).

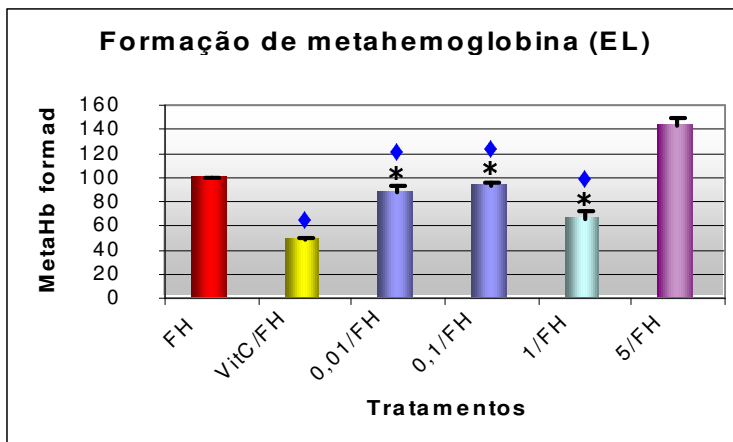
O ensaio biológico para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais utiliza eritrócitos humanos, os quais são dotados de um sistema natural capaz de protegê-los contra a oxidação de seus constituintes, de forma a garantir sua integridade estrutural e funcional, além de assegurar que o ferro da molécula de hemoglobina permaneça na forma ferrosa ( $Fe^{+2}$ ). No entanto, se o eritrócito for exposto a uma sobrecarga oxidativa que supere sua capacidade redutora, poderá haver um aumento proporcional na produção de metaHb, uma proteína incapaz de carrear o oxigênio por apresentar o ferro no estado oxidado ( $Fe^{+3}$ ), a qual pode ser avaliada quantitativamente após leitura em 630 nm.

Assim, alíquotas de suspensão de eritrócitos obtidos de doadores voluntários, pré-tratadas ou não com vitamina C (20 mM) ou concentrações crescentes (0,01 a 10 mg/ml) de ESD ou de EL, foram submetidas ao estresse oxidativo induzido por FH (1 mM). Durante o teste, notou-se a desestabilização do sistema na concentração de 10 mg/ml de extrato, tanto ESD quanto EL. Essa concentração foi, então, reduzida até se obter uma que mantivesse a estabilidade do sistema, a qual foi de 5 mg/ml de extrato (ESD ou EL). Os resultados estão apresentados nas Figuras 24 e 26, onde cada coluna representa, na concentração indicada, a porcentagem de metaHb formada em relação à amostra controle, tratada apenas com FH e normalizada em 100%. Nas Figuras 25 e 27 encontram-se sumarizados os valores na redução da metaHb formada pelos respectivos tratamentos.

A exposição de eritrócitos humanos pré-tratados com vitamina C e FH (Figura 25 e 27) resultou na redução significativa de  $50,5\% \pm 1,9799$  de metaHb formada ( $n=6$ ;  $p \leq 0,005$ ) indicando uma proteção eficiente dessa substância sobre os eritrócitos no modelo proposto, corroborando com sua reconhecida ação antioxidante (Chaudière e

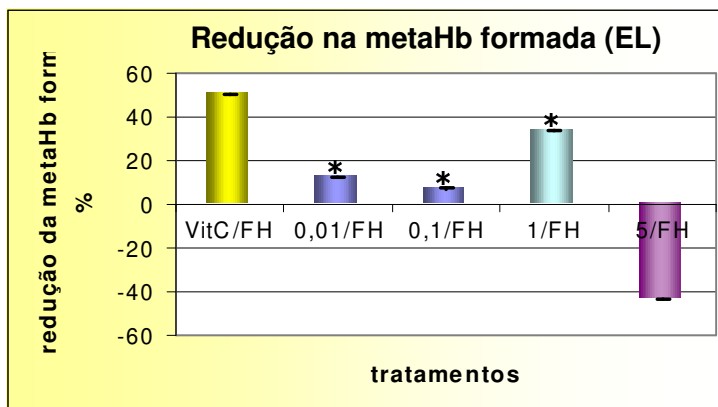
Ferrari-Iliou, 1999; Sharma e Morgan, 2001; Mitchell et al., 2003), como também com os resultados obtidos por Claro (2002).

Ao investigarem-se os efeitos protetores do extrato liofilizado sob condições experimentais similares (Figura 24), as concentrações de 0,01 a 1 mg/ml foram capazes de reduzir significativamente a formação de metaHb ( $n = 3$ ;  $p \leq 0,005$ ) em comparação à amostra controle, produzindo  $87,42\% \pm 0,0565$ ,  $92,79\% \pm 0,0311$ ,  $66,18\% \pm 0,0594$  de metaHb, respectivamente. Já a concentração de 5 mg/ml teve efeito tóxico, apresentando uma formação de  $143,5\% \pm 0,0647$  de metaHb, ou seja, houve um aumento de 43,5% em comparação com o grupo controle de FH.



\*diferença com relação à vitamina C; para  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$   
 ◆diferença com relação à metaHb; para  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$ .

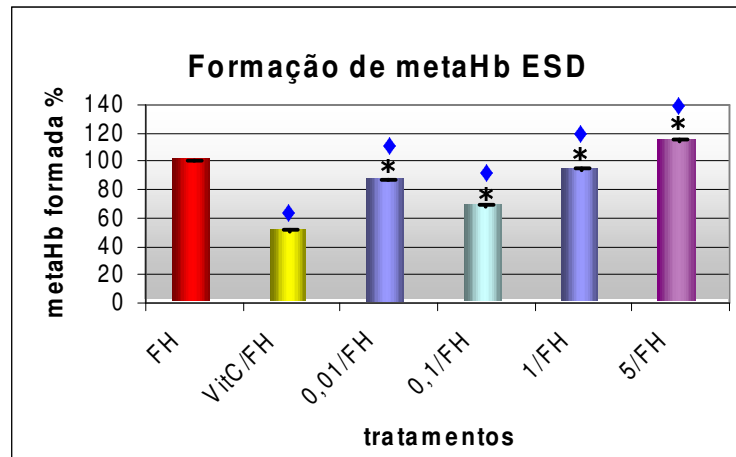
**Figura 24:** Formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com fenil-hidrazina (1 mM), vitamina C (20 mM) e 0,01, 0,1, 1 e 5 mg/ml de extrato liofilizado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.



\*diferença com relação à vitamina C para  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$ .

**Figura 25:** Redução na formação de metaHb por meio do tratamento das amostras com vitamina C (20 mM) e 0,01, 0,1, 1 e 5 mg/ml de extrato liofilizado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.

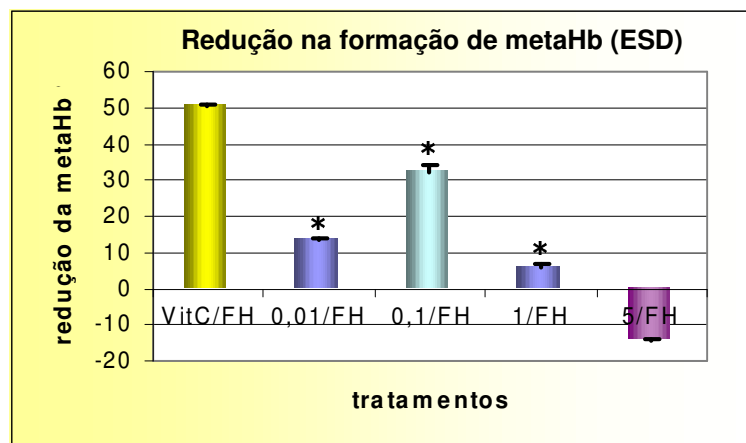
Com relação aos efeitos protetores do extrato atomizado sob condições experimentais similares (Figura 26), as concentrações de 0,01 a 1 mg/ml foram capazes de reduzir significativamente a formação de metaHb ( $n = 3$ ;  $p \leq 0,005$ ) em comparação à amostra controle, produzindo  $86,63\% \pm 0,7601$ ,  $67,67\% \pm 1,9718$ ,  $94,13\% \pm 0,9188$  de metaHb, respectivamente. Já a concentração de 5 mg/ml teve efeito tóxico, apresentando uma formação de  $114,27\% \pm 0,5877$  de metaHb, ou seja, houve um aumento de 14,7% em comparação com o grupo controle de FH.



\*diferença com relação à vitamina C;  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$

♦diferença significativa com relação à metaHb;  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$

**Figura 26:** Formação de metahemoglobina por meio do tratamento das amostras com fenil-hidrazina (1 mM), vitamina C (20 mM) e 0,01, 0,1, 1 e 5 mg/ml de extrato atomizado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.



\*diferença com relação à vitamina C,  $p \leq 0,005$  e  $n = 3$ .

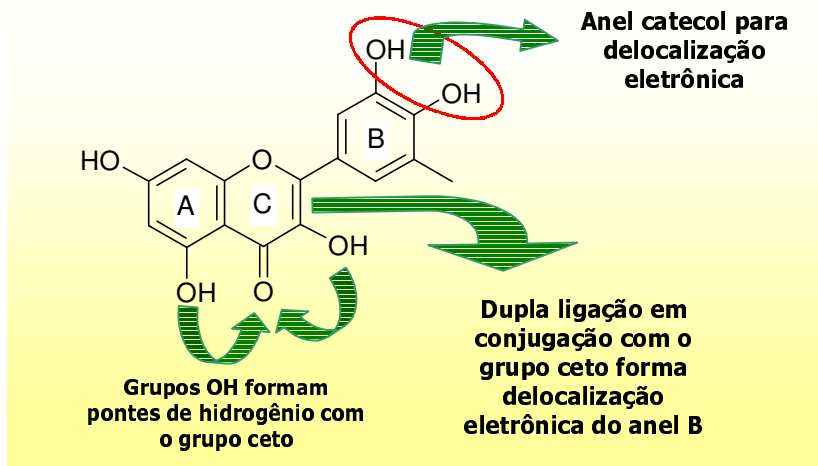
**Figura 27:** Redução na formação de metaHb por meio do tratamento das amostras com vitamina C (20 mM) e 0,01, 0,1, 1 e 5 mg/ml de extrato atomizado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.

Neste método de verificação da capacidade antioxidante, verifica-se que novamente o extrato atomizado possui uma capacidade antioxidante maior que aquela fornecida pelo extrato liofilizado, pois 0,1 mg/ml de ESD reduziu em 32,33%  $\pm$  1,9718 a formação de metaHb, enquanto 1 mg/ml de EL reduziu em 33,82%  $\pm$  0,0594, ou seja, foi preciso dez vezes mais EL para se ter praticamente a mesma redução na produção de metaHb fornecido pelo ESD. Essa diferença deve-se provavelmente, como explicado anteriormente, à concentração das substâncias com atividade antioxidante pela volatilização de substâncias não antioxidantes do ESD, quando este foi exposto à alta temperatura durante o processo de secagem e, ainda, ao sugerido por Vasiljevic e Jelen (2003). Ambos extratos apresentaram redução na formação de metaHb significativamente menor do que a apresentada pela vitamina C (amostra controle) ( $n = 3$ ;  $p \leq 0,005$ ) e assemelham-se aos resultados encontrados por Arbos (2003) para vegetais da família Brassicaceae, como por exemplo, no caso do brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L. subv. *cymosa*) o qual apresentou formação de 67,8%  $\pm$  0,5 de metaHb para 0,1 mg/ml de extrato.

### ***Avaliação por CLAE do perfil cromatográfico dos extratos hidroetanólico bruto, EL e ESD***

Uma vez avaliada e confirmada a capacidade antioxidante dos extratos preparados, é necessário uma avaliação dos compostos majoritários presentes, principalmente em relação à presença de flavonóides. Como visto anteriormente, a classe dos flavonóides, dentre outros compostos com ação antioxidante, têm importante significado neste tipo de ação. Devido às suas características estruturais, são capazes de captar radicais livres mantendo sua estabilidade por meio de ressonância eletrônica (Figura 28) (Chen, 1996; Havsteen, 2002).

Meyre-Silva e colaboradores (2001) e Bianco e Santos (2003) demonstraram previamente a presença de flavonóides nas folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride, tendo sido isolado pelos últimos o flavonóide C-glicosilado vitexina (**13**) e identificado por ressonância nuclear magnética de prótons com experimentos de correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY) e heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMQC e HMBC).

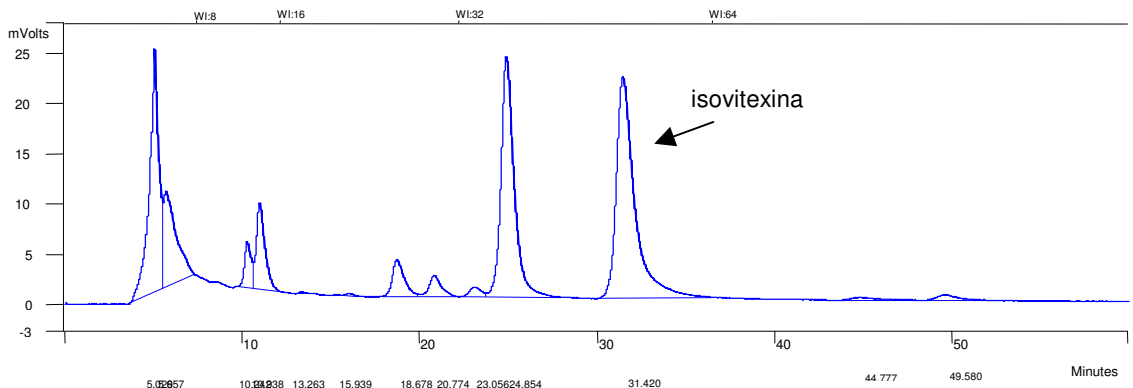


**Figura 28:** Estrutura química geral de um flavonóide indicando os aspectos que o fazem ter função captadora de radicais livres.

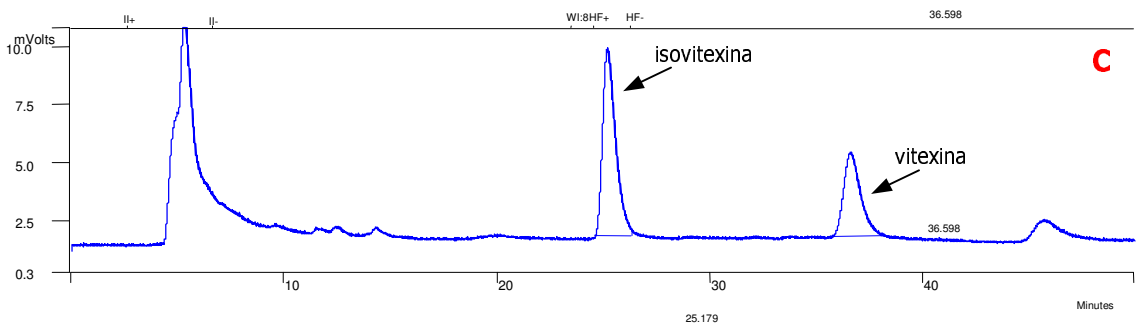
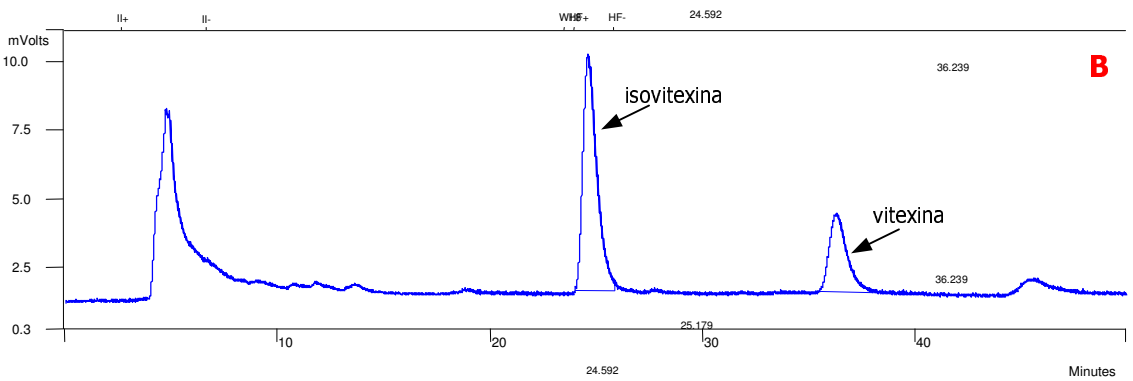
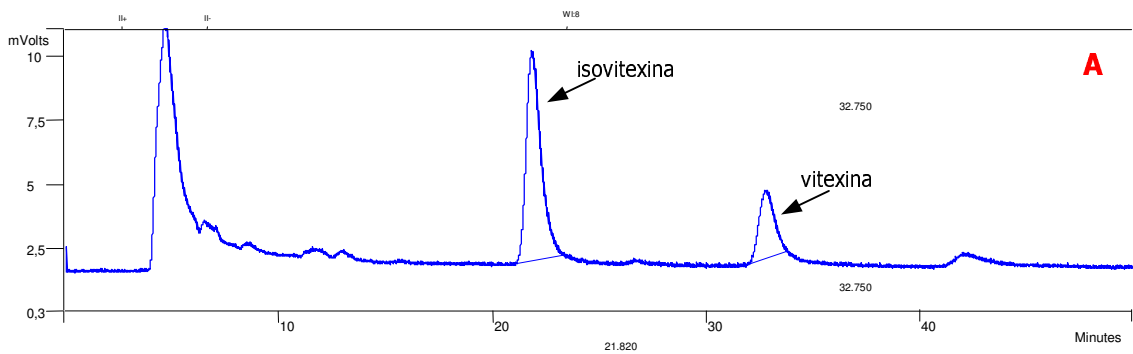
Um sistema apropriado para CLAE utilizado para um estudo dos flavonóides de *Passiflora incarnata* (Pietta et al., 1986; Pietta et al., 1989) foi aplicado para os extratos preparados de *B. microstachya* (Raddi) Macbride que sugeriu a presença na fração hidrofílica e no EL de dois flavonóides majoritários. Comparação com os tempos de retenção de padrões secundários de isovitexina (**7**) e vitexina (**13**) sugeriram a identificação desses componentes majoritários. De acordo com Rehwald e colaboradores (1994b), a identificação por meio da comparação dos tempos de retenção de picos e dos espectros UV é uma forma segura de identificação de compostos quando são utilizados padrões de referência adequados.

Sabe-se que a isovitexina e vitexina também são componentes majoritários na espécie *Passiflora actinia*, conforme descrito por Santos (2003). Com a falta momentânea do padrão de isovitexina, foi realizado em outras condições um perfil cromatográfico de extrato metanólico de *Passiflora actinia* conforme descrito por Santos (2003) (Figura 29) com a finalidade de se utilizar provisoriamente esse extrato como referência para as análises posteriores com os extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride.

O perfil cromatográfico dos extratos preparados para a identificação do marcador isovitexina feita com a co-injeção posterior do extrato de *Passiflora actinia* pode ser observado nas Figuras 30 e 31.

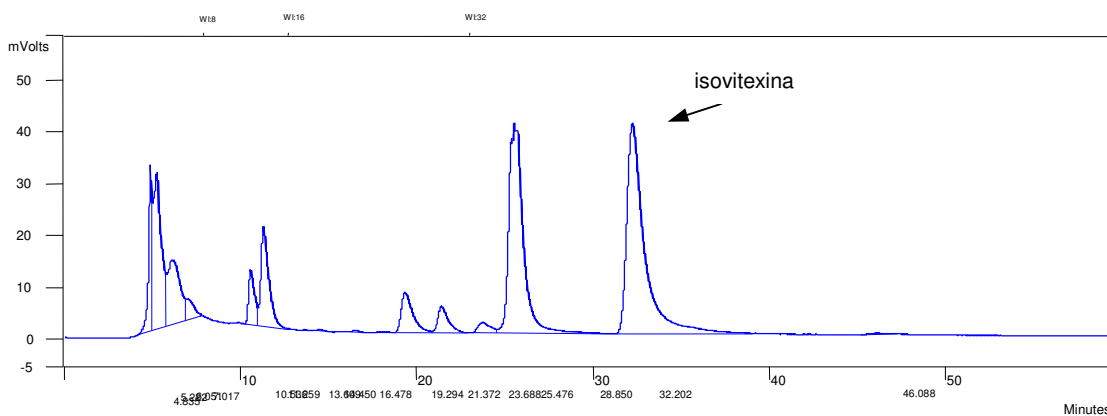


**Figura 29:** Perfil cromatográfico de extrato metanólico purificado de *Passiflora actinia* apresentando pico característico de isovitexina por CLAE.



**Figura 30:** Perfis cromatográficos de: A) fração hidrofílica, B) extrato liofilizado e C) extrato atomizado de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride apresentando os picos característicos de isovitexina e vitexina por CLAE.

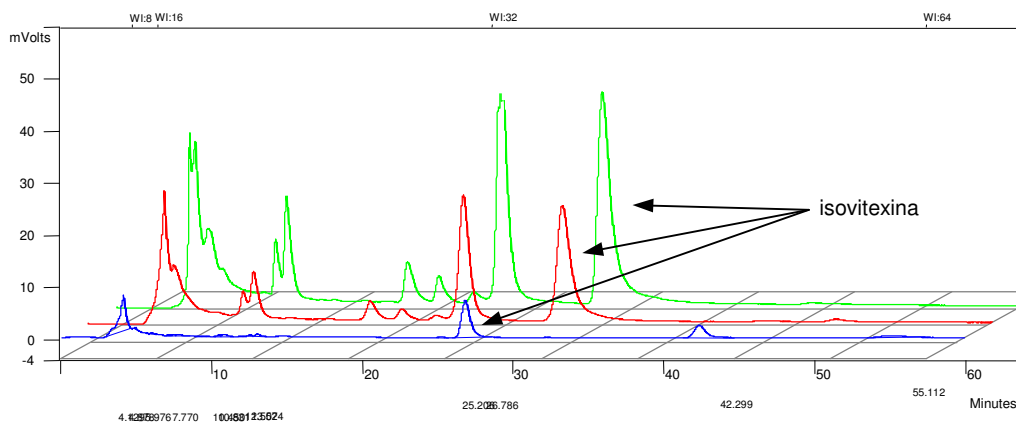




**Figura 31:** Cromatograma da co-injeção do EL de *B. microstachya* (Raddi) Macbride e extrato metanólico purificado de *P. actinia* mostrando a sobreposição dos picos de isovitexina por CLAE.

A confirmação de que o pico no tempo de retenção em torno de 30 min era da isovitexina só foi possível posteriormente após a co-injeção do padrão de isovitexina. A variação nos tempos de retenção dos picos das substâncias majoritárias ocorreu devido a diferenças nas variáveis não controladas do experimento, como a temperatura ambiente e evaporação da fase móvel utilizada, modificando as proporções iniciais da mesma, conforme pode ser observado na Figura 32.

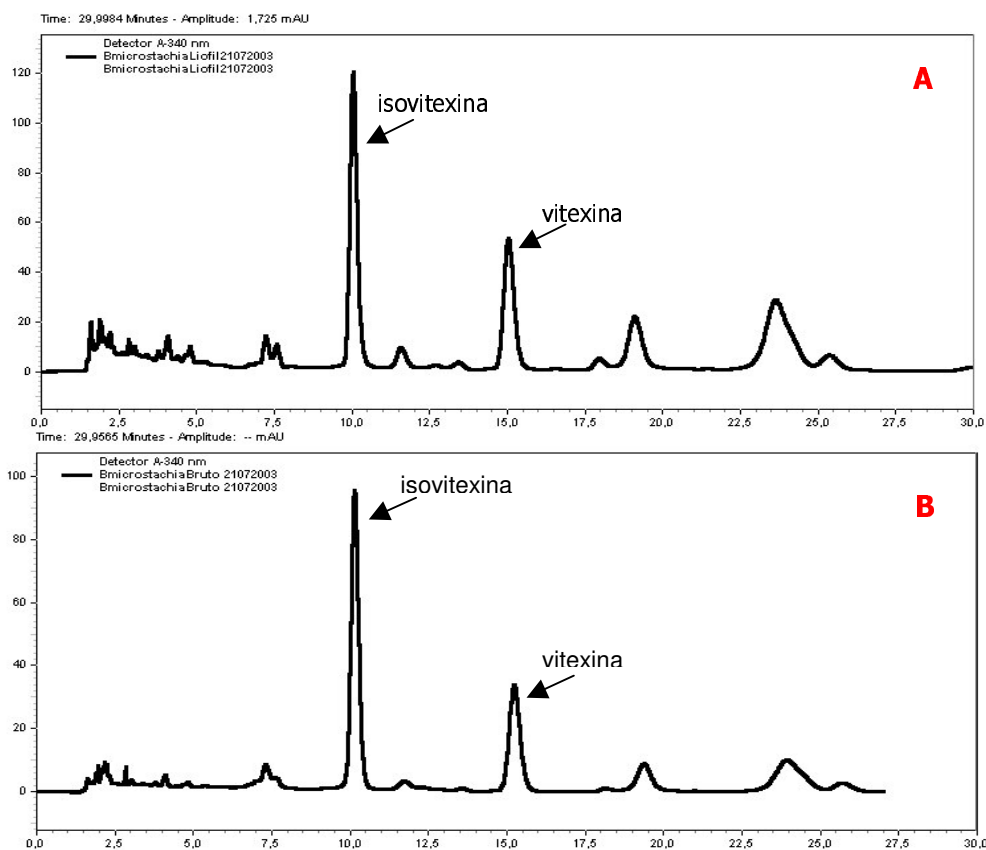
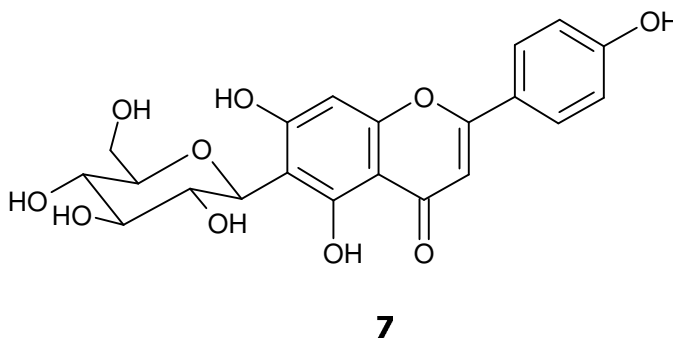
A abundância relativa da isovitexina no extrato metanólico purificado de *Passiflora actinia* foi de 44,6%. A fração hidrofílica apresentou 72,04% de abundância relativa de isovitexina e o ESD e EL apresentaram 67,68% e 45,91%, respectivamente, na análise preliminar. A abundância relativa é calculada de acordo com a proporção de área do pico da isovitexina com a área total dos picos que aparecem no respectivo cromatograma.



**Figura 32:** Cromatogramas de: ■ EL de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride; ■ extrato metanólico purificado de *Passiflora actinia* e ■ co-injeção dos extratos EL e da *P. actinia* mostrando a sobreposição dos picos de isovitexina.

Após isso, procedeu-se a co-injeção dos extratos com os padrões secundários de isovitexina e vitexina para a confirmação da identidade destes compostos, conforme Figura 33.

Os resultados apresentados sugerem que além dos flavonóides citados na literatura, constata-se pela primeira vez, a presença de isovitexina (**7**) nas folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride.



**Figura 33:** Perfil cromatográfico de: A) extrato hidroetanólico bruto de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride e B) EL, apresentando os picos de isovitexina e vitexina com co-injeção dos padrões por CLAE.

Elegeram-se então a isovitexina como substância marcadora para a *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, devido à sua presença majoritária no perfil cromatográfico dos extratos pesquisados preliminarmente, sendo, a partir de então, utilizada como referência para todos os testes posteriores.

### ***Doseamento da isovitexina presente nos extratos por meio de CLAE***

Uma vez comprovada a presença de flavonóides nos extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, procedeu-se o doseamento da isovitexina por CLAE. Inicialmente foi feita a curva de calibração do padrão de isovitexina Extrasynthese (França), nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/ml (Figura 34). Os extratos ESD e o EL, injetados em triplicata na diluição de 1:1000 apresentaram para o EL  $3,7044 \pm 1,2420$  µg e o ESD  $4,4190 \pm 0,409$  µg de isovitexina por 1 mg de extrato. No extrato metanólico de *Passiflora actinia*, encontrou-se o valor de  $25,5307 \pm 1,2575$  µg/mg.

Rehwald e colaboradores (1994b) observaram que a isovitexina é um dos flavonóides de concentração mais expressiva em amostras de *Passiflora incarnata*, apresentando  $0,00663 \pm 2,01$  µg/mg (n = 4), valor inferior aos encontrados aqui para *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride e também para o extrato testado de *Passiflora actinia*, o qual provavelmente teve o marcador concentrado pelo processo de purificação do extrato.

Calibration Curve Report  
File: c:\star\metodos\lilica1.mth  
Detector: ProStar/Dynamax System, Address: 24, Channel ID: 1

ISVT

External Standard Analysis

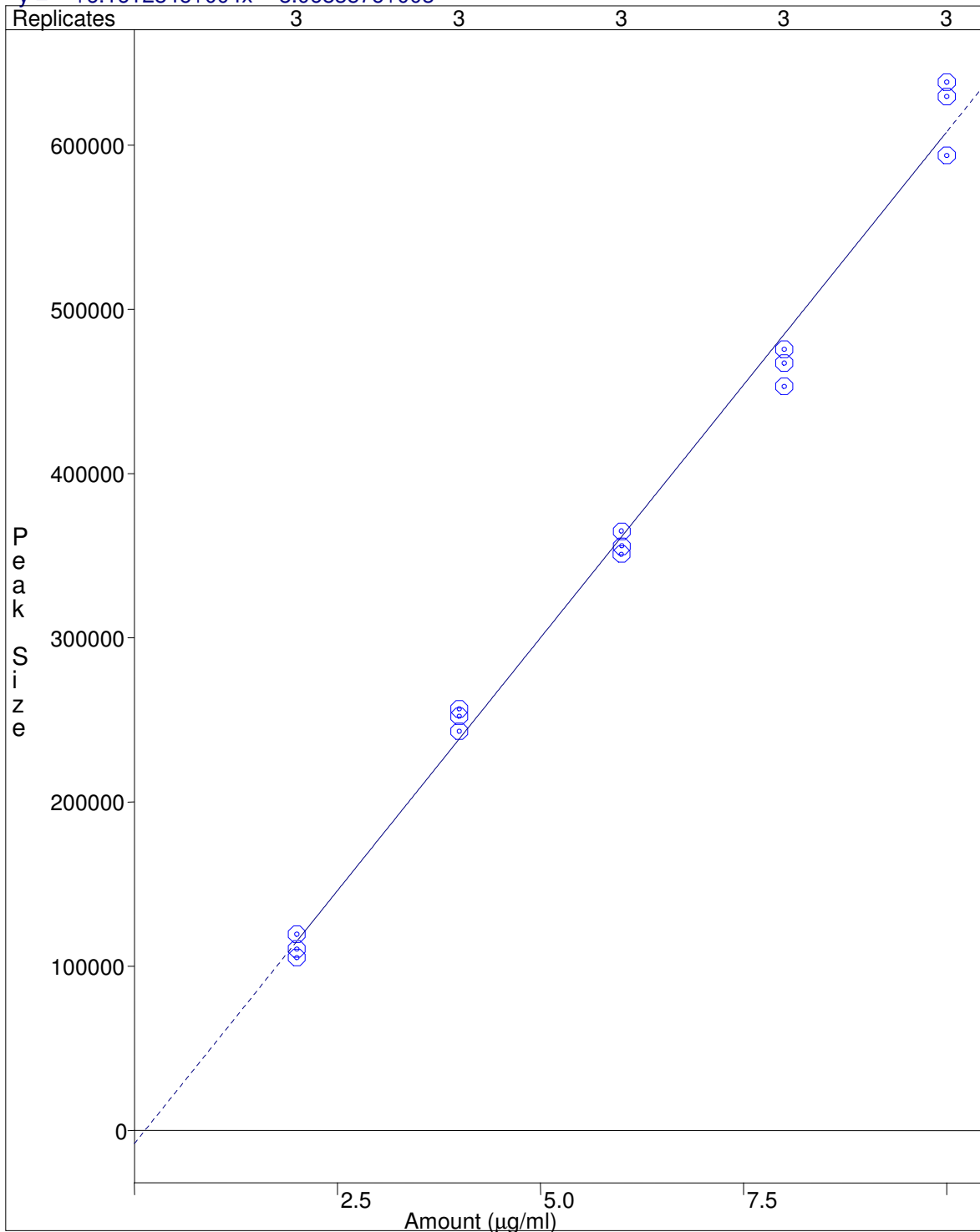
Resp. Fact. RSD: 4.700%

Curve Type: Linear

Coeff. Det.(r<sup>2</sup>): 0.991916

Origin: Ignore (Edited)

$$y = +6.161284e+004x - 8.068357e+003$$



**Figura 34:** Curva de calibração do padrão de isovitexina em CLAE nas concentrações de 2, 4, 6, 8 e 10 µg/ml (Coluna C-18, λ 340 nm, fluxo 0,5 ml/min, tempo de análise 40 min, n = 3).

## **Forma farmacêutica serum**

Um das formas farmacêuticas de uso tópico que vem sendo comumente empregada pela indústria cosmética e farmacêutica, é o *serum*, constituída de cerca de 15% de gel-base diluído em água e incorporado de ativos com diversas finalidades. Apresenta-se aparentemente como um gel fluido, com uma viscosidade inferior à dos géis, sendo característica dessa forma sua maior fluidez (Galena, 2003a; Galena, 2003b).

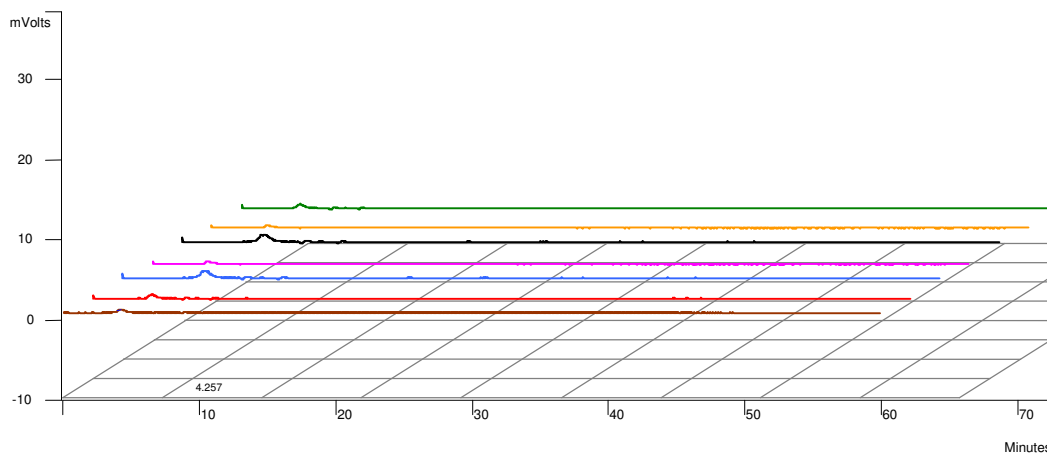
*Serum* de características sensoriais diferentes são obtidos com o uso de agentes poliméricos diversos. Para a preparação das formulações neste trabalho foram testados Natrosol 250 HHR<sup>®</sup>, Carbopol 934<sup>®</sup>, Carbopol 940<sup>®</sup>, Carbopol 2001<sup>®</sup>, Carbopol ETD 2020<sup>®</sup>, Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> e Pemulen TR2<sup>®</sup>, adicionados ou não de agente quelante (EDTA dissódico), o qual possui efeito sinérgico com o conservante (Phenova<sup>®</sup>) na preservação das formulações. Também foi testado a mistura do silicone DC 245<sup>®</sup> associado ao silicone DC 9040<sup>®</sup> para obtenção de *serum* de característica lipofílica.

Os extratos, tanto ESD quanto EL, foram adicionados nas formulações na quantidade correspondente a 10% de fração hidrofílica 1:1 (1,284 g de ESD e 0,726 g de EL, respectivamente, para cada 100 g de *serum*).

## **Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE das formulações de gel-base**

O perfil cromatográfico por CLAE das diferentes fórmulas de gel-base que seriam testadas para a produção do *serum* foi determinado, nas mesmas condições utilizadas nos extratos, para verificar se haveria presença de picos com tempos de retenção coincidentes. Para tanto, fez-se a análise de todas as formulações contendo EDTA dissódico, pois se a análise destas não mostrasse comprometimento cromatográfico, as formulações isentas de EDTA também não apresentariam.

A análise cromatográfica realizada demonstrou a ausência de picos na região de estudo (20 – 35min), conforme se nota na Figura 35. Até 10 min, percebem-se os picos característicos das formulações e, após esse tempo há ausência de quaisquer outros picos, mostrando não haver interferência dos componentes das formulações nas leituras cromatográficas posteriores à adição dos extratos.



**Figura 35:** Perfil cromatográfico das diversas fórmulas de gel-base testadas, com EDTA dissódico por CLAE onde: ■ formulação de gel-base Carbopol 2001; ■ formulação de gel-base Carbopol 934; ■ formulação de gel-base Natrosol; ■ formulação de gel-base Carbopol Ultrez 10; ■ formulação de gel-base Pemulen TR-2; ■ formulação de gel-base Carbopol ETD 2020 e ■ formulação de gel-base Carbopol 940.

## **Caracterização físico-química das formulações de serum selecionadas**

Durante o processo de produção dos *serum*, verificou-se a desestabilização de algumas formulações ocorrendo liquefação. As formulações liquefeitas foram descartadas devido à baixa viscosidade apresentada. As que apresentaram essa desestabilização foram as formulações contendo o agente quelante (EDTA dissódico) e as que continham Natrosol 250 HHR® e Pemulen TR2®. Ainda, nas formulações estáveis restantes, percebeu-se novamente a liquefação após a adição dos extratos, tanto para o EL quanto o ESD. Para contornar essa desestabilização, optou-se por aumentar a quantidade de agente geilificante, a qual passou de 15% para 30%. Mesmo assim, algumas formulações não mantiveram a viscosidade apropriada para *serum*, sendo descartadas. As que se apresentaram estáveis foram as de Carbopol® 934, 940, 2001, ETD 2020 e Ultrez 10. A formulação de *serum* com silicone apresentou incompatibilidade com o extrato, não sendo possível a homogeneização dos mesmos pela separação de fases, sendo esta formulação também descartada.

De forma geral, os *serum* adicionados de extratos apresentaram coloração caramelo e odor adocicado, característico dos extratos. Os *serum* adicionados de EL apresentaram-se límpidos enquanto os adicionados de ESD apresentaram-se turvos, devido à presença do Aerosil®. Os resultados obtidos para os ensaios de pH, densidade, viscosidade e espalhabilidade das formulações selecionadas antes e após a incorporação dos extratos ESD e EL estão na Tabela 1.

**Tabela 1:** Avaliação físico-química das formulações de *serum* selecionadas contendo ou não (\*) extratos ESD e EL de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride: pH, densidade, viscosidade e espalhabilidade (n = 3).

<i>Serum</i>	pH*	pH	Densidade (g/ml)*	Densidade (g/ml)	Viscosidade (cP)*	Viscosidade (cP)	Espalhabilidade (cm <sup>2</sup> )*	Espalhabilidade (cm <sup>2</sup> )
Carbopol 934 <sup>®</sup> - ESD	6,58 ± 0,01	6,81 ± 0,02	1,0003 ± 0,0006	1,0298 ± 0,0004	4.538 ± 3,2618	811,6333 ± 1,4468	19,6344 ± 0,2148	22,6208 ± 0,2437
Carbopol 934 <sup>®</sup> - EL		6,51 ± 0,01		1,0298 ± 0,0008		66,3000 ± 0,3464		24,7773 ± 0,2550
Carbopol 940 <sup>®</sup> - ESD	6,80 ± 0,02	6,50 ± 0,01	1,0007 ± 0,003	1,0308 ± 0,0003	6.218 ± 4,1003	1.549,0000 ± 4,0000	19,2436 ± 0,2302	25,2217 ± 0,5124
Carbopol 940 <sup>®</sup> - EL		6,50 ± 0,02		1,0303 ± 0,0006		251,6000 ± 1,7521		23,6162 ± 0,4988
Carbopol 2001 <sup>®</sup> - ESD	6,98 ± 0,02	6,58 ± 0,03	1,0017 ± 0,0005	1,0306 ± 0,0004	6.148 ± 2,1132	113,3000 ± 0,9539	18,0950 ± 0,3114	42,8153 ± 0,3344
Carbopol 2001 <sup>®</sup> - EL		6,50 ± 0,02		1,0218 ± 0,0006		111,1000 ± 1,1000		30,0290 ± 0,2800
Carbopol Ultrez 10 <sup>®</sup> - ESD	6,50 ± 0,02	6,52 ± 0,01	1,0024 ± 0,0008	1,0310 ± 0,0005	5.752 ± 4,2106	101,5333 ± 0,6506	16,6185 ± 0,1987	27,8063 ± 0,4673
Carbopol Ultrez 10 <sup>®</sup> - EL		6,95 ± 0,02		1,0300 ± 0,0004		96,3000 ± 1,4106		46,7685 ± 35,0289
Carbopol ETD 2020 <sup>®</sup> - ESD	6,69 ± 0,01	6,51 ± 0,03	1,0014 ± 0,0003	1,0318 ± 0,0003	4.177 ± 3,8496	1.247,3330 ± 4,0414	17,7200 ± 0,1824	24,0476 ± 25,0533
Carbopol ETD 2020 <sup>®</sup> - EL		6,56 ± 0,02		1,0313 ± 0,0004		231,4333 ± 2,1385		23,7596 ± 43,1971

O pH das formulações foi mantido dentro da faixa estipulada (6,5 – 7,0), correspondente ao pH de estabilidade dos polímeros carboxivinílicos e adequados para uso tópico.

Após a adição dos extratos, percebe-se o aumento da densidade e a diminuição da viscosidade com conseqüente incremento na espalhabilidade das formulações. Nota-se que a viscosidade deste tipo de formulação costuma ser inferior àquelas apresentadas por géis-base comuns, como o valor apresentado pelo gel de Carbopol 940<sup>®</sup> com extrato fluido de *Casearia silvestris*, 47.259,45 cP a 0,27 rpm e 1.357,40 cP a 40,5 rpm (Sato, 1998), assemelhando-se às viscosidades de xaropes, como o valor encontrado por Lubi (2002) para xarope de Natrosol 250 HHR<sup>®</sup> com extrato fluido de guaco (*Mikania glomerata*) de 105,0 cP a 90 rpm. Dependendo do tipo de polímero utilizado, notaram-se diferenças de viscosidade, sendo os valores mais elevados apresentados pelos *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup>, 940<sup>®</sup> e EDT 2020<sup>®</sup>, adicionados de ESD. Também se notou diferença na viscosidade quanto ao tipo de extrato adicionado, onde os *serum* adicionados de ESD possuem viscosidade mais elevada que aqueles adicionados de EL, provavelmente devido à presença de Aerosil<sup>®</sup> naqueles.

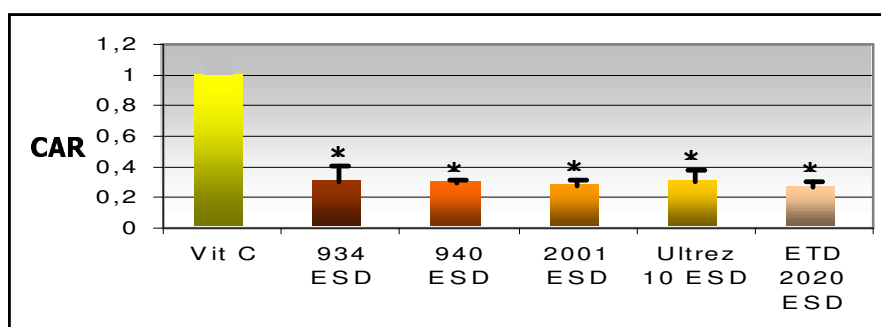
O elevado grau de espalhabilidade nas formulações, entre 22,6208 a 46,7685 cm<sup>2</sup>, confirma o aspecto econômico da formulação, quando em comparação com dados encontrados por Arantes (2002) onde o dentifríco em gel de CMC com PEG 6000 contendo extratos de *Calendula officinalis* e *Casearia silvestris* apresentou 0,1281 ± 0,04 cm<sup>2</sup> de espalhabilidade, confirmando que pequenas quantidades do *serum* são capazes de cobrir grande extensão de pele.

### ***Determinação da capacidade antioxidante dos serum com extratos das folhas de Bauhinia microstachya (Raddi) Macbride pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico***

Após a verificação e comprovação da capacidade antioxidante dos extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, foi necessário testar se a mesma se mantinha após a incorporação nas formulações de *serum*, com a finalidade de verificar se os componentes não influenciavam a capacidade antioxidante dos extratos. As análises foram conduzidas utilizando o método da redução do complexo fosfomolibdênico por este ser um método mais barato, uma vez que os resultados obtidos pelos extratos nos três métodos foram praticamente semelhantes.



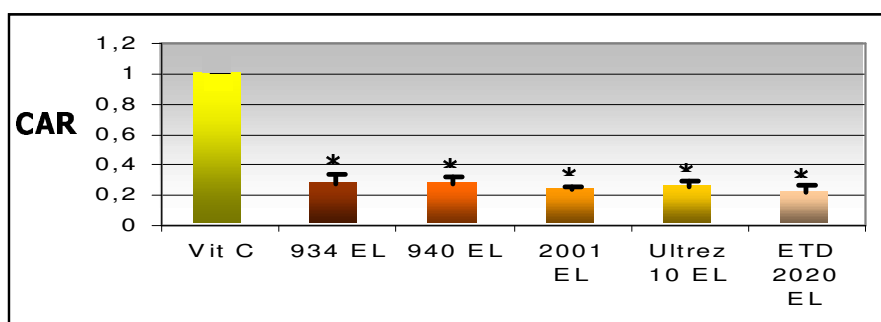
As Figuras 36 e 37, demonstram os resultados obtidos para os *serum* adicionados de ESD e de EL, respectivamente. A análise estatística revelou uma diferença significativa entre os valores encontrados de CAR entre a vitamina C e os *serum* acrescidos de ESD (Figura 36). Os *serum* que apresentaram maior capacidade antioxidante foram o de Carbopol 934<sup>®</sup> ( $0,307 \pm 0,0965$ ) e o Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> ( $0,307 \pm 0,0687$ ), seguidos do Carbopol 940<sup>®</sup> ( $0,296 \pm 0,0147$ ), Carbopol 2001<sup>®</sup> ( $0,279 \pm 0,0316$ ) e Carbopol ETD 2020<sup>®</sup> ( $0,266 \pm 0,0419$ ). Enquanto entre as atividades dos *serum* contendo ESD, não houve diferença significativa.



\*diferença significativa com relação à vitamina C para  $p \leq 0,005$ .

**Figura 36:** Comparação das capacidades antioxidantes relativas dos *serum* adicionados de ESD e da vitamina C (200 µg/ml) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

A análise estatística dos resultados mostra diferença significativa entre os valores encontrados dos *serum* acrescidos de EL e da vitamina C a 200 µg/ml (Figura 37). O *serum* que apresentou maior atividade foi o de Carbopol 934<sup>®</sup> ( $0,278 \pm 0,0607$ ) seguido do Carbopol 940<sup>®</sup> ( $0,274 \pm 0,0425$ ), Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> ( $0,257 \pm 0,0403$ ), Carbopol 2001<sup>®</sup> ( $0,238 \pm 0,0228$ ) e Carbopol ETD 2020<sup>®</sup> ( $0,222 \pm 0,0464$ ). Entre os *serum* contendo EL não houve diferença significativa nas capacidades antioxidantes relativas.

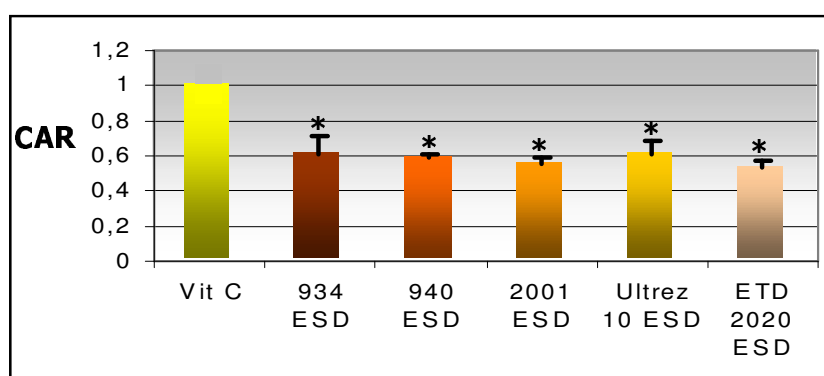


\*diferença significativa com relação à vitamina C para  $p \leq 0,005$ .

**Figura 37:** Comparação das capacidades antioxidantes relativas dos *serum* adicionados de EL e da vitamina C (200 µg/ml) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

Os ensaios acima foram realizados utilizando a mesma concentração de vitamina C descrita no método, como para os extratos. No entanto, para averiguar a atividade antioxidante real das formulações, os testes foram repetidos utilizando-se como referência vitamina C na mesma concentração dos extratos no *serum*.

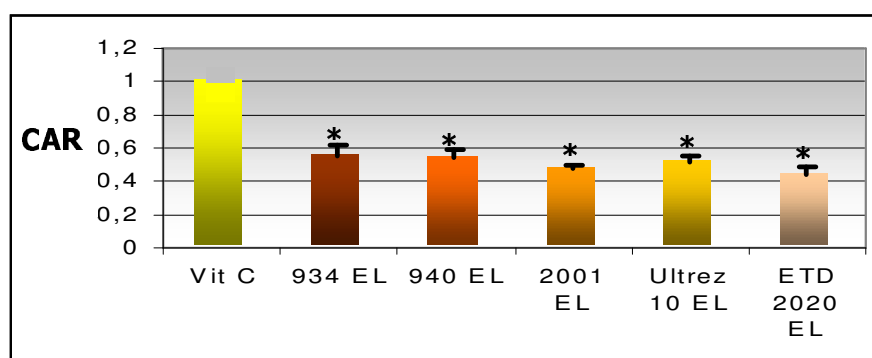
Os resultados obtidos nesta análise revelaram o mesmo comportamento para todos os *serum* adicionados de ESD quando comparados aos resultados obtidos com a vitamina C na concentração de 200 µg/ml (Figura 38). Os valores correspondentes às capacidades relativas dos extratos aumentaram proporcionalmente à diminuição da concentração de vitamina C. Nota-se ainda, que houve diferença significativa entre as capacidades antioxidantes relativas dos *serum* acrescidos de ESD e da vitamina C. Os *serum* que apresentaram maior capacidade antioxidante foram o de Carbopol 934<sup>®</sup> (0,612 ± 0,0965) e o Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> (0,612 ± 0,0687), seguidos do Carbopol 940<sup>®</sup> (0,590 ± 0,0147), Carbopol 2001<sup>®</sup> (0,556 ± 0,0316) e Carbopol ETD 2020<sup>®</sup> (0,531 ± 0,0419). Como descrito para os *serum* comparados à vitamina C a 200 µg/ml, neste caso também não houve diferença significativa entre as capacidades dos *serum* contendo ESD.



**Figura 38:** Comparação das capacidades antioxidantes relativas dos *serum* adicionados de ESD e da vitamina C (utilizada na mesma concentração do extrato) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. \*diferença significativa com relação à vitamina C para  $p \leq 0,005$ .

Como discutido para os *serum* contendo ESD, também houve o mesmo comportamento para todos os *serum* adicionados de EL, quando comparados aos resultados obtidos com a vitamina C, na concentração de 200 µg/ml. Os valores correspondentes às atividades relativas dos extratos aumentaram proporcionalmente à diminuição da concentração de vitamina C. Desta forma, nota-se, estatisticamente, que houve diferença significativa entre as atividades antioxidantes relativas dos *serum*

acrescidos de EL e da vitamina C (Figura 39). O *serum* que apresentou maior capacidade antioxidante foi o de Carbopol 934<sup>®</sup> (0,554 ± 0,0607), seguido do Carbopol 940<sup>®</sup> (0,546 ± 0,0425), Carbopol Ultrez 10<sup>®</sup> (0,511 ± 0,0403), Carbopol 2001<sup>®</sup> (0,475 ± 0,0228) e Carbopol ETD 2020<sup>®</sup> (0,442 ± 0,464).



**Figura 39:** Comparação das capacidades antioxidantes relativas dos *serum* adicionados de EL e da vitamina C (utilizada na mesma concentração do extrato) investigados pelo método de redução do complexo fosfomolibdênico. Cada coluna representa a média de três experimentos independentes ± desvio padrão. \*diferença significativa com relação à vitamina C para  $p \leq 0,005$ .

Percebe-se, em todas as análises realizadas, a maior capacidade antioxidante apresentada pelo *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup>, tanto aquele contendo ESD quanto EL, sendo a formulação eleita para os testes posteriores de permeação cutânea *in vitro*. Os outros *serum* também apresentaram capacidade antioxidante, o que confirma que os componentes das formulações não interferem na capacidade antioxidante dos extratos.

## ***Permeação cutânea***

A pele é uma biomembrana multilamelar, com certas propriedades absorptivas. Se a pele fosse uma membrana simples, os parâmetros de absorção poderiam ser facilmente medidos e seria razoavelmente constante devido à ausência de mudanças químicas. Entretanto, é um tecido vivo dinâmico e seus parâmetros de absorção são susceptíveis a mudanças contínuas tornando o processo de permeação cutânea um processo biológico complexo (Wester e Maibach, 1994; Yamashita e Hashida, 2003). Por décadas ela foi considerada uma barreira impermeável para a absorção de produtos aplicados topicamente. Em comparação com a maioria dos outros tecidos, a pele é apenas levemente permeável. Quase todas as substâncias têm a propriedade de penetrar a pele

em algum grau e então serem capazes de difundir para a epiderme e derme e atingir os vasos sanguíneos e linfáticos. Esse grau de absorção dependerá das propriedades físico-químicas da substância a ser permeada (em geral, compostos que penetram mais rapidamente e profundamente são moléculas pequenas e não polares) e da composição do veículo (Marty e Wepierre, 1994; Yamashita e Hashida, 2003), sendo este último um fator crítico (Mollgaard e Hoelgaard, 1983; Schulz et al., 2002).

Existem duas rotas de difusão para que as moléculas penetrem a pele: uma é a dos apêndices e a outra é a epidérmica (Yamashita e Hashida, 2003). Enquanto os apêndices possuem uma área de superfície limitada (cerca de 0,1% do total), há relatos que de que a rota dos apêndices implique como o maior contribuidor para a fase inicial da permeação cutânea. Para íons e compostos polares, a contribuição da rota dos apêndices tem sido considerada relativamente alta. Estudos em animais sem pêlo sugerem uma significativa importância para a rota transfolicular.

A maioria dos fármacos permeia através da epiderme. A rota da penetração através do estrato córneo pode ser geometricamente dividido em rota transcelular e intercelular. Contudo, o caminho tortuoso intercelular tem sido creditado como principal rota para a permeação de fármacos. Os fármacos após penetração através do estrato córneo, difundem-se pela epiderme e derme e são removidos pela microvascularização cutânea (Yamashita e Hashida, 2003).

Já foi claramente demonstrado que a formulação de uma preparação dermatológica pode modificar apreciavelmente a penetração do componente ativo pela mudança na sua proporção de liberação e biodisponibilidade e/ou pela modificação da estrutura da pele. Quando uma formulação é aplicada sobre a pele, há evaporação dos componentes voláteis da mesma. Como consequência, a estrutura e composição da formulação originalmente aplicada na pele muda e somente material não volátil persiste no tegumento. Este fenômeno pode ter efeitos importantes na liberação do ativo incorporado na fórmula original e a subsequente absorção cutânea ocorre pela mudança:

- da viscosidade do produto e da difusibilidade do permeante (substância que atravessa a pele);
- do coeficiente de partição do ativo entre a camada córnea e o veículo residual; e
- da atividade termodinâmica do permeante pelo aumento de sua concentração até a saturação (Marty e Wepierre, 1994).

## *Liberção do marcador pela formulação de serum escolhida*

O alvo da capacidade antioxidante dos extratos encontra-se nas partes mais profundas da epiderme e derme, onde estão presentes os fibroblastos, células responsáveis pela produção de colágeno, elastina e substância amorfa, os quais dão sustentação à pele. Os fibroblastos estão sujeitos à ação de radicais livres que, em excesso, levam ao estresse oxidativo, causando o envelhecimento precoce da pele (Dumont et al., 2000; Ma et al., 2001; Hütter et al., 2002; Rittié e Fisher, 2002).

Após a verificação da manutenção da capacidade antioxidante das formulações de *serum* adicionados de ESD e de EL, o passo seguinte foi a análise da liberação do marcador (isovitexina) pelo *serum* por meio do ensaio de permeação cutânea *in vitro*. A formulação a base de Carbopol 934<sup>®</sup> contendo os dois tipos de extratos foi utilizada no experimento utilizando a célula de difusão baseada no modelo de Franz modificada (Figura 14) usualmente empregada em estudos de permeação *in vitro* de produto tópicos. A temperatura foi mantida constante (37 °C) e agitação magnética suficientemente vigorosa para permitir a difusão uniforme na interface da membrana, evitando a obtenção de concentrações localizadas de marcador (Bentley, 1994).

A eleição de uma solução receptora para os experimentos *in vitro* depende da solubilidade da substância ativa. Como os extratos são solúveis em água, as soluções receptoras mais indicadas são soluções tampão isotônicas com valores de pH em torno de 7,4 e manutenção das condições necessárias para a permeação (*sink conditions*<sup>2</sup>), para garantir a obtenção de resultados efetivos (Wester e Maibach, 1989).

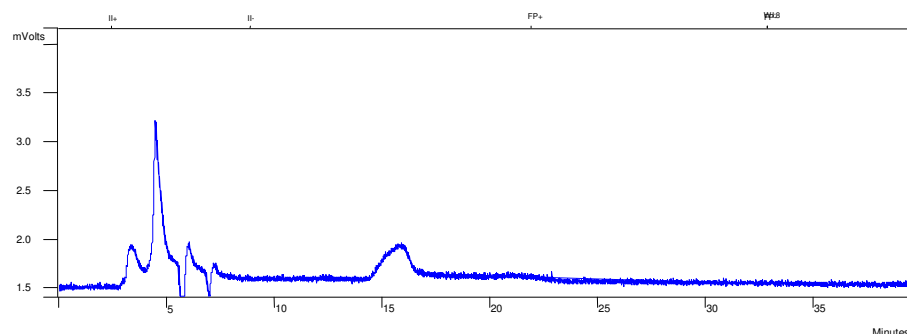
Foi realizado a análise do perfil cromatográfico da solução tampão para a verificação da presença de picos interferentes com o perfil cromatográfico dos extratos na faixa de detecção da isovitexina (20-35 min). O resultado obtido (Figura 40) confirmou a ausência de interferentes.

A membrana é outro fator crítico na realização dos ensaios de permeação *in vitro*. Membranas naturais devem ser sempre o de primeira escolha, sendo a pele humana a mais adequada. Entretanto, a dificuldade na sua obtenção e a variação biológica levam ao emprego de pele de animais. A pele de orelha de porco tem sido muito utilizada nos experimentos *in vitro* devido à viabilidade de aquisição, melhor uniformidade das amostras e facilidade de dissecação e separação do tecido subcutâneo, apesar de

---

<sup>2</sup> A atividade termodinâmica do fármaco na solução receptora não deve exceder 10% de sua solubilidade de saturação para ser garantida uma permeação favorável.

apresentar algumas diferenças anatômicas quando comparadas à pele humana, sendo eleita como modelo de membrana para os estudos de permeação (Bentley, 1994).



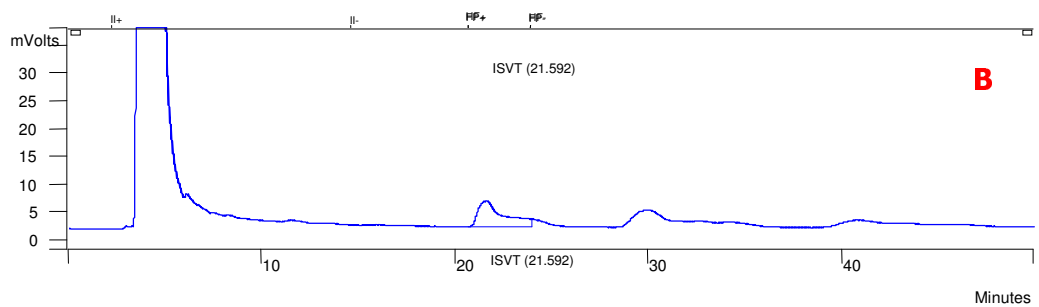
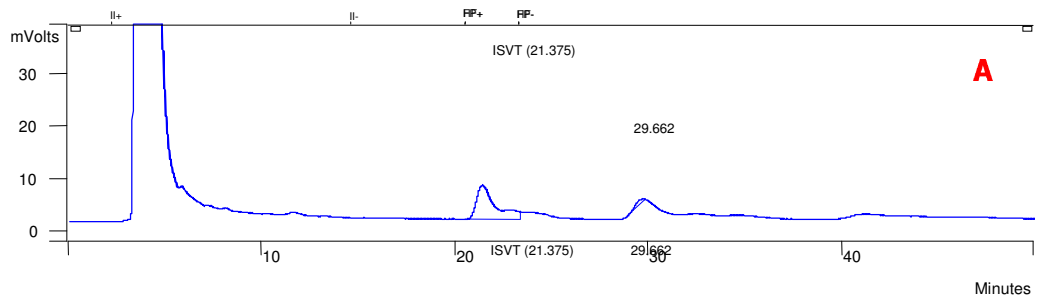
**Figura 40:** Perfil cromatográfico da solução receptora (tampão fosfato pH 7,4) utilizada nos ensaios de permeação cutânea *in vitro*, mostrando os picos característicos até 16 min e a ausência de picos na região de interesse (20 a 30 min) por CLAE.

A base dos experimentos *in vitro* de permeação cutânea é determinar as pequenas quantidades de ativo que atravessam a membrana ou que ficam retidos na mesma. A utilização de um método analítico sensível que viabilizasse o ensaio foi de extrema importância, onde a CLAE mostrou-se altamente eficaz ao detectar quantidades mínimas do marcador.

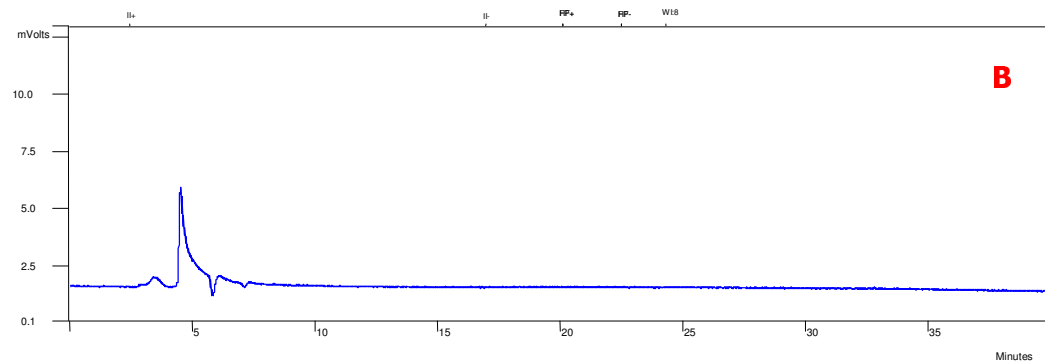
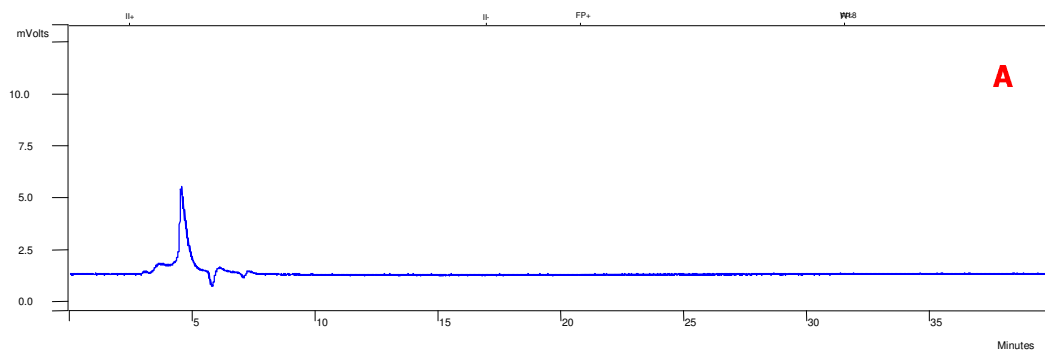
Para quantificar a isovitexina liberada foi utilizada a curva elaborada anteriormente (Figura 34) e a quantidade do marcador no *serum* foi determinada nas amostras antes da permeação (Figura 41).

Os resultados mostraram que *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> com ESD e com EL, continham  $14,6806 \pm 0,0346 \mu\text{g/g}$  e  $14,6773 \pm 0,0487 \mu\text{g/g}$  de isovitexina, respectivamente.

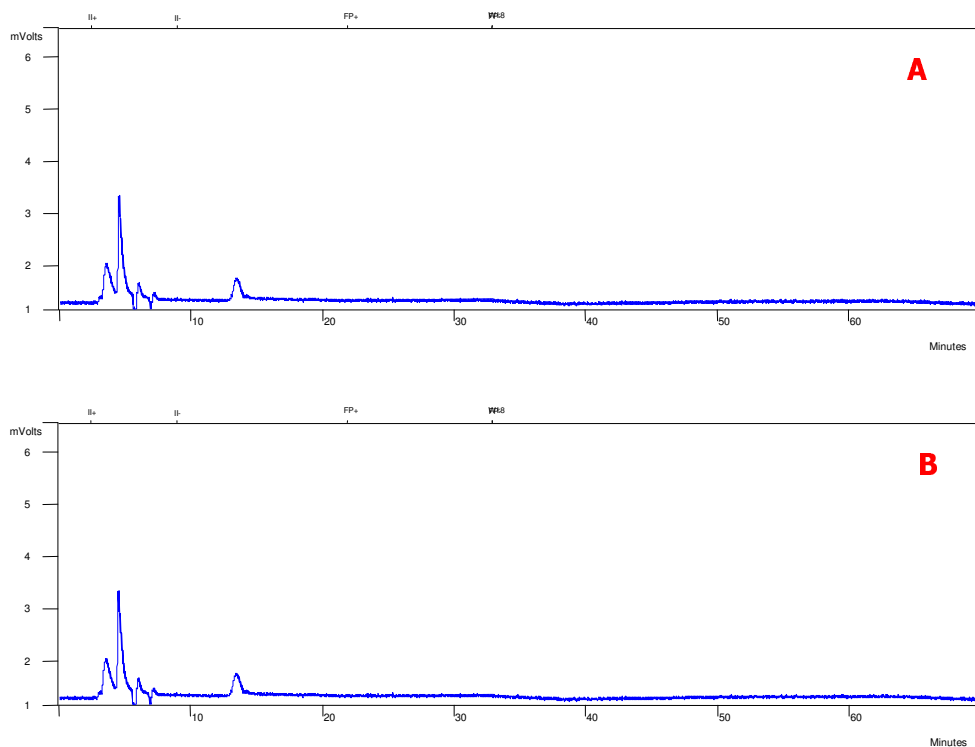
Conhecida a quantidade do marcador nas formulações com os extratos ESD e EL, o que se esperava era que alguma quantidade do marcador fosse encontrada na solução receptora no ensaio de liberação *in vitro*. No entanto, a análise quantitativa das amostras coletadas após 12 h e 24 h do ensaio, revelou a ausência do marcador na solução receptora, mostrando que não houve a difusão do mesmo, conforme observado nos cromatogramas das Figuras 42 e 43.



**Figura 41:** Perfil cromatográfico dos *serum* de Carbopol 934<sup>™</sup> adicionados de (A) ESD e (B) EL antes do ensaio de liberação *in vitro*.



**Figura 42:** Cromatogramas das amostras após (A) 12 h e (B) 24 h do teste de liberação *in vitro* com *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> contendo ESD, mostrando apenas os picos característicos da solução receptora por CLAE.

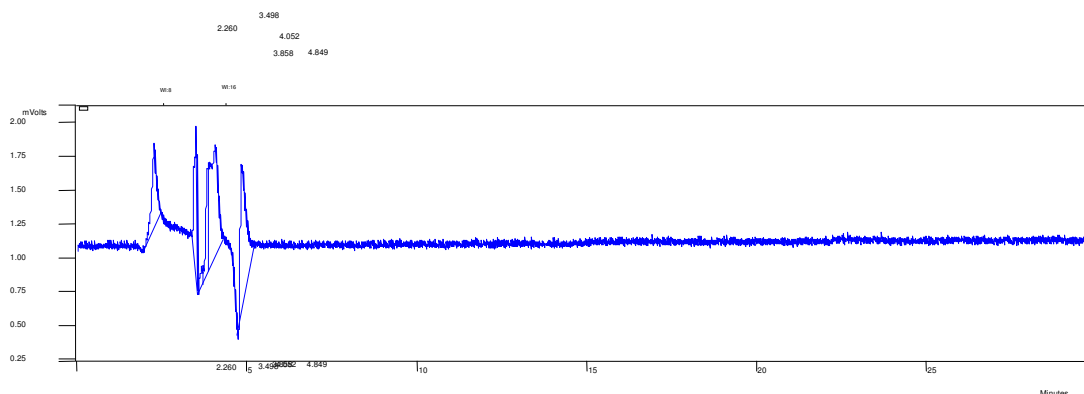


**Figura 43:** Cromatogramas das amostras após (A) 12 h e (B) 24 h do teste de liberação *in vitro* com *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> contendo EL, mostrando apenas os picos característicos da solução receptora por CLAE.

Com este resultado, os flavonóides da formulação, representados pelo marcador isovitexina, poderiam estar retidos na membrana utilizada (pele de porco) ou na própria formulação. No caso da primeira hipótese ser verdadeira, seria ainda um resultado interessante, pois ele teria atingido a epiderme, podendo-se dizer que o mesmo atingiria seu local de ação, fazendo a captação dos radicais livres *in situ* (Simon et al., 1981; Ma et al., 2001).

Assim, a membrana utilizada nos ensaios foi triturada, extraída com a mesma fase móvel utilizada nas análises por CLAE (isopropanol:tetrahidrofurano:água - 5:15:85) e a solução resultante foi submetida a análise cromatográfica. Novamente, o resultado foi a ausência dos constituintes do extrato na membrana utilizada. A Figura 44 mostra o cromatograma encontrado para a solução obtida da pele utilizada no ensaio de permeação cutânea *in vitro* do *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> com ESD. O mesmo perfil foi encontrado para a solução de extração obtida da pele utilizada no experimento com o *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> com EL.





**Figura 44:** Cromatograma da solução obtida da membrana utilizada no experimento da permeação cutânea *in vitro* do *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> com ESD, mostrando os picos característicos da mesma até 5 min e ausência do pico do marcador por CLAE.

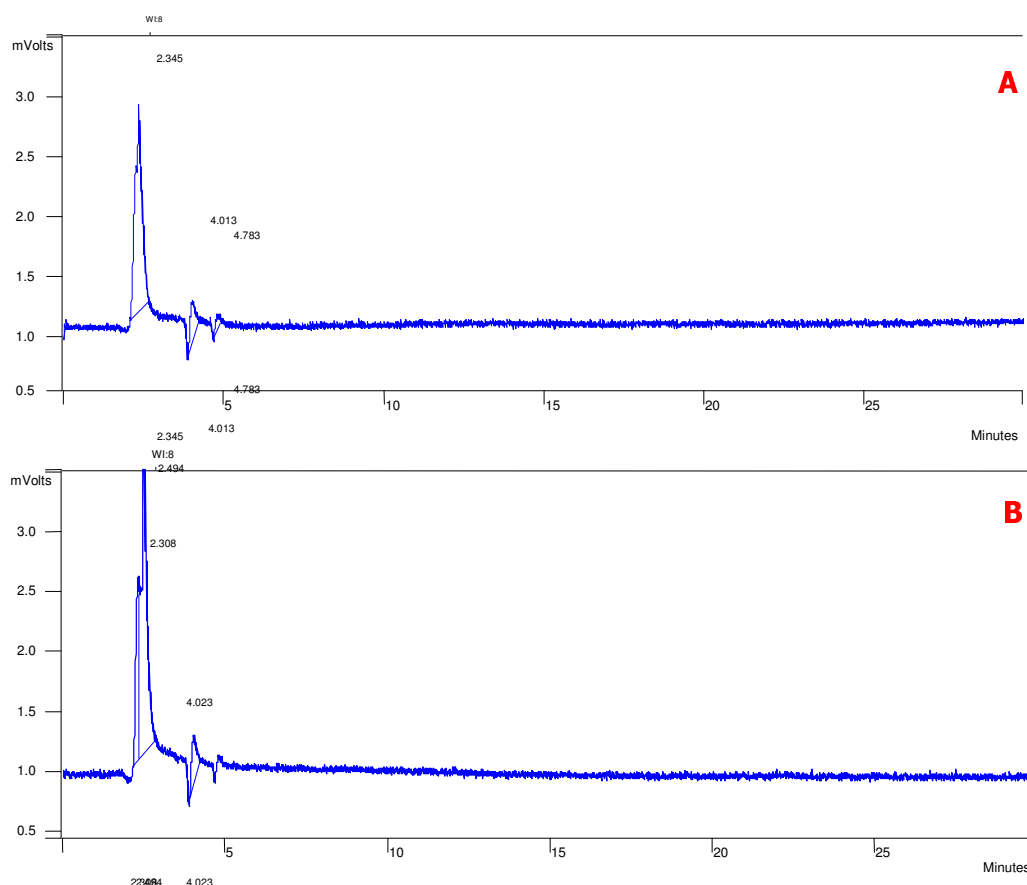
A ausência do marcador tanto na solução receptora quanto na membrana, sugeriu a não liberação do mesmo pela formulação de *serum*. Para se certificar disso, foi realizado novo doseamento nas formulações de *serum* após o término dos experimentos, cujos resultados demonstraram a mesma quantidade de marcador da formulação antes do início do ensaio.

Os resultados encontrados demonstram que, por serem os extratos hidrossolúveis, provavelmente devem possuir maior afinidade pela formulação de *serum*, de característica hidrofílica. Outro fator que influencia a permeação é o tamanho da substância permeante; sabe-se que moléculas grandes não permeiam a pele (Marty e Wepierre, 1994; Yamashita e Hashida, 2003), o que pode ter contribuído também no resultado. A isovitexina, por exemplo, é um flavonóide C-glicosilado, cujo tamanho da molécula talvez não permita sua permeação através da pele.

O *serum* escolhido não possuía componentes facilitadores de permeação, como por exemplo dimetilsulfóxido, ácido linoléico, propilenoglicol e uréia (Bentley, 1994; Marty e Wepierre, 1994; Santos e Bahia, 1995; Idson e Lazarus, 2001). Deste modo, aumentou-se a concentração de propilenoglicol de 5% para 10%. A escolha do propilenoglicol foi devido a este fazer parte da formulação e não influenciaria na detecção do marcador isovitexina por CLAE.

Por esta ser uma análise apenas qualitativa para verificar se esse aumento de propilenoglicol iria auxiliar na permeação, e por problemas técnicos, a análise cromatográfica em CLAE foi realizada em uma coluna C-8, tendo-se tomado o cuidado de verificar previamente o tempo de retenção da isovitexina (aprox. 13,4 min). No entanto, novamente os resultados nos ensaios demonstraram a ausência de componentes dos

extratos, incluindo o marcador, após 36 horas. Com este resultado, haveria a possibilidade de que essas substâncias estivessem retidas na membrana, tendo então sido triturada a mesma, extraída com o mesmo solvente e, novamente após análise cromatográfica o resultado mostrou que a membrana, da mesma forma, não reteve qualquer substância (Figura 45).

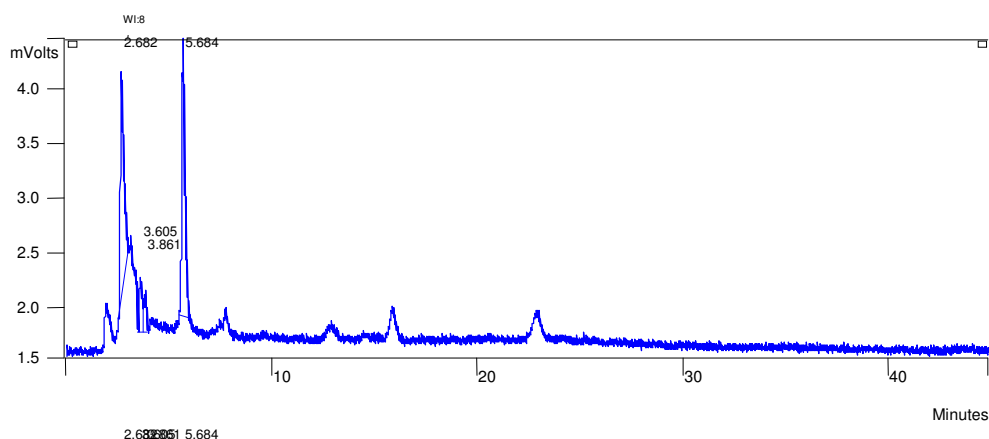


**Figura 45:** Cromatogramas das soluções obtidas das membranas utilizadas no teste de liberação *in vitro* de (A) EL e (B) ESD, mostrando ausência de picos característicos dos extratos por CLAE após incremento da concentração do propilenoglicol para 10% no *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup>.

Uma substância pode permear a pele caso ela possua certa propriedade de partição óleo/água, devido às características da mesma (Marty e Wepierre, 1994). Nesse caso, alterar a característica hidrofílica do extrato por meio da acetilação tornando-a mais lipofílica poderia ser uma alternativa. Nos últimos anos diversos compostos com radicais acil na porção glicona da molécula têm sido isolados com frequência de extratos de plantas com reconhecida atividade biológica. Acredita-se que a acetilação aumenta o grau de permeabilidade devido ao aumento da lipofilicidade da substância (Santos, 1998). Dessa forma, parte do extrato EL, por não conter nenhum excipiente, foi submetido à

acetilação com piridina e anidrido acético e o produto incorporado na mesma concentração nas formulações base de *serum* de Carbopol 934®.

Efetuuou-se nova análise do perfil cromatográfico do extrato acetilado (EA) (Figura 46) para poder avaliar se alguma substância nas formulações, nessas novas condições, pudessem permear a membrana no ensaio.



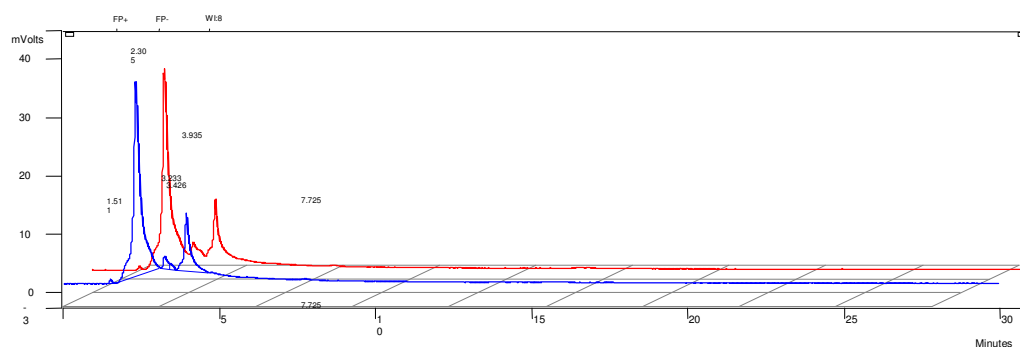
**Figura 46:** Perfil cromatográfico do extrato acetilado de folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, em coluna C-8 por CLAE.

Concomitantemente, foi também preparado uma nova formulação base de caráter mais lipofílico, aumentando a concentração do agente gelificante das formulações de *serum* de Pemulen TR2® (30% de gel-base, 10% propilenoglicol, ESD, EL ou EA e água destilada) e solubilizando os extratos em propilenoglicol e não em água como anteriormente.

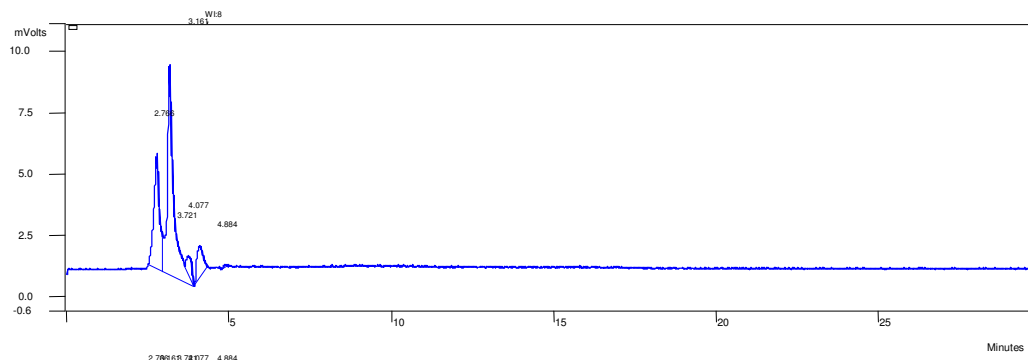
Para verificar se as novas formulações de *serum* contendo extratos acetilados mantinham o potencial antioxidante, este foi analisado pelo método da redução do complexo fosfomolibdênico, utilizando-se a substância de referência vitamina C na mesma concentração dos extratos. Os resultados obtidos confirmaram a capacidade antioxidante das formulações, mas com um valor menor para aquele contendo extrato acetilado. Os valores de CAR apresentados pelos *serum* foram os seguintes:  $0,563 \pm 0,0185$  para o de Pemulen TR2® com ESD,  $0,471 \pm 0,014$  para o de Pemulen TR2® com EL,  $0,255 \pm 0,0381$  para o de Pemulen TR2® com EA e  $0,225 \pm 0,0075$  para o de Carbopol 934® com EA. Essa diminuição da capacidade antioxidante pode ter sido devido ao aumento do peso molecular das substâncias ativas, diminuindo-se a concentração das substâncias ativas na amostra analisada.

Os experimentos de liberação *in vitro* foram então realizados com as novas formulações, com um tempo de leitura após 12 h do início do experimento. Novamente

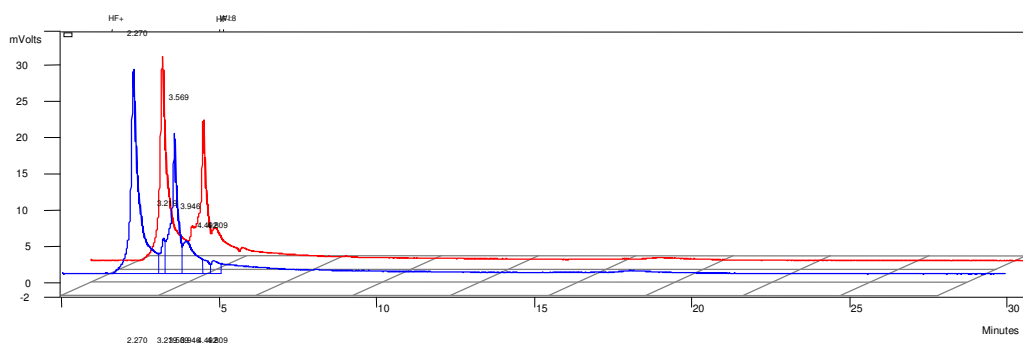
não houve liberação dos ativos do extrato pelas formulações como era esperado que liberasse, mostrando que a mudança das características hidrofílica/lipofílica das formulações e seus ativos não alterou o resultado. As Figuras 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 e 54 mostram os cromatogramas das formulações de *serum* no início e no final do experimento (12 h) e também os cromatogramas das soluções receptoras.



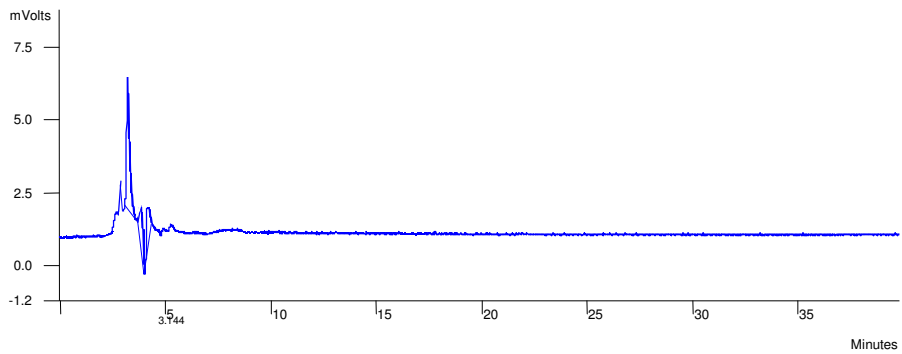
**Figura 47:** Cromatogramas da formulação de *serum* Carbopol 934<sup>™</sup> com EA, (■) antes e (■) após 12h do teste de liberação *in vitro*.



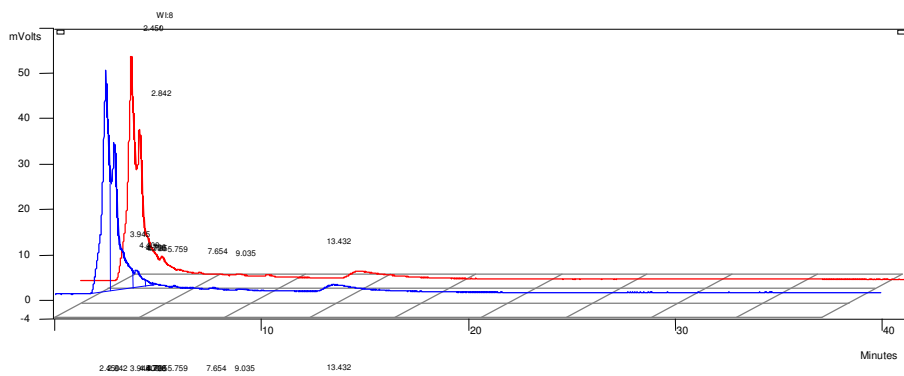
**Figura 48:** Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* de formulação de *serum* de carbopol 934<sup>®</sup> com EA, mostrando picos característicos da solução receptora.



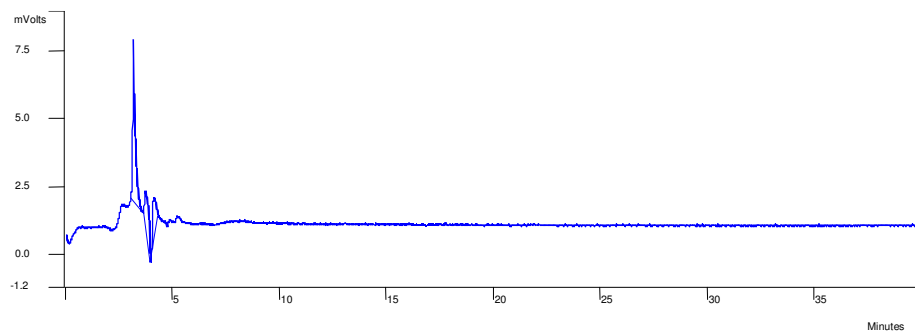
**Figura 49:** Cromatogramas da formulação de *serum* de Pemulen TR2<sup>®</sup> com EA, (■) antes e (■) após 12h do teste de liberação *in vitro* por CLAE.



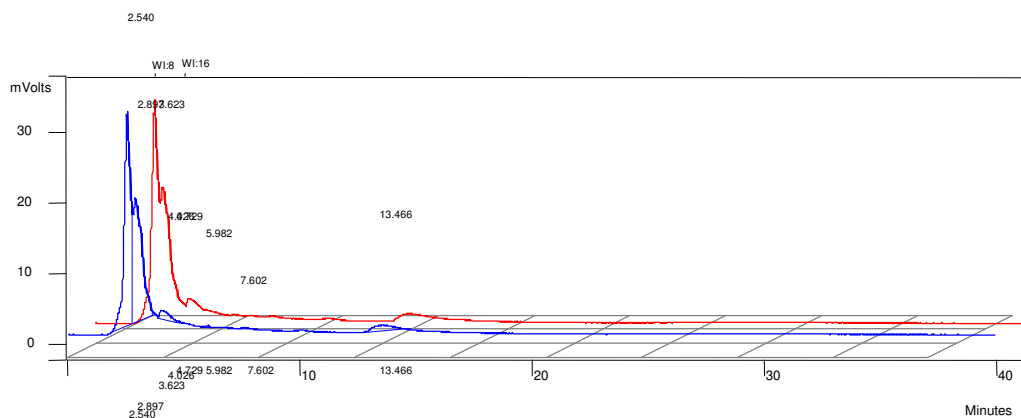
**Figura 50:** Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* da formulação de *serum* Pemulen TR2<sup>®</sup> contendo EA, mostrando os picos característicos da solução receptora por CLAE.



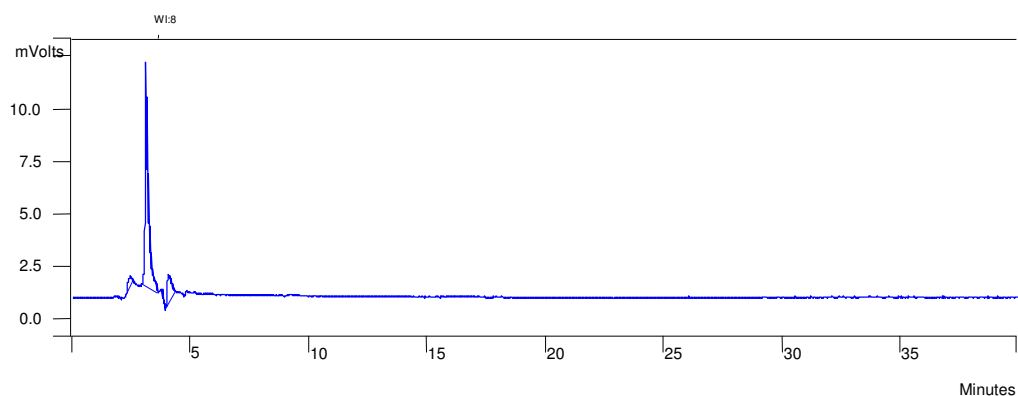
**Figura 51:** Cromatogramas da formulação de *serum* de Pemulen TR2<sup>®</sup> com ESD, (■) antes e (■) após 12 h do teste de liberação *in vitro* por CLAE.



**Figura 52:** Cromatograma da amostra no tempo de 12 h do teste de liberação *in vitro* com formulação de *serum* de Pemulen TR2<sup>®</sup> com ESD, mostrando os picos característicos da solução receptora por CLAE.



**Figura 53:** Cromatogramas da formulação de *serum* de Pemulen TR2<sup>™</sup> com EL, (■) antes e (■) após 12 h do teste de liberação *in vitro* por CLAE.

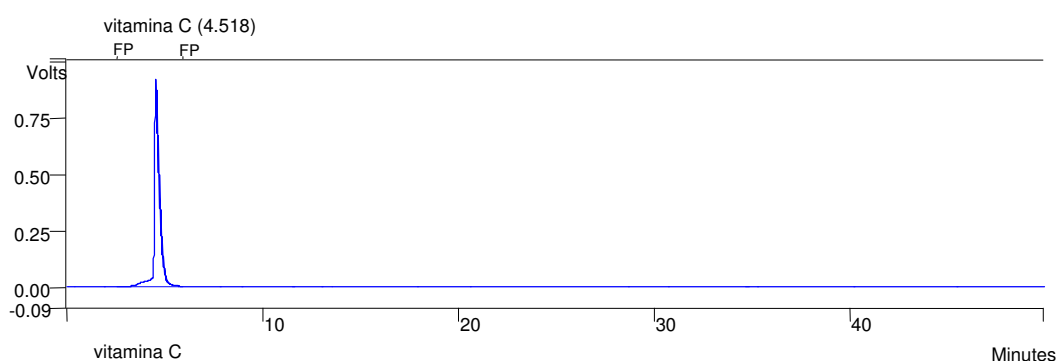


**Figura 54:** Cromatograma da amostra no tempo de 12 h do teste de liberação *in vitro* com formulação de *serum* de Pemulen TR2<sup>®</sup> com EL, mostrando os picos característicos da solução receptora por CLAE.

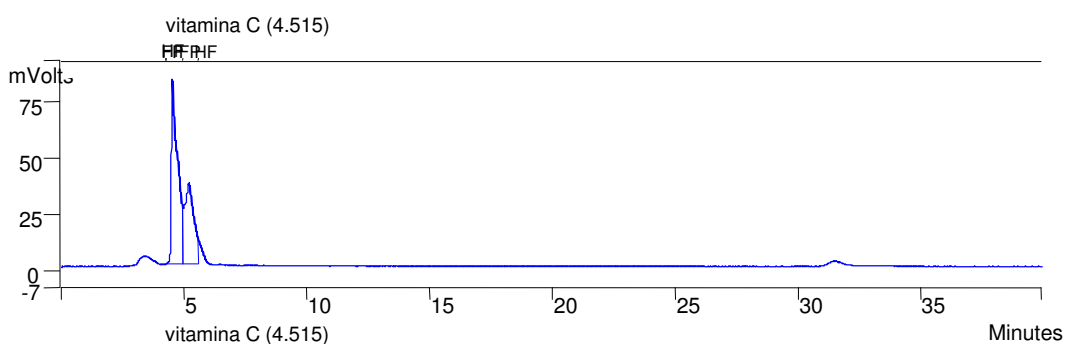
Um outro agente polimérico, Polaxamer 407<sup>®</sup> a 20%, adicionado de ESD e de EL, foi utilizado para verificar a liberação *in vitro* de algum componente dos extratos em gel. A escolha deste agente polimérico baseou-se em sua característica lipofílica e devido ao fato de ser utilizado em formulações transdérmicas (Bentley, 1994). Os resultados também mostraram ausência de liberação de qualquer componente dos extratos adicionados à formulação na solução permeada.

O conjunto de resultados obtidos nos ensaios de permeação *in vitro* poderia sugerir que o *serum* não seria uma forma adequada para veicular extratos de plantas ou outros constituintes com propriedades antioxidantes. No entanto, com *serum* adquirido no comércio a base de vitamina C 10%, em formulação diferente da utilizada neste trabalho,

foi possível detectar vitamina C na solução receptora no ensaio de liberação *in vitro*, o que demonstra a oportunidade deste tipo de forma farmacêutica para esta finalidade. Utilizando ácido ascórbico a 10% (Sigma®) em nossa formulação de Carbopol 934® também foi possível detectar o ativo na solução receptora (Figura 56), indicando que a formulação de *serum* utilizada neste trabalho pode ser eficiente para substâncias puras, mas não para os extratos de *B. microstachya* (Raddi) Macbride. O perfil cromatográfico da vitamina C (Sigma®) utilizada encontra-se na Figura 55.

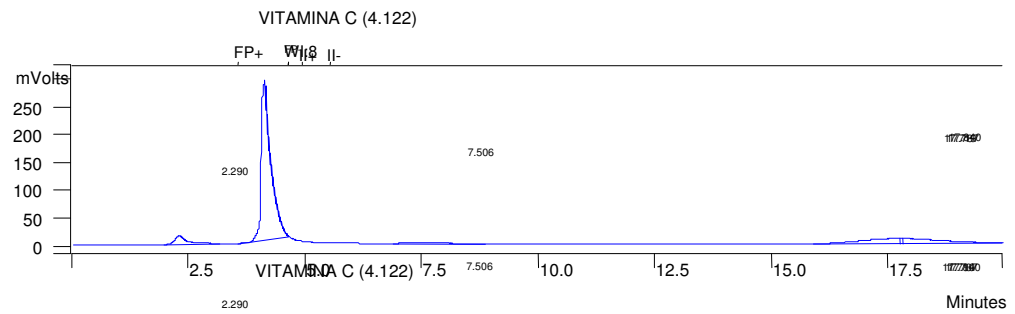


**Figura 55:** Perfil cromatográfico da vitamina C (Sigma®) em coluna C-8 por CLAE.

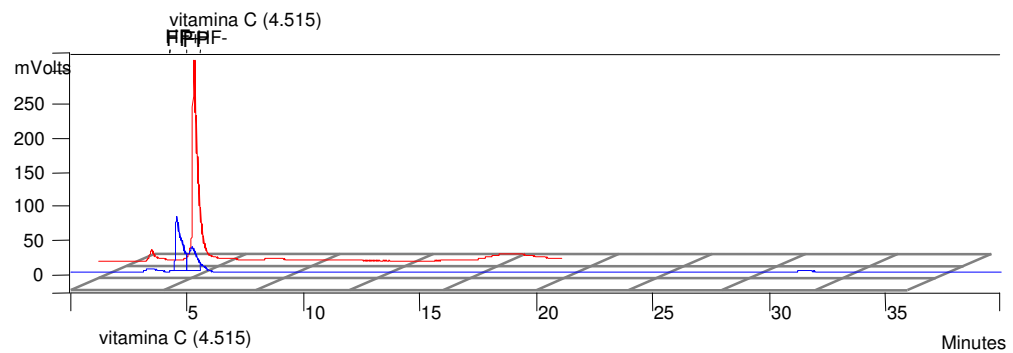


**Figura 56:** Cromatograma da amostra no tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* de formulação de *serum* de carbopol 934® com vitamina C, mostrando pico característico da vitamina C.

Para a confirmação do pico da vitamina C, foi realizada a co-injeção da vitamina C padrão com a amostra do tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* da formulação de Carbopol 934® contendo vitamina C (Figura 57 e 58).



**Figura 57:** Cromatograma da co-injeção da vitamina C padrão na amostra do tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* de formulação de *serum* de Carbopol 934® com vitamina C.



**Figura 58:** Cromatogramas de: ■ amostra do tempo 12 h do teste de liberação *in vitro* de formulação de *serum* de Carbopol 934® com vitamina C e ■ da co-injeção da mesma com vitamina C padrão.

Experimentos futuros deverão ser realizados para compatibilizar a forma farmacêutica à liberação dos ativos e do marcador pelos extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, bem como a otimização dos extratos secos para que se possa aproveitar o elevado potencial antioxidante das folhas de *B. microstachya* (Raddi) Macbride.



## Conclusões

---

- Os extratos das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride por métodos químicos *in vitro* (reação com o radical DPPH<sup>•</sup> e redução do complexo fosfomolibdênico) apresentaram capacidade antioxidante maior que aquelas apresentadas por extratos de outras espécies, sendo o de maior capacidade antioxidante o ESD.
- Os extratos ESD e EL também apresentaram elevada capacidade antioxidante em método de sistema biológico nas concentrações de 0,01, 0,1 e 1 mg/ml (proteção contra estresse oxidativo induzido por fenil-hidrazina em eritrócitos humanos), sendo o de maior capacidade antioxidante o ESD.
- Por meio da com co-injeção do padrão primário de isovitexina, identificou-se o flavonóide C-glucosilado isovitexina nos extratos ESD e EL em CLAE.
- As formulações de *serum* selecionadas mantiveram a capacidade antioxidante dos extratos adicionados, sendo o *serum* de Carbopol 934<sup>®</sup> aquele que melhor manteve essa capacidade.
- Não foi possível detectar a liberação dos ativos ou do marcador (isovitexina) dos extratos pela formulação de *serum* testada e nem pelas formulações modificadas, pelo ensaio de liberação *in vitro*.

## Referências

---

- Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA e Potapovitch AI (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemistry and Pharmacology* **38**:1763-1769.
- Akkus O (2002) Hydrogels, in *BIO2200\_Notes/Hydrogels.ppt*, The University of Toledo, Ohio.
- Anchisi C, Maccioni AM, Sinico C e Valenti D (2001) Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extract as functional agents. // *Farmaco* **56**:427 - 431.
- Anderson D (1996) Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutation Research* **350**:103 - 108.
- Anderson D e Phillips BJ (1999) Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food Chemical and Toxicology* **37**:1015-1025.
- Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S e Robards K (2002) Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* **127**:183-198.
- ANVISA (2004) Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004, in *Diário Oficial da União, Poder Executivo, Ministério da Saúde, Brasil*.
- Arantes AB (2002) Desenvolvimento de dentifrícios com extratos fluidos de *Calendula officinalis* L., (Asteraceae) e *Casearia silvestris* Sw., (Flacourtiaceae), destinado ao tratamento de periodontias, in *Dissertação de mestrado*, 93 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Arbos KA (2003) Estudo *in vitro* do potencial antioxidante de vegetais da família Cruciferae de diferentes cultivos, in *Dissertação de mestrado*, 87 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Babu RJ, Kanikkannan N, Kikwai L, Ortega C, Andega S, Ball K, Yim S e Singh M (2003) The influence of various methods of cold storage of skin on the permeation of melatonin and nimesulide. *Journal of Controlled Release* **86**:49 - 57.
- Bechelli LM e Curban GV (1988) *Compêndio de dermatologia*. Atheneu, São Paulo.
- Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A e Rio JAD (2000) Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chemistry* **68**:457 - 462.
- Bentley MVLB (1994) Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: Avaliação da liberação e penetração transcutânea por

metodologia in vitro, in *Tese de doutorado*, 151 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Beutler E, Dern RJ e Alving AS (1995) The hemolytic effect of primaquine. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **45**:40-45.
- Bianco EM (2003) Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, in *Dissertação de mestrado*, 104 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Bianco EM e Santos CAM (2003) Substâncias isoladas das folhas de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride (Cesalpiniaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **13**:93-99.
- Blois MS (1958) Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **181**:1199-1200.
- Boas BL, Menezes PR, Budel JM e Santos CAM (2003) In vitro antioxidant activity study of five species of carqueja. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **32 s. 2**:228.
- Bologna JL (1995) Aging skin. *The American Journal of Medicine* **98**:99s - 103s.
- Bondet V, Brand-Williams W e Berset C (1997) Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH<sup>•</sup> free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft un-Technologie* **30**:609 - 615, 772.
- Boukamp P (2001) Ageing mechanisms: the role of telomere loss. *Clinical and Experimental Dermatology* **26**:562 - 565.
- Braca A, De Tommasi N, Bari LD, Pizza C, Politi M e Morelli I (2001) Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products* **64**:892-895.
- Braca A, Sortino C, Politi M, Morelli I e Mendez J (2002) Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology* **79**:379 - 381.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME e Berset C (1995) Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* **28**:25-30.
- Bravo L (1998) Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutritional Reviews* **56**:317-333.
- Burns J, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, MePhail DB, Lister C, Matthews D, Maclean MR, Lean MEJ, Duthie G e Crozier A (2000) Relationship among antioxidant activity vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:220-230.
- Carvalho JCT, Gosmann G e Schenkel EP (2000) Compostos fenólicos simples e heterosídicos, in *Farmacognosia - da planta ao medicamento* (Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR eds)

pp 433 - 443, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

- Chang WS, Chang YH, Lu FJ e Chiang HC (1994) Inhibitory effects of phenolics on xanthine oxidase. *Anticancer Research* **14**:501-506.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ e Chiang HC (1993) Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Research* **13**:2165-2170.
- Charpentier B, Hamon-Lorléac'h F, Harlay A, Huard A e Ridoux L (2002) Farmacognosia - As drogas com glucídios, in *Conceitos básicos para a prática farmacêutica* (Harlay A, Huard A e Ridoux L eds), 660 p, Organização Andrei Editora Ltda, São Paulo.
- Chaudière J e Ferrari-Iliou R (1999) Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* **37**:949 - 962.
- Chen ZY (1996) Antioxidant activity of natural flavonoids in governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups. *Chemistry and Physics of Lipids* **79**:157-163.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH e Kim SK (2002) Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* **163**:1161-1168.
- Ciccoli L, Signorini C, Alessandrini C, Ferrali M e Comporti M (1994) Iron release, lipid peroxidation, and morphological alterations of erythrocytes exposed to acrolein and phenylhydrazine. *Experimental and Molecular Pathology* **60**:108 - 118.
- Claro LM (2002) Ação *in vitro* das vitaminas C e E em eritrócitos humanos submetidos a sobrecarga oxidativa induzida pelo cloridrato de fenil-hidrazina, in *Dissertação de mestrado*, 99 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Comar SR (2002) Ação da quercitina, rutina e extrato hidroalcoólico de *Vitis vinifera* em eritrócitos humanos submetidos à sobrecarga oxidativa, *in vitro*, in *Dissertação de mestrado*, 99 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Cronquist A (1988) *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden, New York, USA.
- Dacie J e Lewis SM (1995) Laboratory methods used in the investigation of the haemolytic anaemias, in *Practical Haematology* (Dacie J e Lewis SM eds) pp 210-211, Churchill Livingstone, London.
- Demirezer LO, Kuruuzum-Uz A, Bergere I, Schiewe HJ e Zeeck A (2001) The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry* **58**:1213-1217.

- Dias M, Farinha A, Faustino E, Hadgraft J, Pais J e Toscano C (1999) Topical delivery of caffeine from some commercial formulations. *International Journal of Pharmaceutics* **182**:41 - 47.
- Dumont P, Burton M, Chen QM, Gonos ES, Fripiat C, Mazarati JB, Ellaers F, Remacle J e Toussaint O (2000) Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stress in normal human fibroblast. *Free Radical Biology & Medicine* **28**:361 - 373.
- Evelyn KA e Malloy HT (1938) Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in single sample of blood. *The Journal of Biological Chemistry* **126**:655-662.
- Fabre N, Urizzi P, Souchard JP, Frechard A, Claparols C, Fouraste I e Moulis C (2000) An antioxidant sinapic acid ester isolated from *Iberis amara*. *Fitoterapia* **71**:425-428.
- Farid M (2003) A new approach to modelling of single droplet drying. *Chemical Engineering Science* **58**:2985 - 2993.
- Ferrali M, Signorini C, Ciccoli L e Comporti M (1992) Iron release and membrane damage in erythrocytes exposed to oxidizing agents, phenylhydrazine, divicine and isouramil. *Biochemistry Journal* **285 (Pt 1)**:295-301.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D e Comporti M (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* **416**:123-129.
- Fiorani M, De Sanctis R, De Bellis R e Dacha M (2002) Intracellular flavonoids as electron donors for extracellular ferricyanide reduction in human erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine* **32**:64-72.
- Fortunato RH (1986) Revision del genero *Bauhinia* (Cercideae, Caesalpinioideae, Fabaceae) para la Argentina. *Darwiniana* **27**:527 - 557.
- Galena (2003a) Sugestão de formulações para ativos Galena, in *Revista Notícias Galena* p 17, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas - São Paulo.
- Galena (2003b) Sugestão de formulações para ativos Galena, in *Revista Notícias Galena* pp 5, 10 e 19, Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas - São Paulo.
- Gil MI, Tomas-Barberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM e Kader AA (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**:4581-4589.
- Gomara FL (2003) Estudo de permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico, in *Dissertação de mestrado*, 125 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- Hanasaki Y, Ogawa S e Fukui S (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology & Medicine* **16**:845-850.
- Havsteen B (1983) Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology* **32**:1141 - 1148.
- Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **96**:67 - 202.
- Heijnen CG, Haenen GR, van Acker FA, van der Vijgh WJ e Bast A (2001) Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups. *Toxicology In Vitro* **15**:3-6.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB e Kromhout D (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* **342**:1007-1011.
- Holley AE e Cheeseman KH (1993) Measuring free radical reactions *in vivo*. *British Medical Bulletin* **49**:494-505.
- Hütter E, Unterluggauer H, Überall F, Schramek H e Jansen-Dürr P (2002) Replicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress. *Experimental Gerontology* **37**:1165 - 1174.
- Idson B e Lazarus J (2001) Semi-sólidos, in *Teoria e prática na indústria farmacêutica* (Lachman L, Lieberman HA e Kanig JL eds) pp 907 - 953, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Jay V, Berthon JY, Hagege D, Pouget MP, Lejeune B e Pourrat H (1998) New active ingredient for aging prevention. *Cosmetics & Toiletries* **113**:71 - 77.
- Jenkins G (2002) Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* **123**:801 - 810.
- Kim DO, Chun OK, Kim YJ, Moon HY e Lee CY (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:6509-6515.
- Kohen R (1999) Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **53**:181 - 192.
- Koleva, II, van Beek TA, Linssen JP, de Groot A e Evstatieva LN (2002) Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochemical Analysis* **13**:8-17.
- Kontogiorgis C e Hadjipavlou-Litina D (2003) Biological evaluation of several coumarin derivatives designed as possible anti-inflammatory/antioxidant agents. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **18**:63-69.
- Kuo JM, Yeh DB e Pan BS (1999) Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**:3206-3209.

- Leake DS (2001) Flavonoids and the oxidation of low-density lipoprotein. *Nutrition* **17**:63-66.
- Lin CC, Hsu YF e Lin TC (2001) Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins of *Terminalia catappa* L. *Anticancer Research* **21**:237-243.
- Lon S, Szczepanska-Sadowska E, Paczwa P e Ganten D (1999) Enhanced blood pressure buffering role of the brain nitregeric system in renin transgenic rats. *Brain Research* **842**:384-391.
- Lu Y e Food LY (2001) Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* **75**:197-202.
- Lubi NC (2002) Desenvolvimento de forma farmacêutica líquida de uso oral, isenta de açúcar com extrato fluido de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel, Asteraceae, para afecções do aparelho respiratório, in *Dissertação de mestrado*, 98 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Ma W, Wlaschek M, Tantcheva-Poór I, Schneider LA, Naderi L, Razi-Wolf Z, Schüller J e Scharffetter-Kochanek K (2001) Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. *Clinical and Experimental Dermatology* **26**:592 - 599.
- Magnani L, Gaydou EM e Hubaud JC (2000) Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta* **41**:209-216.
- Marty J-P e Wepierre J (1994) Percutaneous absorption of cosmetics: implications in safety and efficacy., in *Cosmetic dermatology* (Baran R e Maibach HI eds) pp 61 - 76, Martin Dunitz Ltd., London.
- May JM (1999) Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *Faseb Journal* **13**:995-1006.
- Menezes PR, A.Schwarz E e Santos CAM (2004) *In vitro* antioxidant activity of the species collected in Paraná. *Fitoterapia* **75**:398 - 400.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS e Leitão SG (2001) Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH: free radical method. *Phytotherapy Research* **15**:127 - 130.
- Meyre-Silva C, Yunes RA, Monache FD, Santos ARS, Schmeling LO, Gadotti VM, Liz F e Cechinel-Filho V (2001) Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). *Zeitschrift für Naturforschung* **56**:939 - 942.
- Mitchell JB, Xavier S, DeLuca AM, Sowers AL, Cook JA, Krishna MC, Haiin SM e Russo A (2003) A low molecular weight antioxidant decreases weight and lowers tumor incidence. *Free Radical Biology & Medicine* **34**:93 - 102.
- Mollgaard B e Hoelgaard A (1983) Permeation of estradiol through the skin - effect of vehicles. *International Journal of Pharmaceutics* **15**:185 - 197.

- Norton IT, Jarvis DA e Foster TJ (1999) A molecular model for the formation and properties of fluid gels. *International Journal of Biological Macromolecules* **26**:255 - 261.
- Ogiso T, Niinaka N, Iwaki M e Tanino T (1997) Mechanism for enhancement of lipid disperse system on percutaneous absorption Part II. *International Journal of Pharmaceutics* **152**:135 - 144.
- Pellizzaro MC (2003) Determinação da atividade antioxidante de plantas medicinais e aromáticas, in *relatório semestral*, 17 p, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Peppas NA, Bures P, Bandung W e Ichikawa H (2000) Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**:27 - 46.
- Petry RD, Souza KCBd, Bassani VL, Petrovick PR e Ortega GG (1998) Doseamento do teor de flavonóides totais em extratos hidroalcoólicos de *Passiflora alata* Dryander (maracujá). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **79**:7-10.
- Picheth G, Souza EM e Martinez TLR (2002) Correlação entre os produtos finais de glicação avançados (AGEs), polimorfismo do gene do receptor para AGE (RAGE) e fatores de risco para doença arterial coronária em indivíduos normais e diabéticos, in *Projeto de pesquisa em Patologia médica - disciplina de bioquímica clínica* 17 p, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Pietta PG, Manera E e Ceva P (1986) Isocratic liquid chromatographic method for the simultaneous determination of *Passiflora incarnata* L. and *Crataegus monogyna* flavonoids in drugs. *Journal of Chromatography* **357**:233 - 238.
- Pietta PG, Mauri PL, Manera E, Ceva PL e Rava A (1989) An Improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. *Chromatographia* **27**:509 - 512.
- Podda M e Grundmann-Kollmann M (2001) Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing. *Clinical and Experimental Dermatology* **26**:578 - 582.
- Podda M, Traber MG, Weber C, Yan LJ e Packer L (1998) UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radical Biology & Medicine* **24**:55 - 65.
- Porzio S, Caselli G, Pellegrini L, Pallottini V, Rosario MD, Coppola A, Boltri L, Gentile M, Clavenna G e Melillo G (1998) Efficacy of a new topical gel-spray formulation of ketoprofen lysine salt in the rat: percutaneous permeation *in vitro* and *in vivo* and pharmacological activity. *Pharmacological Research* **37**:41 - 47.
- Prietto P, Pineda M e Aguilar M (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* **269**:337-341.



- Rankell AS, Lieberman HA e Schiffman RF (2001) Secagem, in *Teoria e prática na indústria farmacêutica* (Lachman L, Lieberman HA e Kanig JL eds) pp 83 - 112, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa.
- Rehwald A, Meier B e Sticher O (1994a) Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. *Journal of Chromatography A* **677**:25 - 33.
- Rehwald A, Meier B e Sticher O (1994b) Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Passiflora incarnata* L. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **69**:153 - 158.
- Rice-Evans CA, Miller NJ e Paganga G (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* **20**:933 - 956.
- Rittié L e Fisher GJ (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews* **1**:705 - 720.
- Sampaio SAP e Rivitti EA (2001) *Dermatologia*. 1156 p. Artes Médicas, São Paulo.
- Santos CAM (1998) Rota para a síntese de flavonóides e glicosídeos com radicais acila biologicamente ativos, in *Tese apresentada para o Concurso Público de Provas e Títulos para a classe de professor titular do Departamento de Farmácia*. 76 p, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Santos D e Bahia MFG (1995) Promotores de absorção e penetração. *Cosmetics & Toiletries* **7**:42 - 51.
- Santos KC (2003) Atividade sedativa e ansiolítica dos extratos de *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae, in *Dissertação de mestrado*, 77 p, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba.
- Sato MEO (1998) Estudo da estabilidade de uma formulação na forma gel, veiculando extrato fluido de *Casearia silvestris* Sw., Flacourtiaceae ("guaçatonga"), in *Tese de doutorado*, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Schulz V, Hänsel R e Tyler VE (2002) *Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. Editora Manole Ltda, Barueri.
- Shah JC (1996) Application of kinetic model to in vitro percutaneous permeation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **133**:179 - 189.
- Shah JC, Kaka I, Tenjarla S, Lau SWJ e Chow D (1994) Analysis of percutaneous permeation data: II. Evaluation of the lag time method. *International Journal of Pharmaceutics* **109**:283 - 290.
- Sharma P e Morgan PD (2001) Ascorbate reduces superoxide production and improves mitochondrial respiratory chain function in human fibroblasts with electron transport chain deficiencies. *Mitochondrion* **1**:191 - 198.

- Simon RH, Scoggin CH e Patterson D (1981) Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. *The Journal of Biological Chemistry* **256**:7181 - 7186.
- Sonaglio D, Ortega GG, Petrovick PR and Bassani VL (1999) Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos, in *Farmacognosia - da planta ao medicamento* (Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA and Petrovick PR eds) pp 221 - 224; 232 - 234; 238; 242; 253 - 254, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.
- Soussolier L e Berthon JY (1988) Phytobioactives and their role in preventing skin aging. *Happi* **December**:93 - 96.
- Souza KCB e Ortega GG (1997) Padronização e estudo preliminar da estabilidade de extratos hidroalcoólicos de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá). *Caderno de Farmácia* **13**:147-148.
- Spilkova J e Dusek J (1996) Natural substances with antioxidant activity. *Ceska a Slovenska Farmacie* **45**:296-301.
- Suisse CF (1995) *Pharmacopoea Helvetica*, Departament Fédéral de l' Intérieur, Berne.
- Urmacher C (1997) Normal skin, in *Histology for pathologists* (Sternberg SS ed) pp 381 - 398, Raven Press, New York.
- van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A e van der Vijgh WJ (1998) Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* **56**:935-943.
- VanDuijn MM, Zee JVD e Broek PJVD (2001) The ascorbate-driven reduction of extracellular ascorbate free radical by the erythrocyte is an electrogenic process. *FEBS Letters* **491**:67-70.
- VanDuijn MM, Zee JVD e Broek PJVD (2002) Analysis of transmembrane redox reactions: interaction of intra- and extracellular ascorbate species. *Methods of Enzimology* **352**:268-279.
- Vasiljevic T e Jelen P (2003) Drying and storage of crude  $\beta$ -galactosidase extracts from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **4**:319 - 329.
- Vaz AMSF (1993) Trepadeiras do gênero *Bauhinia* (Caesalpinaceae) no estado do Rio de Janeiro. *Pesquisas Botânicas* **44**:95 - 113.
- Viglioglia PA e Rubin J (1991) *Cosmiatria III*. pp 22 – 162, Americana Publicações, Buenos Aires.
- Wang MY, Yang YY e Heng PWS (2004) Role of solvent in interactions between fatty acids-based formulations and lipids in porcine stratum corneum. *Journal of Controlled Release* **94**:207 - 216.
- Wester RC e Maibach HI (1989) *In vitro* testing of topical pharmaceutical formulations, in *Percutaneous absorption (mechanisms, methodology, drug*

- delivery*) (Bronaugh RL e Maibach HI eds) pp 653 - 659, Marcel Dekker, New York.
- Wester RC e Maibach HI (1994) Percutaneous absorption and cosmetics, in *Cosmetic Dermatology* (Baran R e Maibach HI eds) pp 55 - 60, Martin Dunitz Ltd., London.
- Wickens AP (2001) Ageing and the free radical theory. *Respiration Physiology* **128**:379 - 391.
- Wilhelm-Filho D, Silva EL e Boveris A (1999) Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas, in *Plantas Medicinais sob a ótica da química medicinal moderna* (Yunes RA e Calixto JB eds) pp 318-334, Argos, Chapeco SC.
- Wilkinson JB e Moore RJ (1990) *Cosmetologia de Harry*. 1039 p, Diaz Santos, Madrid.
- Yamamoto Y (2001) Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. *Journal of Dermatological Science* **27**:S1 - S4.
- Yamashita F e Hashida M (2003) Mechanistic and empirical modeling of skin permeation of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**:1185 - 1199.
- Zouboulis CC e Boschnakow A (2001) Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland. *Clinical and Experimental Dermatology* **26**:600 - 607.
- Zuanazzi JAS (2000) Flavonóides, in *Farmacognosia - da planta ao medicamento* (Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA e Petrovick PR eds) pp 489 - 514, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis.

# *Anexo*

---

## **Anexo A**

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Setor de Ciências da Saúde da UFPR.



