UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS

FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BRUNA MIKULIS LEMES

MEMBRANAS DE QUITOSANA CONTENDO FRAÇÃO METANÓLICA DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS (EUPHORBIACEAE): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

PONTA GROSSA

2016

BRUNA MIKULIS LEMES

MEMBRANAS DE QUITOSANA CONTENDO FRAÇÃO METANÓLICA DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS (EUPHORBIACEAE): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame

Coorientadora: Profª. Drª. Andressa Novatski

PONTA GROSSA

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Lemes, Bruna Mikulis
L551 Membranas de quitosana contendo fração metanólica de Euphorbia umbellata (PAX) bruyns (Euphorbiaceae): desenvolvimento, caracterização e avaliação/ Bruna Mikulis Lemes. Ponta Grossa, 2016.
128p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador: Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame.
Coorientadora: Profª Drª Andressa Novatski.

1.Euphorbia umbellata. 2.Caracterização físico-química. 3.Compostos fenólicos. 4.Membranas de quitosana. I.Beltrame, Flávio Luís. II. Novatski, Andressa. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615.321

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS– ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 02/2016, DA MESTRANDA BRUNA MIKULIS LEMES REALIZADO NO DIA 16 DE FEVEREIRO DE 2016, NA UNIVERSIDADE ESTADUALDE PONTA GROSSA.

Aos dezesseis dias de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 14h00min no Auditório do NUTEAD, Central de salas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência da Professora Doutora Andressa Novatski reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da mestranda Bruna Mikulis Lemes na linha de pesquisa: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia/Avaliação Química e Biológica de produtos naturais, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Flávio Luis Beltrame (UEPG/PR), Paulo Vitor Farago (UEPG/PR) e Marcos Luciano Bruschi (UEM/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para argüição. O título do trabalho foi: Membranas de Quitosana contendo fração metanólica de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae): desenvolvimento, caracterização e avaliação. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVANDO a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. A aluna deverá entregar, no prazo de até 60 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): REALIZAR AS ALTERAÇÕES CONFORME SOLICITADO PELA BANCA

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Andressa Novatski 1- (Defis – UEPG) - Presidente

Flávio Luis Beltrame 2- (Defar - UEPG) – Titular

Paulo Vitor Farago 3- (Defar - UEPG) – Titular

Marcos Luciano Bruschi 4- (Defar - UEM) – Titular

Ponta Grossa, 16 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a todos que de alguma forma me apoiaram, inspiraram-me e me motivaram pelos caminhos que trilhei.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus que tudo permitiu, guiando-me e iluminando-me com a clareza e a inteligência necessárias para transpor as barreiras na busca do conhecimento. Que tão sabiamente enviou-me graças e desafios, proteção, guia e luz para que fosse possível chegar até aqui.

À minha amada família, em especial minha à mãe Cínthia, ao meu pai Orival Júnior e à minha irmã Bárbara, sem os quais os caminhos que escolhi trilhar seriam muito mais difíceis. Pelo apoio emocional, pelo constante estímulo, por acreditarem infinitamente em meus potenciais, pela liberdade de escolha e pensamentos, por sempre disporem de todos os recursos necessários nesta caminhada.

Ao meu namorado Guilherme pelo apoio, por sempre acreditar no em meu potencial, pelo amor e pela paciência. Sem seu incentivo e motivação, com certeza, os caminhos para chegar até aqui teriam menos graça e mais espinhos. Obrigada por me ensinar a ver tudo de um modo diferente e por estar ao meu lado, abraçando-me e me mostrando o "outro lado da moeda" nos momentos difíceis. Por sempre me lembrar que também é preciso viver a vida e não só viver a pesquisa, amo-te.

Ao Prof. Dr. Flávio Luís Beltrame, que nestes 5 anos de convivência e trabalho nunca mediu esforços, tempo e recursos para colaborar no meu desenvolvimento pessoal e científico; pelos conhecimentos partilhados, pela atenção e preocupação, pela dedicação, pelas críticas, sugestões e pelos diálogos que possibilitaram o desenvolvimento desta pesquisa. Também à sua esposa Zilda Mara Consalter, por também participar, direta ou indiretamente, destes 5 anos.

À Prof[a]. Dr[a]. Andressa Novatski, que desde o primeiro instante se prontificou a auxiliar e contribuir ao máximo com este trabalho, pelos conhecimentos partilhados, pelos momentos de descontração, pela amizade e por abraçar este projeto e minha coorientação de forma tão comprometida.

À técnica do C-LabMu e amiga, Msc. Simone do Rocio Ferraz Sabino, pelos bons momentos de convivência, pela disposição e comprometimento em sempre auxiliar da melhor maneira possível na realização deste estudo.

Aos demais alunos do grupo de pesquisa Luiza, Victor, Aline e Jheniffer e à Prof[a]. Dr[a]. Priscileila Colerato Ferrari, pelos bons momentos de convivência e descontração e pelo auxílio na realização deste trabalho. Com certeza sem suas contribuições, a visão de cada um na pesquisa, o espírito de equipe, não atingiríamos nossos objetivos com tanta qualidade. Também à aluna do grupo de pesquisa da Prof[a]. Dr[a]. Andressa Novatski, Jaqueline Gunha, pelo comprometimento e auxílio na realização deste trabalho.

Ao meu amigo e companheiro de pesquisa Bruno, pelos momentos de ócio criativo, pelas conversas, pelos dramas e alegrias partilhados nestes mais de 5 anos de convivência no grupo de pesquisa. Obrigada pelo apoio, incentivo e pelos diálogos tão produtivos. Espero que ainda possamos compartilhar bons momentos na vida profissional e também bons momentos de amizade. Pode contar comigo no futuro promissor que nos aguarda, amiguinho!

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando bons e maus momentos pela amizade, compreensão e carinho.

Aos colegas de mestrado pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos professores do PPGCF pelos ensinamentos e pela convivência.

À técnica do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Maria Aparecida Ribeiro da Luz, pela atenção dedicada ao laboratório, pela convivência e pela disposição em sempre auxiliar.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, bem como aos órgãos de fomento, Fundação Araucária e CAPES, pelos recursos financeiros para a pesquisa e a bolsa de mestrado.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, estiveram presentes, possibilitando a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

A própria destruição, que parece aos homens o termo das coisas, não é senão um meio de atingir, pela transformação, um estado mais perfeito, porque tudo morre para renascer, e coisa alguma se torna em nada.

(Allan Kardec)

RESUMO

O uso abusivo de medicamentos anti-inflamatórios traz riscos à saúde da população e tal fato preocupa e instiga cada vez mais os pesquisadores a buscar alternativas de novos fármacos e formulações mais seguros. Neste sentido o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas de liberação modificada e a busca de novos fármacos, apresenta-se como um campo de pesquisa de grande importância. Os extratos de espécies vegetais se destacam com uma matriz de interesse em decorrência da presença de possíveis moléculas bioativas. Entre estes compostos destacam-se os fenólicos, que se destacam como uma classe bastante diversificada estruturalmente e cuja atividade antioxidante e anti-inflamatória são bem estudadas e reconhecidas. A espécie *Euphorbia umbellata* tem despertado interesse nos últimos anos quanto ao seu uso etnofarmacológico para tratamento de quadros de câncer e inflamação, e apresenta-se como candidata a ser empregada em formulações com atividade anti-inflamatória, especialmente por apresentar entre seus metabólitos, os compostos fenólicos. Sendo assim, no presente estudo, membranas de quitosana contendo a fração metanólica de *E. umbellata* para aplicação tópica foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas quanto ao seu potencial antioxidante e antimicrobiano. Para tanto, inicialmente foram realizadas a determinação quantitativa dos compostos fenólicos (fenólicos e flavonoides totais) presentes no extrato bruto e suas frações (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol) por UV-VIS e a avaliação cromatográfica qualitativa da fração metanólica por UHPLC-MS. A caracterização físico-química das membranas foi desenvolvida por meio de técnicas de MEV, FEG, densidade, DRX, FTIR, DSC, TGA, determinação de cor e avaliação farmacológica *in vitro* mediante a determinação do potencial *scavenger* (DPPH e ABTS) e antimicrobiano, além do teste de permeação *ex vivo*. A quantificação de fenólicos revelou que a fração metanólica é a que possui maior quantidade desses compostos (225,205 $mg.g^{-1}$) e a avaliação cromatográfica da mesma permitiu sugerir 23 moléculas de substâncias fenólicas pertencentes as classes dos ácidos fenólicos simples, taninos e flavonoides. Os testes de caracterização evidenciaram variações relacionadas à adição da fração metanólica à matriz de quitosana, o que demonstra a interação desta com a estrutura do polímero. Os ensaios antioxidante e antimicrobiano indicaram favorável potencial das membranas M50FM e M100FM, nos modelos estudados. Da mesma forma, estas formulações também se destacaram no ensaio antimicrobiano. Não foi observada permeação cutânea o modelo de célula de Franz, o que aponta para uma atividade local. Deste modo, foi possível indicar que ocorrem interações entre a fração metanólica e o polímero, entretanto as formulações são candidatas promissoras à aplicação tópica para ação anti-inflamatória.

Palavras-chave: *Euphorbia umbellata*, caracterização físico-química, compostos fenólicos, membranas de quitosana.

.

ABSTRACT

The abusive use of anti-inflammatory drugs entails health risks and this fact has increasingly led researchers to seek alternative new drugs and safer formulations. Consequently the development of new, modified drug delivery systems and the search for new drugs, presents itself as a great research field. The extracts from plant species stand out as a matrix of interest due to the presence of possible active compounds. These compounds include the class of phenolic compounds, which is a structurally diversified class whose antioxidant and anti-inflammatory activity have already been well-studied and recognised. The species *Euphorbia umbellata* has attracted attention in recent years in relation to its ethnopharmacological use for the treatment of cancer and inflammation and it presents as candidate to be used in formulations with anti-inflammatory activity, which is especially present among in its metabolites, i.e. phenolic compounds. Consequently, this study developed, characterised and evaluated chitosan membranes containing the methanol fraction of *E. umbellata* for topical application in relation to their antioxidant and antimicrobial potential. Initially, the quantitative determination of phenolic compounds (total flavonoids and phenolics) present in the crude extract and its fractions (hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol) were performed using UV-VIS, and a qualitative chromatographic evaluation of the methanolic fraction was performed using UHPLC-MS. The physicochemical characterisation of the membranes was performed using SEM and EGF techniques, density, XRD, FTIR, DSC, TGA, colour measurements, and pharmacological evaluation *in vitro* by determining the scavenging (DPPH and ABTS) and antimicrobial potential, in addition to *ex vivo* permeation testing. The quantification of phenolic compounds demonstrated that the methanolic fraction contained the highest amount of these compounds (225.205 $mg.g^{-1}$) and the chromatographic evaluation of the methanolic fraction made it possible to suggest 23 molecules of phenolic substances belonging to the classes of simple phenolic acids, tannins and flavonoids. The characterisation tests showed variations related to the addition of the methanolic fraction of the chitosan matrix, which showed interaction between the chitosan matrix and the polymer structure. The antioxidant and antimicrobial tests indicated the positive potential of the membranes in relation to the studied models. Similarly, these formulations also stood out in the antimicrobial assay. There was no permeation of the Franz cell model, suggesting a local activity. Thus, it was possible to demonstrate that interactions occurred between the methanolic fraction and the polymer. These formulations show promising potential for topical application in relation to anti-inflammatory action.

Keywords: phenolic compounds, chitosan membranes, infrared spectroscopy, *Euphorbia umbellata*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ilustração das camadas da pele e seus anexos.....	21
Figura 2	Rotas de permeação de fármacos através do estrato córneo – através da matriz lipídica (entre os corneócitos - intercelular) e através dos corneócitos e a matriz lipídica (transcelular).....	22
Figura 3	Estrutura primária da unidade repetitiva da quitosana adaptada de Silva; Santos e Ferreira (2006).....	23
Figura 4	Balança analítica com aparato para medida de densidade pelo princípio de Arquimedes.....	48
Figura 5	Esquema da célula de difusão vertical de Franz.....	52
Figura 6	Perfil cromatográfico representativo dos compostos presentes na FM obtidos por UHPLC-QToF-MS, de acordo com o tempo de retenção.....	60
Figura 7	Estruturas das substâncias identificadas na FM.....	67
Figura 8	Amostra M100FM obtida a partir da fórmula e das condições ideais desenvolvidas.....	69
Figura 9	Imagens da superfície superior e da espessura das membranas M100FM preparadas em placas de vidro e plástico – (a) membrana obtida em placa de Petri de plástico; (b) membrana obtida em placa de Petri de vidro.....	71
Figura 10	Imagens da superfície superior (à esquerda) e inferior (à direita) da Membrana 4 (M100FM feita em placa de plástico).....	72
Figura 11	Imagens da superfície superior de amostras M100FM produzidas em placas de Petri de vidro (a - Membrana 1) e de plástico (b - Membrana 4) obtidas por MEV (microscopia eletrônica de varredura – VEGA3 TESCAN).....	73
Figura 12	Gráfico da Análise multivariada de Componentes Principais (ACP) dos espectros de FTIR, obtidos por avaliações periódicas em 28 dias, das amostras MB preparadas em moldes de vidro (em vermelho) e de plástico (em azul).....	75
Figura 13	Curva DSC para as membranas de quitosana. Razão de	77

	aquecimento 10°C.min^{-1} até 550°C.....	
Figura 14	Análise termogravimétrica de membranas de quitosana.....	79
Figura 15	Difratograma das membranas de quitosana.....	80
Figura 16	Espectros de FTIR da FM e da membrana MB na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1}.....	82
Figura 17	Espectros de FTIR das membranas de quitosana contendo a FM na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1}.....	82
Figura 18	Espectros de FTIR de membranas de quitosana MB, M10FM, M50FM e M100FM, evidenciando o deslocamento de pico entre 1024 e 1035 cm^{-1}.....	84
Figura 19	Espectros de FTIR de membranas de quitosana MB, M10FM, M50FM e M100FM, inversão da intensidade dos picos entre 1380 e 1383 cm^{-1}.....	85
Figura 20	Espectros de FTIR de membranas MB, M10FM, M50FM e M100FM de FM. Deslocamento de pico entre 2915 cm^{-1} e 2922 cm^{-1}.....	86
Figura 21	Atividade antioxidante das amostras liberadas a partir membranas de quitosana M50FM e M100FM, avaliada periodicamente em um período de 72 horas.....	95
Figura 22	Espectros dos padrões ácido gálico (1), ácido elágico (2) e quercetina (3) obtidos por UHPLC-MS.....	98
Figura 23	Espectros das membranas M50FM (a) e M100FM (b) obtidos por UHPLC-MS.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Fatores avaliados no processo de desenvolvimento das membranas de quitosana.....	43
Tabela 2	Resultados de ANOVA para linearidade do método de determinação de fenólicos totais.....	55
Tabela 3	Resultados de ANOVA para linearidade do método de determinação de flavonoides totais.....	56
Tabela 4	Quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais.....	56
Tabela 5	Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM.....	61
Tabela 6	Fórmula centesimal de membranas de quitosana contendo FM.	68
Tabela 7	Membranas de quitosana e suas espessuras avaliadas por MEV.	70
Tabela 8	Densidade das membranas de quitosana pelo método de Arquimedes.....	76
Tabela 9	Transições térmicas e massa residual das membranas de quitosana preparadas em diferentes concentrações de FM.....	79
Tabela 10	Atribuições às vibrações/aos grupamentos no FTIR das membranas de quitosana.....	83
Tabela 11	Medidas médias de cor (L^*, a^*, b^* e ΔE) das membranas de quitosana de acordo com a variação de tempo e concentração de FM.....	88
Tabela 12	Dados de CI_{50} dos testes DPPH e ABTS para as membranas M50FM e M100FM.....	93
Tabela 13	Halos de inibição das membranas de quitosana impregnadas com FM.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
$ABTS^{\bullet+}$	2.2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de Componentes Principais
ATCC	American Type Cultural Collection
C-LABMU	Complexo de Laboratórios Multiusuários
$DPPH^{\bullet}$	2.2-difenil-1-picril-hidrazila
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EP	Erro padrão da média
FEG	Microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo
FM	Fração metanólica do extrato das cascas do caule de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourrier
GPTMS	γ- glicidoxipropiltrimetoxisilano
HPLC	High performance liquide chromatography
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
LC-MS-QToF	Liquid Chromatography Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry
M10FM	Membrana de quitosana contendo 10% de fração metanólica do extrato das cascas do caule de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de quitosana (m/m)
M50FM	Membrana de quitosana contendo 50% de fração metanólica do extrato das cascas do caule de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de quitosana (m/m)
M100FM	Membrana de quitosana contendo 100% de fração metanólica do extrato das cascas do caule de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns, em relação à massa de quitosana (m/m)
MB	Membrana base de quitosana (sem FM)
MeOH	Metanol
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PA	Padrão Analítico
PEG	Poli(etileno glicol)
PVP	Polivinilpirrolidona
RMN	Ressonância magnética nuclear

TGA	Análise termogravimétrica
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFSCar	Universidade Federal de São Carlos
UHPLC-QToF-MS	Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometry
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 REVISÃO DE LITERATURA 21

2.1 Pele e via de administração tópica 21

2.2 Quitosana 22

2.3 Plantas medicinais 27

2.4 A espécie vegetal *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns X *Synadenium grantii* HOOK f. 29

2.5 Compostos Fenólicos e inflamação 34

3 OBJETIVOS 37

3.1 Objetivos gerais 37

3.2 Objetivo Específicos 37

4 MATERIAL E MÉTODOS 39

4.1 Identificação botânica do material vegetal 39

4.2 Obtenção do extrato bruto 39

4.3 Fracionamento do extrato bruto 39

4.4 Determinação de fenólicos totais 40

4.5 Determinação de flavonoides totais 40

4.6 Avaliação cromatográfica qualitativa de compostos presentes na fração metanólica de E. umbellata 41

4.7 Desenvolvimento das membranas de quitosana 42

4.8 Determinação da concentração de fração metanólica 45

4.9 Condição de preparo das membranas de quitosana 45

4.10 Caracterização das membranas 46

4.11 Atividade antioxidante 50

4.12 Atividade antimicrobiana – difusão em ágar 51

4.13 Estudo de permeação *ex vivo* – célula de difusão de Franz 51
4.14 Análise estatística dos dados 52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 54
5.1 Determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais 54
5.2 Avaliação cromatográfica da fração metanólica de *E. umbellata* 59
5.3 Membranas de quitosana 67
5.4 Caracterização as membranas 69
5.5 Atividade Antioxidante 91
5.6 Atividade Antimicrobiana 96
5.7 Estudo de permeação *ex vivo* – célula de difusão de Franz 97
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 102
REFERÊNCIAS 104

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Destaca-se no tratamento de quadros inflamatórios que acometem o homem, a terapêutica medicamentosa com o uso de anti-inflamatórios esteroidais e os anti-inflamatórios não-esteroidais. A prescrição e a utilização de produtos farmacêuticos, sobretudo formas farmacêuticas orais, para o tratamento de quadros relacionados às inflamações é crescente (ELY et al., 2015; BERTOLDI et al., 2014; DE-PAULA et al., 2014; CARVALHO et al., 2005).

Entretanto, muitas vezes, o uso crônico desses medicamentos, sem o correto acompanhamento e a orientação de profissionais da saúde, pode levar ao aparecimento de efeitos adversos, agravando o quadro clínico do paciente (BORGES et al., 2013; ANTONISAMY; DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU , 2011).

Sendo assim, existe a constante e desafiadora proposta de se buscar novos agentes bioativos, que possam ser incorporados à formas farmacêuticas já existentes ou que venham a compor novas formulações, como alternativa para se enriquecer a lista de especialidades farmacêuticas e tentar reduzir os casos de baixa atividade ou efeitos colaterais produzidos pelos fármacos existentes no setor médico-farmacêutico.

Desta forma, o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada/controlada e, especialmente, a busca por novos princípios ativos ou a associação destas duas ações, é de grande interesse em termos de saúde e para fins comerciais (KOST; LANGER, 2012; LOPES et al., 2005; DAS; DAS, 2003).

No que diz respeito à formulação farmacêutica, pode-se ressaltar que estas preparações podem promover, quando bem elaboradas, uma liberação inicial imediata do fármaco (*burst*), a qual pode ser interessante, seguido da liberação gradual de quantidades adicionais para manter-se o efeito pelo período desejado, evitando a ocorrência de “picos” e “vales” de concentração sanguínea do fármaco administrado (ALLEN; ANSEL; POPOVICH, 2011). Para atingir este objetivo, o uso de polímeros pode auxiliar no controle da liberação de fármacos a partir da forma farmacêutica, de modo a aperfeiçoar a disponibilidade do princípio ativo, promover a manutenção dos níveis séricos e evitar ações locais indesejadas ocasionadas pelo ativo (VILLANOVA; ORÉFICE, 2010; OLIVEIRA; LIMA, 2006).

Um exemplo de polímero que pode ser utilizado com esta finalidade é a quitosana, um polímero semissintético, empregado na produção de nanopartículas, comprimidos, filmes e membranas. Os produtos manufaturados com este excipiente podem ser impregnados com compostos orgânicos e minerais (FWU-LONG et al., 2002; HIRANO et al., 1981), com o propósito de potencializar ou acrescer características ao produto como ação antimicrobiana e cicatrizante (COSTA, et al., 2012; KONG et al., 2010; GOY et al., 2009).

Ainda, quanto à busca de novos ativos, o estudo de extratos vegetais e substâncias (metabólitos primários e secundários) se apresentam como uma alternativa a descoberta de novas moléculas a serem avaliadas para tratamento como agentes anti-inflamatórios.

Neste contexto se inserem algumas espécies do gênero *Euphorbia* (família Euphorbiaceae), as quais são utilizadas, muitas vezes etnofarmacologicamente, para tratamento de processos inflamatórios (ERNST et al., 2015).

Euphorbia umbellata (Pax) Bruyns, conhecida como leitosinha ou janaúba, é amplamente utilizada na região dos Campos Gerais como agente anti-inflamatório, para o tratamento de doenças gástricas, como agente hemostático e também antitumoral (BADGUJAR, 2014; OLIVEIRA et al., 2013; COSTA et al., 2012).

Entre seus metabólitos secundários podem ser citados antocianinas, flavonoides, taninos, terpenos, proteínas e outros (ANDERSEN et al., 2010; RAJESH et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2005; MENON et al., 2002; BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988; PREMARATNA et al., 1984). Atribui-se aos terpenos, bem como aos compostos fenólicos presentes no gênero *Euphorbia* (ERNST et al., 2015; ÖZBILGIN; ÇITOGLU, 2012; COSTA et al., 2012), a ação anti-inflamatória e a capacidade de inibir a formação de radicais livres (ANTONISAMY et al., 2011).

Apesar da ampla utilização de espécies deste gênero na medicina popular, o conhecimento científico disponível sobre a aplicação de seus extratos como fitocomplexos em formulações farmacêuticas é inexistente. Estudos que avaliem a composição química dos extratos dessas espécies, bem como comprovem suas ações farmacológicas, apesar de crescentes, ainda são escassos e necessitam ser ampliados;

em especial os extratos da espécie *E. umbellata* que tem demonstrado um promissor potencial farmacológico, o qual ainda pode ser melhor estudado (MACHADO, 2008).

Diante do exposto, o presente trabalho propôs desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica de aplicação tópica na forma de membrana, utilizando o polímero quitosana contendo fração metanólica do extrato da casca do caule de *E. umbellata*, bem como avaliar parâmetros cromatográficos, antioxidantes e microbiológicos da formulação.

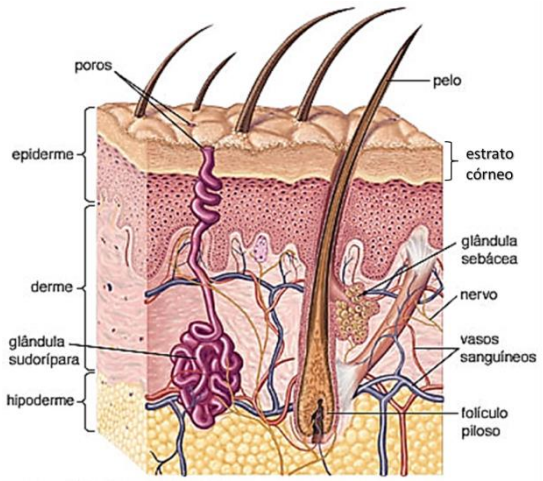
Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pele e via de administração tópica

Considerado o maior órgão do humano em extensão e peso, a pele constitui aproximadamente 16% do peso corporal. Compõe o sistema tegumentar juntamente com seus anexos: glândulas sudoríparas, glândulas sebáceas, folículos pilosos e unhas (GARTNER & HIATT, 2007). Consiste em três camadas distintas: a epiderme (estrato córneo), a derme e a hipoderme ou camada subcutânea (Figura 1) (KIERSZENBAUM & TRES, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1. Ilustração das camadas da pele e seus anexos



Fonte: Adaptado de In Britannica Escola Online (http://escola.britannica.com.br/assembly/135568/A-pele-humana-tem-tres-camadas-a-epiderme-a-derme).

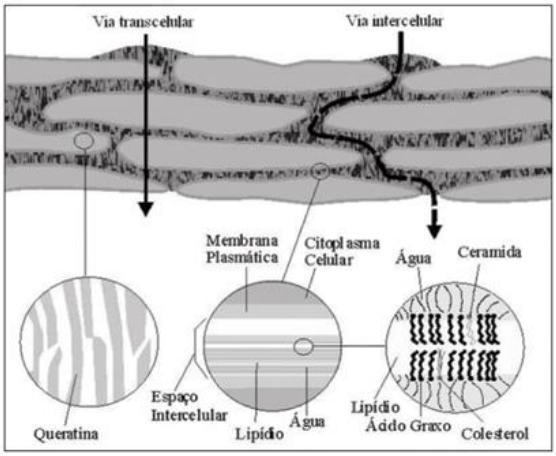
A pele apresenta-se como uma barreira de proteção e cobertura aos tecidos subjacentes, além de possuir diversas funções, como: proteção contra lesões, invasão de micro-organismos e dessecação; regulação da temperatura corporal com a conservação ou a dissipação do calor; órgão sensorial; excreção (glândulas sudoríparas); e absorção da radiação ultravioleta dos raios solares para a síntese de vitamina D (KIERSZENBAUM; TRES, 2012; GARTNER & HIATT, 2007).

Além de barreira de proteção contra possíveis agentes nocivos, o estrato córneo também é a barreira a ser transposta quando a via de aplicação da formulação é a via

tópica. Esta via de administração é aquela a qual se encontra próxima da área afetada e onde as formulações serão aplicadas como objetivo de conseguir maiores concentrações de princípio ativo no tecido alvo e concentração sérica mínima ou inexistente (MANO, 2012; FLORES; CASTRO; NASCIMENTO, 2012).

O estrato córneo, camada mais superficial de pele, é constituído por células mortas com grande acúmulo de queratina e apresenta-se como a principal barreira para a absorção de princípios ativos pela via tópica (GEUSENS et al., 2011; CAMPOS; MERCÚRIO, 2009). A permeação dos princípios ativos pela pele pode ocorrer principalmente de modo transcelular, através das células, ou paracelular, nos espaços intercelulares (Figura 2) (GEUSENS et al., 2011).

Figura 2. Rotas de permação de fármacos através do estrato córneo – através da matríz lipídica (entre os corneócitos - intercelular) e através dos corneócitos e a matriz lipídica (transcelular)



Fonte: GRATIERI; GELFUSO; LOPEZ, 2008.

2.2 Quitosana

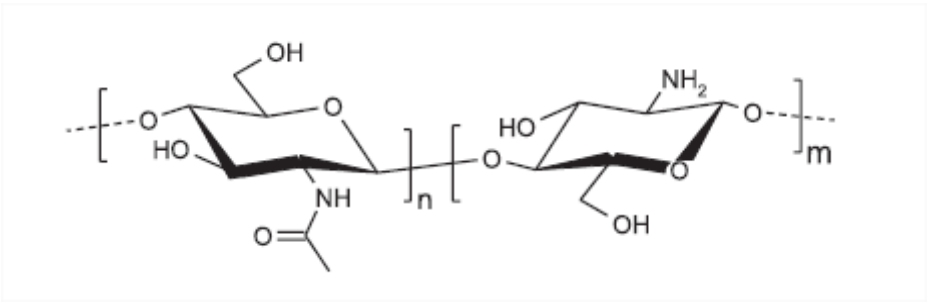
A quitosana (Figura 3) é um polímero semissintético não celulósico resultante da desacetilação da quitina na presença de agentes básicos. A quitina é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, ocorrendo também em plantas, invertebrados marinhos, insetos, paredes celulares de alguns fungos e micro-

organismos, sendo considerado o segundo recurso orgânico mais abundante na Terra (ABREU et al., 2013; KASAAI, 2008).

Apresenta-se como um polímero biodegradável, biocompatível, sendo quebrado por várias enzimas proteolíticas. Também tem por características ser catiônico e hidrofílico, além de ser um polissacarídeo linear de caráter básico contendo os monômeros [1,4] 2-acetamido-2-deoxi-D-glucopiranose e 2-amino-2-deoxi-D-glucopiranose (DIAS et al, 2013; HOLLMAN; KATAN, 1999).

Este polímero apresenta três principais grupos funcionais, sendo eles: hidroxila (OH), amina primária (NH_2) e grupamentos éter (C−O−C) e dependendo do nível de desacetilação pode apresentar ainda grupamentos carbonila (C=O) residuais (MADELEINE-PERDRILLAT et al., 2015). Os grupos amino livres relacionam-se à solubilidade do polímero, assim como seu grau de desacetilação, o qual à medida que aumenta também promove um aumento na solubilidade do polímero em meio aquoso. Isto pode ser atribuído à carga positiva na molécula de quitosana e favorece reações com polímeros aniônicos e com superfícies com carga negativa (DIAS et al., 2013; TORRES, 2009).

Figura 3. Estrutura primária das unidades repetitivas da quitosana, adaptada de Silva; Santos e Ferreira (2006)



A aplicabilidade da quitosana é muito ampla, incluindo medicamentos que auxiliam no combate à obesidade (por intumescimento gástrico promovendo a sensação de plenitude gástrica e saciedade), formas farmacêuticas de liberação prolongada, compondo formulações de fibras dietéticas, no revestimento de frutas contribuindo para

aumentar o *shelf life*, atuando como agente antifúngico e antibacteriano, entre outros (DIAS et al., 2013).

Características de biocompatibilidade e biodegradabilidade da quitosana tornam-na útil em diversas aplicações na área farmacêutica, particularmente na preparação de sistema de liberação controlada de fármacos. Essas aplicações são diversas e em formas diferentes – na produção de nanopartículas, membranas ou filmes, microesferas e comprimidos (DIAS et al., 2013; HIRANO; TOBETTO; NOISHIKI, 1981).

Outra característica que se destaca são as propriedades bioadesivas e mucoadesivas da quitosana, devido às suas cargas positivas em pH neutro, que permitem uma interação iônica com as cargas negativas de resíduos de ácido siálico do muco (PATE; PATEL; PATEL, 2005). Aproveitando-se desta propriedade e associada à atividade antimicrobiana do polímero, estudos avaliam sua aplicação no combate de patógenos anaeróbicos causadores de infecções bucais como um tratamento alternativo (COSTA et al., 2012).

Numerosos estudos demonstraram que a quitosana e seus derivados quimicamente modificados (*N*-trimetila e *N*-carboximetila) são eficazes promotores de absorção e seguros para liberação de macromoléculas hidrofílicas (peptídeos, proteínas e heparina) nas mucosas nasal e oral (SILVA, 2006). Além disso, exibe uma variedade de ações biológicas como hipocolesterolêmica, antimicrobiana, cicatrizante (COSTA et al, 2012; PATE; PATEL; PATEL, 2005; HOLLMAN; KATAN, 1999; HOLLMAN; KATAN, 1997; LEHR et al., 1992).

2.2.1 Membranas de quitosana

A partir de uma solução de quitosana é possível obter formas diversas como membranas, filmes e microesferas. As membranas podem ser preparadas por evaporação de uma solução de quitosana em ácido acético espalhada numa placa de vidro ou plástico, resultando na formação de um biofilme flexível e resistente. Característica esta que pode ser melhorada pela adição de plastificantes como o glicerol e o poli(álcool vinílico) (COSTA et al., 2006).

A preparação de ambas as formas, membranas ou microesferas, baseia-se na natureza policatiônica do polímero. Em meio ácido, os grupos amino das cadeias poliméricas da quitosana protonam, tornando-a mais hidrossolúvel. Posteriormente, podem ser realizadas modificações químicas dos grupos funcionais, de acordo com a característica desejada (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999).

Estas membranas podem ser submetidas a um processo de reticulação, com agentes como o glutaraldeído, resultando na formação de ligações covalentes entre os grupos amino da quitosana e aldeído do glutaraldeído. Essas ligações são irreversíveis e resistem às variações de pH e temperatura. Além disto, as membranas tornam-se inertes e resistentes ao meio ácido o que é interessante para o desenvolvimento de formulações orais (JOSUÉ et al., 2000).

Outra modificação também aplicada às membranas de quitosana é o emprego de formadores de poros como o polietilenoglicol (PEG) visando otimizar o sistema de liberação do princípio ativo. Li e colaboradores (2011) estudaram diferentes proporções de quitosana e PEG para a formação de membranas contendo vitamina B12 e sulfamerazina. Os autores constataram que as formulações contendo o agente de porosidade foram eficientes em controlar a liberação dos ativos estudados.

Também já foram avaliadas no desenvolvimento e preparo de órgãos artificiais (rins), apresentando alta resistência mecânica, elevada permeabilidade à ureia e à creatina e impermeáveis às proteínas séricas. Também foi descrita em ceratoplastias, exibindo a capacidade de induzir a vascularização corneal, evidenciando o seu potencial emprego em cirurgias oftálmicas (SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A adição de compostos bioativos às membranas é amplamente descrita na literatura. As possibilidades de impregnação das membranas são muito abrangentes, incluindo a obtenção de compósitos orgânico-mineral como quitosana/hidroxiapatita para o auxílio em operações de enxertia, em especial as que envolvem regeneração tecidual (GINANI et al., 1999).

As membranas podem ser impregnadas com diversos compostos orgânicos como antibióticos (demonstrando uma boa alternativa de curativo para feridas infectadas)

além de minerais (hidroxiapatita) (FWU-LONG MI, 2002; FWU-LONG MI et al., 2003).

Os compostos polifenólicos, por exemplo, podem contribuir para que as membranas apresentem seu efeito antioxidante e antimicrobiano mais pronunciado (FWU-LONG MI, 2002). Rubilar e colaboradores (2013) desenvolveram e avaliaram membranas de quitosana contendo carvacrol, um composto fenólico, e extrato de semente de uva (o qual é rico em compostos fenólicos), para intensificar funções da membrana como antioxidante e antimicrobiana. No mesmo sentido, trabalhos incorporam ativos como chá verde, chá preto, uma mescla de compostos fenólicos e catequina em matrizes de quitosana visando explorar seus possíveis efeitos bioativos e também controlar a sua liberação (WANG et al., 2013; VODNAR, 2012; ZHANG; KOSARAJU, 2007).

Siripatrawan e Harte (2010) testaram o extrato de chá-verde incorporado em membrana de quitosana para avaliação de sua atividade antioxidante devido à presença, neste extrato, de compostos fenólicos. Da mesma forma, estes compostos também foram associados à quitosana, na forma de nanopartículas, visando uma liberação controlada dos mesmos e assim promover futuras aplicações (ZHANG; KOSARAJU, 2007).

Este polímero tem a capacidade de formar filmes hidrofílicos que absorvem água. Os filmes de quitosana podem ser empregados no tratamento de queimaduras porque permitem a passagem de oxigênio, acelerando a cicatrização. Uma vantagem adicional é que, após a cicatrização, não há a necessidade de remover a membrana, pois as enzimas presentes nos tecidos epiteliais degradam o polímero permitindo a sua absorção, evitando-se os danos na área cicatrizada, causado pela remoção de curativos e bandagens (FINISIE et al., 2001).

Outros estudos têm explorado as características curativas da quitosana como promotora na cicatrização de feridas pela sua capacidade de acelerar a infiltração de células inflamatórias e ativar a migração de fibroblastos (SANTOS et al., 2003; KRAJEWSKA, 2005; WANG et al., 2002).

Um curativo de quitosana incorporando sulfadiazina de prata, aplicada na bicamada do curativo, mostrou manter uma excelente permeabilidade ao oxigênio, transmissão controlada de vapor d'água e capacidade de absorção de água. Além disso, o princípio ativo apresentou excelente atividade bactericida *in vitro* por até uma semana, nesta formulação (WILLI; CHANDRA, 2004).

A quitosana também estimula a proliferação de células e suas propriedades biológicas são muito úteis no tratamento de feridas. Membranas finas, flexíveis e transparentes à base de quitosana e alginato têm se mostrado eficientes quando comparadas à gaze no tratamento de feridas. Curativos de quitosana/alginato contendo antibióticos e analgésicos também foram testados em seres humanos, verificando-se efeitos tópicos benéficos no controle da infecção e redução no tempo de cicatrização das feridas (SHYONG et al., 2001).

Ainda, este polímero provê a estrutura para o crescimento celular, fornece proteínas para a cicatrização, fortalece o tecido em formação, atua como barreira contra micro-organismos, minimiza a deformação cutânea, além de estimular a coagulação sanguínea natural, absorver os fluidos provenientes da ferida (exsudato) e bloquear as terminações nervosas, reduzindo a dor (PAUL; SHARMA, 2004).

O bom potencial da quitosana em processos de cicatrização desperta grande interesse em pesquisas seja como curativo em queimaduras ou em processos de reconstituição. Neste contexto, Müller (2013) desenvolveu e testou membranas de quitosana impregnadas com óleo de cravo, considerando a boa atividade antimicrobiana da matriz vegetal.

Além disto, outros trabalhos envolvendo formulações com quitosana têm buscado empregar ativos naturais (GIBIS; ZEEB; WEISS, 2014; SILVA et al., 2013; MORITMOTO et al., 2012; CHAO, 2008).

2.3 Plantas medicinais

Os vegetais fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque,

na produção de meios de transporte e também para fins medicinais (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2004; TESKE; TRENTINI, 1995). Plantas medicinais conhecidas há muito tempo, são utilizadas em todo o mundo, sendo o uso dado por meio da automedicação ou pela recomendação de médicos e farmacêuticos (PETROVSKA, 2012).

A magnitude da biodiversidade mundial atual não é conhecida com exatidão, tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos. Calcula-se que há em torno de 250.000 espécies de plantas superiores, sendo em grande parte endêmicas da América Latina. Apenas o território brasileiro é habitat de cerca de 20-22% de todas as plantas e micro-organismos existentes (BRAZ FILHO, 2010; CALIXTO, 2005; GUERRA; NODARI, 2004). No Brasil, estima-se que a flora conste de aproximadamente 41.000 espécies (MARTINELLI; MORAES, 2013), sendo que 18.082 espécies de plantas vasculares são tidas como endêmicas (FORZZA et al., 2012).

As plantas possuem moléculas complexas e com inúmeras variações estruturais, as quais podem apresentar diversas atividades biológicas, conduzindo à descoberta de novos fármacos e, desta forma, constituindo-se em ferramentas importantes na pesquisa biomédica (NOLDIN; ISAÍAS; CECHINEL FILHO, 2006; CALIXTO, 2005).

A afirmativa supracitada é reforçada pelo fato que atualmente, mesmo com o avanço de novos processos de síntese orgânica e da biotecnologia, as plantas medicinais e seus extratos apresentam papel importante na terapêutica contemporânea, representando claramente uma janela de oportunidade para a indústria de medicamentos que busca o desenvolvimento de novos medicamentos e produtos de aplicação médico-farmacêutico (BRAZ FILHO, 2010; VILLAS BÔAS; GADELHA, 2007).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais está, em sua maioria, fundamentada no uso popular que foi sendo acumulado e passado cotidianamente de geração para geração (BRANDÃO et al., 2010; YUNES; SCHENKEL; CECHINEL FILHO, 2001).

O amplo emprego de plantas medicinais pela população, bem como o grande apelo pelo uso e desenvolvimento de produtos utilizando extratos provenientes de plantas, associado à concepção ilusória de que plantas medicinais e produtos derivados

dessas não fazem mal à saúde trazem a necessidade iminente de pesquisas relacionadas, bem como o desenvolvimento de apresentações farmacêuticas cujo uso pela população seja seguro e mais facilmente orientado.

Neste contexto, muitos trabalhos relatados na literatura científica exploram o potencial antioxidante, anti-inflamatório e cicatrizante de extratos vegetais e avaliam o desenvolvimento de novas formas farmacêuticas contendo estes extratos, para uso com finalidade médica (BORGES et al., 2013; MÜLLER, 2013; QUINTÃO et al., 2013; NAYAK et al., 2012; ANTONISAMY; DURAIPANDIYAN; IGNACIMUTHU, 2011).

Os extratos vegetais contem muitos compostos designados de metabólitos (primários e secundários) que são comumente usados para o tratamento de diversas doenças (BURI; DOELKER, 1980).

Muitos autores relatam os estudos sobre o potencial efeito benéfico de compostos fenólicos para a saúde humana (AHERNE; O'BRIEN, 2002; HOLLMAN, 2001; GELEIJNSE et al., 1999; HERTOG, 1996; HOLLMAN; KATAN, 1997). Este potencial é justificado pela atividade antioxidante e anti-inflamatória que estes compostos apresentam nos mais diversos modelos experimentais (EL-SHANAWANY et al., 2014; KANG et al., 2012; AADIL et al., 2012).

Inúmeros estudos têm explorado a ação anti-inflamatória de compostos fenólicos das mais diversas espécies, bem como sua ação antioxidante e anticâncer (OUESLATI et al., 2012; MUTHURAMAN; SOOD; SINGLA, 2011; BENINCÁ et al., 2011; ZHANG et al., 2011). Zhang e colaboradores (2011) estudaram 14 espécies vegetais quanto à atividade anti-inflamatória e obtiveram bons resultados ressaltando 4 espécies (*Scutellaria baicalensis* Georgi, *Taxillus chinensis* DC., *Sophora japônica* L. e *Mahonia fortunei* (Lindl.) Fedde) que tiveram expressivos resultados também para atividade antioxidante.

2.4 A espécie vegetal *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns X *Synadenium grantii* Hook f.

Euphorbia umbellata pertence à família Euphorbiaceae, a qual ocorre principalmente em ambientes tropicais e subtropicais, sendo considerada como uma das

maiores famílias de Angiospermas, formada por 4 subfamílias e com 218 gêneros (LEE et al., 2010). Muito comum no Brasil, contabilizam-se 72 gêneros e 1.100 espécies, sendo em torno de 500 espécies de ocorrência no nordeste do Brasil, das quais grande parte em área de caatinga (TRINDADE; LAMEIRA, 2014; ALVES, 1998).

Como plantas medicinais, as Euphorbiaceae são utilizadas desde a antiguidade, sendo exemplo a espécie *Euphorbia fischeriana* Steud., que é utilizada na medicina chinesa como medicamento anticancerígeno há mais de 2000 anos. Também, várias espécies do gênero *Croton* são tradicionalmente utilizadas na América Latina como remédios para uma grande variedade de enfermidades e processos dolorosos e algumas espécies são supostamente úteis para uma vasta gama de doenças, sendo vendidas ou utilizadas como remédios cura-tudo no Brasil (BITTNER, 2001).

Desta família, já foram identificados mais de 55 triterpenoides (tetra e pentacíclicos), que foram isolados tanto do látex, quanto de outras partes da planta (casca, folhas, flores, raízes e sementes). Também foram encontrados compostos fenólicos como flavonoides em vários gêneros e diferentes partes da planta, além de antocianidinas, cumarinas, lignanas, taninos, fenilpropanoides, quinonas, ácidos fenólicos, entre outros. Relatando-se também glicosídeos cianogênicos, além de ser muito comum a presença de várias classes de alcaloides, em particular nos gêneros *Croton*, *Phyllantus* e *Securinega* (JUDD et al., 2002; RIZK, 1987).

O gênero *Euphorbia* possui cerca de 2000 espécies e 4 subespécies amplamente distribuídas pelo mundo (ERNST et al.; 2015; HORN et al., 2012; ÖZBILGIN; ÇITOGLU, 2012). É conhecido por espécies que apresentam látex leitoso (ERNST et al., 2015; HORN et al., 2012). No Brasil, 13 espécies deste gênero apresentam indicações de uso popular, sendo *Euphorbia hirta* L., *Euphorbia hyssopifolia* L., *Euphorbia milii* Des Moul., *Euphorbia papillosa* A. St.-Hil., *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch. e *Euphorbia tirucalli* Boiss. as encontradas no estado do Paraná (TRINDADE; LAMEIRA, 2014).

Diversas espécies do gênero *Euphorbia* apresentam compostos irritantes como os diterpenoides, os quais podem ser isolados tanto do látex quanto de partes aéreas, folhas, raízes e sementes. Por outro lado alguns destes compostos podem apresentar

atividades terapêuticas como antibacteriana, antipirética e analgésica (ÖZBILGIN; ÇITOGLU, 2012). Estas características fazem com que estas espécies sejam utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças de pele e feridas, por exemplo (ÖZBILGIN; ÇITOGLU, 2012; TANG et al., 2012).

Ainda, diversas espécies do gênero são utilizadas pelo seu potencial anti-inflamatório como *Euphorbia royleana* Boiss., *Euphorbia seguieriana* Neck., *E. hirta*, *Euphorbia lactea* Haw., *Euphorbia kansui* T.N. Liou ex S.B. Ho, *Euphorbia heyneana* Spreng., *Euphorbia cyparissias* L. e *Euphorbia altotibetica* Paulsen (YANG et al., 2015; ÖZBILGIN; ÇITOGLU, 2012; SHI; SU; KIYOTA, 2008).

Na região dos Campos Gerais (Paraná, Brasil) a espécie denominada *Synadenium grantii* Hook f. já é estudada desde 2010 pelo grupo de pesquisa do pesquisador doutor Flávio Luís Beltrame. Da mesma forma, em Goiás, outro grupo de pesquisa (liderado pela pesquisadora doutora Marize Campos Valadares) já realizou e publicou estudos com uma espécie vegetal identificada como *Synadenium umbellatum* Pax (BORGES et al., 2013; MOTA et al., 2012; MELO-REIS et al., 2010; VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007). Observando os resultados dos trabalhos produzidos para as duas citadas espécies, Luz e colaboradores (2015) propuseram uma investigação de ambas as espécies. Como conclusão do trabalho, os pesquisadores determinaram que se tratavam da mesma espécie vegetal, identificada com o auxílio da taxonomista Inês Cordeiro do Instituto Botânico de São Paulo (especialista em *Euphorbia*), sob o nome *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (LUZ et al., 2015).

A espécie *E. umbellata* (Euphorbiaceae) é habitualmente encontrada no sul do Brasil e é conhecida pelos nomes populares de janaúba ou leitosinha. É usada como planta medicinal na cultura popular, na forma de garrafada ou extrato das partes da planta, para tratamento de quadros inflamatórios, úlcera gástrica e por suas propriedades analgésicas (HASSAN; MOHAMMED; MOHAMED, 2012; OLIVEIRA et al., 2005). Na Índia, o látex é utilizado popularmente com finalidade analgésica (BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988).

O uso popular da espécie *E. umbellata* na região centro-oeste do Brasil é relatado por Ortêncio (1997), recomendando o uso de 18 gotas do látex da planta em 1L de água,

conserva-se em geladeira, e se administra um cálice de licor pela manhã, à tarde e à noite para a cura e prevenção de câncer.

A espécie *E. umbellata* é uma planta arbustiva que pode atingir entre 3 e 5 metros de altura, nativa da África tropical, mas é encontrada em países como o Brasil e a Índia onde foi introduzida, a princípio, como planta ornamental (OLIVEIRA et al., 2005; BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988).

O látex da planta é potencialmente tóxico (COSTA, et al., 2012), sendo comum haver ocorrência de intoxicação e lesões em crianças e animais, tanto por ingestão como por contato com a pele e os olhos (DO CAMPO et al., 2010; BAGAVATHI; SORG; HECKER, 1988).

A literatura relata que uma proteína (lequitina) do látex foi isolada desta espécie vegetal e apresentou uma importante atividade de hemaglutinação (DURGAWALE et al., 2001; PREMARATNA et al., 1984a). Estes estudos ainda relatam que se detectou uma propriedade biológica desta em suprimir o crescimento tumoral de fibrosarcoma, bem como inibir a síntese de proteína em células de tumor de Yoshida (PREMARATNA et al., 1984b).

Também, nesta espécie encontram-se enzimas proteolíticas. Menon e colaboradores (2002) isolaram e caracterizaram duas serino-proteases do látex, e também uma glicoproteína com atividade fibrinolítica humana, a qual pode ser de importância no processo de hemostasia (RAJESH et al., 2006).

Costa e colaboradores (2010) comparam as enzimas proteolíticas do látex de plantas como a *E. umbellata* com o veneno de cobras e salientam estas enzimas como potenciais ferramentas no desenvolvimento de medicamentos para a prevenção e tratamento de muitas enfermidades como trombose e desordens cardiovasculares.

Pesquisas com o látex desta mesma espécie demonstraram atividade citotóxica antitumoral frente a células de melanoma (B16F10) e indícios de ação protetora gástrica apesar da toxicidade (OLIVEIRA et al., 2013; COSTA et al., 2012).

E. umbellata, é recomendada popularmente para cura e prevenção do câncer. O potencial citotóxico e mutagênico desta espécie foi verificado (CUNHA et al., 2009;

VALLADARES; CASTRO; CUNHA, 2007), e os extratos das partes aéreas desta planta demonstraram um potencial antitumoral e antiangiogênico promissor (MOTA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2008).

Alguns estudos científicos sobre a composição química e o potencial biológico da espécie *E. umbellata* estão descritos na literatura, como o apresentado por Kinghorn (1980) que isolou do látex da planta o 12-*O*-tigloil-4-deoxiforbol-13-isobutirato, uma substância que é irritante à pele. Outros ésteres diterpenos tipo tiglianos, foram isolados do látex da *E. umbellata* por Bagavathi, Sorg e Hecker (1988), mas não os do tipo ingenano, o que contrasta com as demais euforbiáceas e pode representar um importante diferencial quimiotaxonômico desta espécie.

Ainda, Hassan, Mohammed e Mohamed (2012) isolaram do extrato clorofórmico das folhas de *E. umbellata*, dois ésteres diterpenos do tipo forbol inéditos até então. Os autores também avaliaram a capacidade biológica deste extrato e encontraram atividade antiparasitária *in vitro* para *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Plasmodium falciparum*, e também encontraram atividade citotóxica frente a células de fibroblastos de pulmão humano fetal (MRC-5).

Das folhas de *E. umbellata*, Anderssen e colaboradores (2010) também isolaram seis antocianinas, quatro destes compostos com um monossacarídeo apiosil que até então não havia sido encontrado ligado a antocianinas.

Dasari e colaboradores (2012) realizaram uma quantificação de fenólicos totais e alcaloides, e observaram que a planta possui uma quantidade significativa destes metabólitos secundários.

Recentemente, resultados demonstraram que os extratos da casca de *E. umbellata* tem capacidade anti-inflamatória comparada a fármacos tradicionalmente usados na terapêutica (ex. ibuprofeno), sendo capaz de reduzir edemas causados por carragenina (MUNHOZ et al., 2014).

A *E. umbellata* possui uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, mas fica evidente pelo amplo uso popular e pelas pesquisas científicas já realizadas, que o

potencial farmacológico da espécie é muito promissor e mais estudos devem ser realizados para contribuir com o conhecimento sobre esta planta (MACHADO, 2008).

2.5 Compostos fenólicos e inflamação

Inflamação é um processo dinâmico como resposta do organismo a uma lesão tecidual, a qual é pode ter um agente de natureza química, física ou biológica. Esta resposta ocorre de modo estereotipado, ou seja, inespecífico, com o envolvimento de diversas células e substâncias que geram um complexo de alterações teciduais, inclusive nos tecidos adjacentes não lesionados (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; GUYTON; HALL, 2006; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

São comumente utilizadas duas classes de medicamentos anti-inflamatórios, os glicocorticoides e os anti-inflamatórios não esteroidais. Os efeitos colaterais destes medicamentos acabam muitas vezes por limitar seu uso e acentuar a necessidade de encontrar novos agentes capazes de demonstrar um efeito terapêutico satisfatório, porém com atenuados efeitos colaterais (BORGES et al., 2013; DINARELLO, 2010; COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Neste cenário, destacam-se os compostos fenólicos, grupo de moléculas com diferentes graus de complexidade, podendo ser encontrados livres ou conjugados (com açúcares ou proteínas), os quais são oriundos do metabolismo secundário das plantas (PEREIRA & CARDOSO, 2012; SOARES, 2002). A gama de atividades biológicas destes compostos é bastante diversificada incluindo, entre outras, antimicrobianos, antioxidantes, vasodilatadores, antidiabéticos, anticâncer, antialérgicos e anti-inflamatórios (ASGAR, 2013; MARTINS et al., 2011; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Atualmente, diversos estudos têm explorado o potencial dos compostos fenólicos como agentes anti-inflamatórios (NADPAL et al., 2016; MAJID et al., 2015; TIMMERS et al., 2015; ZHANG et al., 2011). Neste sentido, Zhang e colaboradores (2011) estudaram 14 espécies vegetais empregadas na medicina chinesa quanto à presença de compostos fenólicos, flavonoides, atividade antioxidante e atividade anti-inflamatória. Estes pesquisadores encontraram forte correlação entre a quantidade de

compostos fenólicos e as atividades antioxidante e anti-inflamatória, sendo que 4 espécies se destacaram *Scutellaria baicalensis*, *Taxillus chinensis*, *Sophora japonica* e *Mahonia fortunei*, tendo as maiores concentrações de compostos fenólicos e maiores atividades antioxidante e anti-inflamatória.

Neste âmbito, recentes estudos têm sido desenvolvidos avaliando a presença de compostos fenólicos e atividade anti-inflamatória, e uma ampla gama de espécies está sendo testada como *Dendropanax morbifera*, *Rubus chamaemorus*, *Styrax ramirezii*, *Rosa canina* e *Rosa arvensis* (NADPAL et al., 2016; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2016; TIMMERS et al., 2015; HYUN et al., 2015), incluindo espécies do gênero *Euphorbia* (Euphorbiaceae) como *Euphorbia dracunculoides*, *Euhorbia supina*, *Euphorbia helioscopia* e *Euphorbia hirta* (CHEN et al., 2015; SALEEM et al.,2015; CHAE et al., 2015).

Apesar das crescentes pesquisas, na literatura, são quase inexistentes trabalhos com a espécie *E. umbellata* no mesmo sentido. Borges e colaboradores (2013) avaliaram extratos desta espécie quanto à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em animais, obtendo resultados promissores, porém não avaliaram a presença de compostos fenólicos e flavonoides de forma que possibilitasse uma correlação. Por outro lado, Munhoz e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antioxidante e também anti-inflamatória desta espécie vegetal e observaram resultados favoráveis além de detectarem a presença de compostos fenólicos no extrato bruto das cascas do caule.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar uma forma farmacêutica de administração tópica, utilizando como matriz membranas de quitosana impregnadas com a fração metanólica do extrato das cascas do caule da espécie *Euphorbia umbellata* e avaliar parâmetros cromatográficos, antioxidantes, microbiológicos e de permeação cutânea desta formulação.

3.2 Objetivos específicos

- Obter o extrato bruto das cascas do caule de *E. umbellata* pelo processo de maceração;
- Fracionar o extrato bruto das cascas do caule de *E. umbellata* utilizando extração por Soxhlet;
- Realizar a quantificação espectrofotométrica dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes nas frações obtidas (hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica);
- Identificar e/ou sugerir substâncias presentes na fração metanólica do extrato das cascas do caule de *E. umbellata* utilizando a técnica de LC-MS-QTOF;
- Propor e analisar diferentes formulações de membranas de quitosana contendo extrato bruto e fração metanólica;
- Caracterizar as membranas obtidas por meio de espectroscopia de infravermelho (IV), difração de raios X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), densidade, análise térmica (DSC e TGA) e espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS);
- Avaliar as características de estabilidade das membranas obtidas utilizando as técnicas de espectroscopia no UV-VIS e de IV;
- Avaliar o potencial das membranas obtidas, por meio de experimentos antioxidantes e antimicrobianos;
- Avaliar a permeação percutânea dos compostos fenólicos da fração metanólica empregando o método de célula de difusão vertical de Franz.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação botânica do material vegetal

A determinação botânica da espécie vegetal em estudo foi realizada pelo Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, mediante depósito de exsicata identificada com o número 363509. O material vegetal foi coletado na região de Ponta Grossa (Paraná, Brasil) – altitude: 975 metros, latitude: 25°05’38”S, longitude: 50°09’30”W.

4.2 Obtenção do extrato bruto

As cascas do caule da espécie em estudo foram cortadas e submetidas à secagem ao ar livre (temperatura ambiente), ao abrigo da luz, em local bem ventilado, por 14 dias, protegido da poeira e do ataque de insetos e animais. O material, após a secagem, foi moído com o auxílio de um liquidificador e submetido à extração por maceração fracionada a frio com solução hidroalcoólica 30:70 (água:etanol, V/V), durante oito dias, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para tanto, foi utilizada uma massa de 334 g de material vegetal e a solução de extração, na proporção 1:5 (m/V), foi trocada a cada dois dias. As soluções reunidas foram filtradas e concentradas em rota-evaporador (rota-evaporador Fisatom® 803; banho-maria Fisatom® 558; bomba de vácuo Marconi® MA053) em temperatura de 40°C (± 2 °C) e o material obtido foi reunido e liofilizado. O processo de extração resultou na obtenção de 70 g de extrato seco (rendimento de 21% p/p). Este material foi armazenado sob refrigeração (4 °C) até o momento do uso.

4.3 Fracionamento do extrato bruto

Para obtenção da fração metanólica (e demais frações do particionamento) foi utilizado um extrator Soxhlet. Para tanto, pesou-se 40,32 g de extrato bruto de *E. umbellata*, que foram misturados com 20,10 g de sílica Kieselgel 60® (35-70 mesh, Merk) e colocadas em um cartucho de extração. Foram empregados quatro solventes em gradiente crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol (PA, Synth, Diadema, SP, Brazil). O volume de líquido extrator foi de 730 mL e, para cada um dos solventes empregados, o tempo de extração foi de 24 horas. Após este período, as frações foram secas e mantidas sob refrigeração (4 °C). O rendimento das frações foi:

1,67% de fração hexânica, 5,46% de fração clorofórmica, 0,84% de fração acetato de etila e 92,03% de fração metanólica.

4.4 Determinação do teor de fenólicos totais

A análise do teor de fenólicos totais do extrato bruto e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol foi realizado de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (Dinâmica®). Para tanto, o extrato bruto e as frações foram solubilizados em seus respectivos solventes de obtenção, de modo a obter uma solução de concentração igual a 20 $mg.mL^{-1}$. A partir desta solução, foram retiradas alíquotas de 500 µL e adicionadas a balões de 10 mL (concentração final de 1 $mg.mL^{-1}$). Em seguida, 200 µL desta diluição foram transferidos para um tubo de ensaio e combinados com 7,0 mL de água destilada, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteau e, após exatos 30 segundos, adicionou-se 2,5 mL de solução de carbonato de sódio 10,6% (m/V) (PA, Biotec®). Os tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 50 °C durante 5 minutos. Após este período, foram retirados do banho-maria e resfriados e, então, a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Genesys® 10) em 715 nm (SWAIN e HILLS, 1959; MUNHOZ et al., 2014). O branco foi preparado da mesma forma das amostras, substituindo-se a amostra por água destilada. A curva analítica foi obtida com soluções padrão de ácido gálico (Merck®) de 50, 100, 200, 400, 600 e 800 $\mu g.mL^{-1}$, que foram submetidas ao procedimento descrito anteriormente, em triplicata. Os resultados das leituras foram expressos em mg de ácido gálico por g de amostra.

4.5 Determinação do teor de flavonoides totais

A concentração de flavonoides foi determinada adaptando-se o método descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. O extrato bruto e as frações foram dissolvidos em seus respectivos solventes. Uma alíquota referente a 100 mg foi combinada com 250 µL de solução de metenamina 0,5%, 5,0 mL de acetona e 0,5 mL de ácido clorídrico (PA, Synth®). A mistura foi submetida a refluxo durante 30 minutos, filtrada e transferida para balão de 100 mL, sendo o volume acertado com acetona, para a obtenção do que se denominou "solução-mãe" na concentração de 1 $mg.mL^{-1}$. A partir desta solução foi retirada uma alíquota de 20,0 mL, a qual foi submetida à extração líquido-líquido com

20,0 mL de água destilada e 15,0 mL de acetato de etila (PA, Synth®). Após a separação da fase orgânica, o procedimento foi repetido mais três vezes (com a fase aquosa), utilizando-se mais 10,0 mL de acetato de etila cada vez. As fases orgânicas foram reunidas e lavadas com 50,0 mL de água destilada. A fase orgânica resultante foi transferida para balão de 50,0 mL e o volume foi completado com acetato de etila (solução de análise). A partir desta solução, foi transferida uma alíquota de 4 mL para balão de 10,0 mL, adicionou-se 0,4 mL de cloreto de alumínio 2% (m/V) (Vetec®)e o volume foi completado com ácido acético metanólico 5% (V/V). Após 30 minutos de repouso, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Genesys® 10) em 425 nm. O branco foi preparado transferindo-se alíquota de 4,0 mL da solução de análise e ajustando-se o volume com ácido acético metanólico 5% (V/V). A curva analítica foi realizada com concentrações de 0,1 , 0,2 , 0,5 , 1 , 2 , 3 , 4 , 5 $\mu g.mL^{-1}$ de quercetina (Rhodia® Pharma) que foram submetidas à metodologia descrita anteriormente, em triplicata. Os resultados das leituras foram expressos em mg de quercetina por g de amostra.

4.6 Avaliação cromatográfica qualitativa de compostos presentes na fração metanólica de *E. umbellata*

Utilizou-se cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UHPLC Agilent 1290®, Agilent Technologies) acoplado a um detector de massas (Agilent QToF-MS 6530®, MODELO G6530A Agilent Technologies). Os parâmetros de operação do aparato LC-MS foram: obtenção dos espectros em modo ESI+ e ESI-, temperatura do gás: 250 °C, vazão do gás: 9 $L.min^{-1}$, tensão capilar: 3,0 kV e fragmentador: 125 V. A separação cromatográfica foi obtida em coluna ZORBAX SB-C18 RRHD 1,8 µm (2,1 x 150 mm), vazão de 0,21 $mL.min^{-1}$ com fase móvel (A) água e (B) acetonitrila, ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O modo de eluição deu-se da seguinte forma: A 90%: B 10% por 10 minutos, seguido dos gradientes A 80%: B 20% em 15 minutos e até 100% de B nos últimos 10 minutos. A temperatura da coluna foi de 35 °C e o volume de injeção usado foi de 3 µL e a concentração de fração metanólica foi de 40 $mg.mL^{-1}$ (solubilizado em água ultrapura). Os espectros foram obtidos em modo *scan* 200-400 nm. Todas as operações, aquisições e análises foram controladas pelo programa Agilent

MassHunter Acquisition Software® (Agilent Technologies), versão A.05.00 e processadas pelo programa MassHunter Qualitative Analysis Software® (Agilent Technologies), versão B.05.00. As amostras foram analisadas no modo positivo e negativo no intervalo de razão massa/carga (m/z) = 150-1500. A medida de exatidão das massas, para confirmação das substâncias obtidas, foi obtida pelo método de correção da média dos íons usando massas de referência m/z 121,0509 (purina protonada) e m/z 922,0098 (1H,1H,3H-tetrafluoropropoxi, ou HP-921) em modo positivo, enquanto para o modo negativo foram usadas as massas referência m/z 112,9856 (ácido trifluoroacético protonado, TFA) e m/z 1033,9881 (TFA+HP21). As amostras foram dissolvidas em água ultrapura, filtradas por microfiltros de 22 µm (MARCA MF-Millipore), e então injetadas no equipamento via junção do tipo T usando uma bomba isocrática Modelo G1310B (Agilent Technologies®) numa taxa de vazão de 0,7 $mL.min^{-1}$. Os padrões de quercetina, galato de etila, ácido gálico e ácido elágico foram adquiridos da Sigma-Aldrich® com teores de pureza superiores a 98.5%.

4.7 Desenvolvimento das membranas de quitosana

A fim de obter uma formulação e um procedimento que gerassem membranas homogêneas e adequadas quanto à resistência e maleabilidade, foram testadas diversas composições e condições nas etapas de produção, de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1. Fatores avaliados no processo de desenvolvimento das membranas de quitosana

(CONTINUA)

Fator		**Condição (Concentração/ Tempo/Tempratura/ Material)**
Tipo de quitosana	Polymar®	1% (m/m)
	Média massa molecular (Sigma-Aldrich®, 448877)	1%, 1,5%, 2% e 3% (m/m)
	Baixa massa molecular (Sigma-Aldrich®, 448869)	1% (m/m)
Ácido acético	Solução aquosa	1% e 2% (V/V)
Extrato/Fração	Extrato Bruto (liofilizado)	Solução hidroalcoólica 3% (m/m em relação ao peso de quitosana)
		Solução aquosa 3% (m/m em relação ao peso de quitosana)
	Fração Metanólica	10%, 30%, 50%, 80%, 100% e 110% (m/m, em relação à massa de quitosana)
Excipientes	Benzoato de sódio	0,1% (m/V)
	Glicerina	0%, 2%, 3%, 4% e 5% (m/m em relação ao peso de quitosana)
	PVP	5% (m/m em relação ao peso de quitosana)
	TWEEN 80® (Polissorbato)	0,2% (m/m em relação ao peso de quitosana)

Tabela 1. Fatores avaliados no processo de desenvolvimento das membranas de quitosana

(FINAL)

	PEG 400	1,5% (m/m em relação ao peso de quitosana)
Molde	Placa de Petri	Vidro
		Plástico
Casting	Tempo (horas)	18, 6 e 4
	Temperatura (°C)	65, 60 e 55
Lavagem	Solução de hidróxido de sódio 2% (m/V)	Temperatura ambiente
	Água destilada	20 °C e 4 °C

Foram avaliados, neste trabalho, diferentes tipos de quitosana: quitosana Polymar® (sem caracterização ou purificação), quitosana de média massa molecular Sigma-Aldrich® (75 a 85% de desacetilação, 448877) e quitosana de baixa massa molecular Sigma-Aldrich® (75 a 85% de desacetilação, 448869). A quitosana que apresentou melhores características de formação de filme foi a de baixa massa molecular, sendo então escolhida para dar seguimento ao desenvolvimento da formulação. Em seguida, foram testadas diferentes concentrações (1%, 1,5%, 2% e 3%) deste polímero e a que se demonstrou mais viável ao processo de obtenção das membranas foi 1,5%, sendo assim, selecionada. A quitosana foi solubilizada em soluções de ácido acético a 1% e a 2%, porém a maior concentração não apresentou vantagens em relação à de menor concentração, sendo que a solução de 1% foi adotada.

As membranas com ativo foram desenvolvidas com o extrato bruto das cascas do caule de *E. umbellata* e, posteriormente, com a fração metanólica do extrato das cascas do caule de *E. umbellata* (FM), uma vez que essa fração apresentou maior concentração dos compostos de interesse (fenólicos).

Quanto aos excipientes, a glicerina é o plastificante mais empregado para formulações de membranas de quitosana, sendo assim, testou-se o mesmo em diferentes

concentrações, sendo definida a concentração de 5% a mais adequada. Porém, frente à adição da FM na formulação, ocorreu precipitação da mesma em presença de glicerina, de modo que este excipiente foi descartado e o emprego do TWEEN 80® (0,2%) foi determinado para auxiliar na dispersão da FM na formulação. Avaliou-se o uso de um conservante, sendo escolhido o benzoato de sódio a 0,1%, para ampliar a vida útil das membranas. Alguns trabalhos utilizam agentes formadores de poros, com este propósito, foram testados PVP e PEG 400 na formulação, tendo o último atingido o objetivo satisfatoriamente.

As membranas de quitosana são obtidas por meio de um processo térmico denominado *casting*, para o qual se variou e o tempo e a temperatura. Ainda relacionado a este processo, variou-se o tipo de molde sendo os materiais vidro e plástico, visto que apresentam condutividade térmica distinta. A etapa final de lavagem foi estudada também, porém, não se demonstrou viável ao processo e foi descartada.

4.8 Determinação da concentração de FM

Para determinar a concentração de fração metanólica a ser incorporadas às membranas, estabeleceu-se uma proporção de massa de FM em relação à massa de quitosana contido em uma membrana.

Foram realizados testes em concentrações crescentes de FM na formulação, citadas na Tabela 1, sendo determinado que a maior concentração possível de ser incorporada foi a de 100% de FM em relação à massa de quitosana (1:1, m/m). Concentrações acima disto apresentaram precipitação da FM, sendo inadequadas para o trabalho. A partir disto foi definida uma concentração mediana, de 50% e uma 10%, tendo assim 3 diferentes concentrações para dar seguimento ao estudo.

4.9 Condição de preparo das membranas de quitosana

4.9.1 Membrana base (MB)

Preparou-se uma solução de quitosana (Sigma-Aldrich® de massa molecular média, 75 a 85% de desacetilação, 448877) na concentração de 1,5% (m/V) em solução de ácido acético 1% (V/V) sob agitação constante por 60 minutos. Após este tempo de

mistura, filtrou-se o material em gaze estéril e adicionou-se ao filtrado 0,1% de benzoato de sódio (conservante). Homogeneizou-se por 20 minutos e, na sequência, adicionou-se 1,5% de PEG 400 (polietilenoglicol) (m/m) e 0,2% de TWEEN 80® (m/m), mantendo-se a agitação por mais 20 minutos. Da solução resultante foram então vertidos 7,5 g em placa de Petri de plástico (60x15 mm) previamente lubrificada com PEG 400. As placas foram levadas para estufa a 55 °C (±5 °C) por 4 horas; após este período foram resfriadas em temperatura ambiente e então retiradas das placas, embaladas em plástico de forma unitária.

4.9.2 Membranas contendo FM

Para as membranas contendo a FM, o preparo deu-se do mesmo modo descrito anteriormente até a adição do conservante. Então, pesou-se quantidades correspondentes a 10% (M10FM), 50% (M50FM) e 100% (M100FM) de FM em relação à massa de quitosana, adicionou-se à FM o PEG 400 e o TWEEN 80®, homogeneizou-se com o auxílio do bastão de vidro; incorporou-se quantidade suficiente da solução de quitosana e homogeneizou-se durante 40 minutos dando prosseguimento a obtenção das membranas da mesma forma que foram obtidas as MB.

4.10 Caracterização das membranas de quitosana

4.10.1 Microscopia eletrônica – MEV e FEG

A avaliação morfológica e de superfície foi efetuada no microscópio eletrônico de varredura VEGA3 TESCAN e no microscópio eletrônica de varredura por efeito de campo MIRA3 TESCAN (ambos disponíveis no C-LABMU da UEPG). Para realizar as análises, as membranas foram seccionadas, devidamente fixadas em suporte próprio para a análise e então revestidas com ouro-paládio (Au-Pd) por deposição (*sputtering*) de forma a tornar condutoras as superfícies das amostras. Após a obtenção, algumas imagens foram submetidas ao tratamento pelo software *ImageJ* (Wayne Hasband USA) para estimativa de porosidade.

4.10.2 Densidade

Para realizar as medidas de densidade, as membranas foram preparadas previamente em placas de Petri de plástico. As medidas de densidade foram feitas pelo método de Arquimedes (aparato disponível no C-LABMU da UEPG – Figura 4).

Brevemente, o princípio de Arquimedes trata da resposta de um fluido à presença de um corpo sólido presente nele e se baseia no princípio da ação simultânea de duas forças, o empuxo (E - força vertical ascendente aplicada pelo fluido) e o peso. A intensidade do E é igual ao peso do fluido deslocado pelo corpo submerso (da SILVA, 2011). Sendo este princípio representado por:

$$(1)\quad \rho_c = \frac{m}{m-m_a}\rho_F$$

Onde:

ρ_c = densidade aparente ($g.cm^{-3}$)

m = massa seca (g)

m_a = massa imersa (g)

ρ_F = densidade do líquido na temperatura da medida

A equação (1) permite que a densidade de um corpo de forma geométrica qualquer, possa ser determinada em função da densidade do fluido em que ele foi imerso. Foi utilizado hexano (PA, Vetec®) para as medidas e uma balança, marca Shimadzu, modelo AY220, com precisão de 10^{-4} g. Cada medida foi realizada em triplicata.

Figura 4. Balança analítica com aparato para medida de densidade pelo princípio de Arquimedes

4.10.3 Calorimetria diferencial de varredura (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA)

Para realizar as análises térmicas foi utilizado um equipamento STA NETZCH 409 PC/PG (Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (COMCAP) da Universidade Estadual de Maringá (UEM)). Foram separadas amostras de aproximadamente 7 mg de cada membrana, os quais foram acondicionados em cadinhos de platina. Os termogramas foram obtidos sob fluxo de nitrogênio (20 $mL.min^{-1}$), a uma taxa de aquecimento de 10°$C.min^{-1}$, a faixa de temperatura foi de 20 °C e 550 °C.

4.10.4 Difração de raios X (DRX)

As membranas foram examinadas utilizando um difratômetro de raios X (SHIMADZU XRD-6000) com as seguintes especificações de análises: scan de 2°$.min^{-1}$, 2θ, varredura de 5° a 50°, radiação Kα (λ = 1,5418 Å) do cobre, 40 mA e 40 kV de tensão.

4.10.5 Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourrier (FTIR)

A identificação dos grupos funcionais e as possíveis variações dos mesmos foram avaliadas por espectroscopia na região do infravermelho, em pastilha com KBr, empregando 4 mg de amostra para 200 mg de KBr grau espectroscópico (2% de massa, Sigma-Aldrich®). O equipamento utilizado foi um espectrômetro SHIMADZU®, modelo IR PRESTIGE-21 (Kioto, Japão), nas condições de análise de 32 scans.min^{-1} e resolução de 4 cm^{-1}. A faixa de número de onda usada foi de 400 a 4000 cm^{-1}. Foi realizado um estudo de tempo (0, 7, 14, 21 e 28 dias) com amostras MB preparadas em placas de Petri de plástico e de vidro. Os espectros obtidos das membranas com FM (M10FM, M50FM e M100FM) foram avaliados frente ao espectro da MB, todas preparadas em placas de Petri de plástico.

4.10.6 Determinação de cor

Os valores de cor das membranas foram determinados utilizando a técnica difusa em espectrofotômetro Varian® (Cary 50) equipado com uma sonda de reflexão difusa Barrelino. As amostras foram colocadas sobre uma superfície branca para efetuar as medidas e a escala CIELAB foi utilizada para as medidas de cor: de L^* = 0 (preto) para L^* = 100 (branco), de $-a^*$ (verde) para $+a^*$ (vermelho) e de $-b^*$ (azul) para $+b^*$ (amarelo). Os valores para a calibração do branco foram gerados a partir da média de 10 leituras de uma folha de papel sulfite. A mudança de cor foi avaliada comparando as diferenças entre as membranas. A diferença total de cor foi calculada pela seguinte fórmula (LECETTA; GUERRERO; CABA, 2013):

$$\Delta E^* = \sqrt{(L^*_{padrão} - L^*_{amostra})^2 + \left(a^*_{padrão} - a^*_{amostra}\right) + (b^*_{padrão} - b^*_{amostra})^2}$$

Os valores estão expressos em médias de 10 medidas de cada membrana, sendo que para cada concentração as amostras foram preparadas em triplicata.

4.11 Atividade antioxidante

4.11.1 Preparo das amostras

A obtenção das amostras foi realizada de acordo com método de Alves, Mainardes e Kalil (2016) com adaptações. As alíquotas foram coletadas nos tempos: 0, 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. Para tanto foram preparadas amostras MB, M10FM, M50FM e M100FM, em triplicata, para cada tempo. Adicionou-se 10 mL de água destilada sobre cada membrana (em placa) e, após o tempo determinado, o líquido foi coletado, liofilizado e armazenado até o momento da análise. Para a realização dos testes as amostras foram solubilizadas em 10 mL de metanol (PA, Synth®).

4.11.2 Ação scavenger sobre o DPPH$^{\bullet}$

A atividade das amostras foi testada frente a 60 µM do radical DPPH$^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil, Sigma-Aldrich®) solubilizado em etanol absoluto (SOARES et al., 2002). O meio reacional foi composto por alíquotas de 1 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL e 75 µL das amostras, 300 µL da solução de DPPH$^{\bullet}$, e o volume completado com etanol absoluto para 1000 µL. A mistura foi incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade foi observada pelo decréscimo na absorbância em 531 nm. A leitura foi realizada em leitor de Elisa (leitor de placas) (Biotek®, µQuant).

4.11.3 Ação scavenger sobre o ABTS$^{\bullet+}$

Primeiramente foi preparado o radical catiônico ABTS [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] (Sigma-Aldrich®) reagindo 5 mL de solução aquosa de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (2,46 mM). Esta reação deu-se em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por um período de 12 a 16 horas antes do uso (PELLEGRINI et al., 1999). Previamente ao ensaio, diluiu-se a solução de ABTS$^{\bullet+}$ com tampão fosfato de sódio 10 mM (1:20). Alíquotas de 1 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL, 50 µL e 75 µL das amostras foram adicionadas em eppendorf, juntamente com 300 µL do reagente ABTS$^{\bullet+}$ e o volume foi completado para 1000 µL de meio reacional. Então, deu-se uma incubação de 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A leitura foi realizada leitor de Elisa (leitor de placas) (Biotek®, µQuant) em 734 nm.

4.12 Atividade antimicrobiana – difusão em ágar

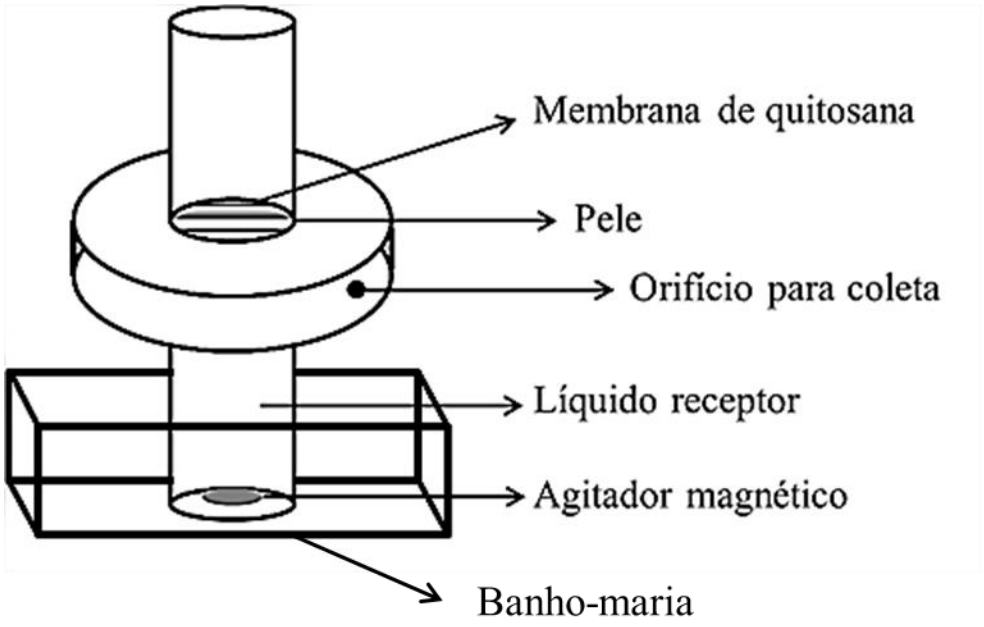
Amostras MB, M10FM, M50FM e M100FM, foram preparadas para avaliar a atividade bacteriostática contra cinco micro-organismos distintos. Foram utilizadas colônias puras de cepas padrão ATCC® de *Escherichia coli* (ATCC® 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), *Candida albicans* (ATCC® 90028) e *Enterococcus fecalis* (ATCC® 29212), provenientes de cultivo recente (18-24 horas), isoladas a partir de meio de cultura não seletivo. O meio de cultura utilizado para as bactérias foi Ágar Müeller-Hinton, em placas de Petri de 90 mm (diâmetro), em pH 5,5 e 7,2. O antimicrobiano utilizado como controle foi amicacina. Para o fungo, o meio de cultura foi Ágar Müeller-Hinton com 2% de glicose e 0,5 $\mu g.mL^{-1}$ de azul de metileno. O controle utilizado foi clorexidina. Para a inoculação foi preparada uma suspensão em salina estéril (NaCl 0,9%) com turvação grau 0,5 da escala McFarland ($1x10^8$ $UFC.mL^{-1}$ bactérias; $1x10^6$ $UFC.mL^{-1}$ fungos). As membranas foram cortadas em discos de 5 mm de diâmetro e colocados sobre os meios inoculados. As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas. Após o período de incubação, as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento e, nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido com auxílio de uma régua milimétrica. Foram considerados valores positivos, halos de inibição maiores que 8 mm (SILVA et al., 2010).

4.13 Estudo de permeação *ex vivo* – célula de difusão de Franz

As análises de permeação cutânea foram realizadas em sistemas de difusão vertical tipo Franz (Figura 5), com solução receptora água ultrapura MiliQ®. O volume de líquido receptor foi de 12 mL, homogeneizado sob agitação magnética a 200 rpm, e a área de permeação de 1,77 cm^2. A membrana utilizada para a permeação foi pele humana proveniente de cirurgia plástica, preparada conforme protocolo padronizado no laboratório de Produtos Farmacêuticos da UEPG. O sistema foi estabilizado e mantido a 36 °C (± 2 °C) durante o teste. As amostras foram feitas em triplicata. Alíquotas de 600 µL foram coletadas do líquido receptor nos tempos de 2, 4, 8, 12 e 24 horas; este mesmo volume de água ultrapura foi recolocada nas células de Franz após cada coleta. As amostras foram liofilizadas e analisadas posteriormente por cromatografia líquida de

ultra eficiência acoplada a detector de massas (UHPLC-MS) de acordo com a metodologia apresentada no tópico 4.6.

Figura 5. Esquema da célula de difusão vertical de Franz



4.14 Análise estatística

Os valores experimentais estão expressos em médias ± desvio padrão (DP) ou média ± erro padrão da média (EP). Os dados das análises de cor e antioxidante foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism® 5.01 (GraphPad Software, Inc), com nível de significância de 5% ($P<0,05$). Os testes de correlação linear foram realizados no programa Statistica® 8.0 (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007).

4.14.1 Quimiometria – análise multivariada

Para avaliar os dados de FTIR das amostras MB feitas em moldes de vidro e de plástico, no estudo de tempo, foi realizada uma análise quimiométrica PCA (Análise de Componentes Principais), empregando o software Matlab (versão 7.5.0, Release 2017b), com o acompanhamento do professor Airton Kist (Departamento de Matemática e Estatística – UEPG).

.

.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *E. umbellata*, dentre seus usos populares, é utilizada para tratar quadros inflamatórios (BORGES, et al. 2013). A literatura traz indícios do potencial anti-inflamatório da espécie, o qual estaria correlacionado com a presença de compostos fenólicos em seus extratos (MUNHOZ et al., 2014; DASARI et al., 2012).

Os compostos fenólicos são moléculas oriundas do metabolismo secundário de plantas, os quais se apresentam como potenciais agentes antimicrobianos, antioxidantes e anti-inflamatórios (ASGAR, 2013; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Desta forma, de acordo com as informações apresentadas acima, a determinação da presença e quantidade de compostos fenólicos no extrato bruto das cascas do caule de *E. umbellata* e suas respectivas frações foi avaliado utilizando-se a técnica de espectrofotometria, para se tentar determinar a presença e quantidade destes compostos nas frações de *E. umbellata*.

5.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais

O extrato bruto e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol das cascas do caule de *E. umbellata*, foram solubilizadas em seus respectivos solventes e tratadas conforme apresentado nos itens 4.3 e 4.4 do capítulo Materiais e Métodos . Para tanto, o ácido gálico e a quercetina, respectivamente, foram empregados como padrões (substâncias de referência) para montagem das curvas analíticas e posterior utilização destas para quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonoides totais presentes nas amostras.

A fim de obter a curva analítica para determinação de fenólicos totais nas amostras, soluções do padrão de ácido gálico foram preparadas nas concentrações 50, 100, 200, 400, 600 e 800 $\mu g.mL^{-1}$, em triplicata. A equação da reta foi determinada ($y=0,0016x + 0,0271$) para o intervalo de concentração proposto, assim como o coeficiente de determinação ($r^2=0,9924$). O resultado obtido demonstrou boa linearidade neste intervalo de concentração proposto. Para a obtenção do ajuste e do modelo, utilizou-se a análise de variância pelo método do quadrado mínimo, por meio da qual calculou-se o teste *F*. Na Tabela 2, observa-se que o valor de *F* do modelo para

fenólicos (26,15034) é maior que o *F*tab (4,49), que assim rejeita a hipótese nula (não há linearidade), aceitando-se que a curva é linear. Quanto à falta de ajuste, ocorre o inverso, o valor de *F* (0,184702) é menor que *F*tab (3,26), então aceitando-se a hipótese nula (não há falta de ajuste).

Tabela 2. Resultados de ANOVA para linearidade do método de determinação de fenólicos totais

	SS	**DF**	**MS**	***F***	***F*tab**
Modelo	17472,35	1	17472,35	26,15034	4,49
Resíduo	10690,40	16	668,15	Linear	
Falta de ajuste	620,0060	4	155,0015	0,184702	3,26
Erro puro	10070,39	12	839,1994	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, *F*: valor *F* do teste; *F*tab: valor do *F* tabelado

A equação da reta obtida foi utilizada para calcular as concentrações de fenólicos totais presentes no extrato bruto e nas frações (expressos em quantidade de ácido gálico). Esses resultados são apresentados na Tabela 4.

No mesmo sentido, para a determinação de flavonoides totais presentes no extrato bruto e nas frações também foram realizados a determinação de uma faixa de linearidade para quantificação desta classe de substâncias. A curva de calibração de quercetina nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5 $\mu g.mL^{-1}$, mostrou-se linear nesta faixa de concentração com valor de r^2=0,9992 e equação da reta y=0,0729x – 0,0071. Para a obtenção do ajuste e do modelo, utilizou-se a análise de variância pelo método do quadrado mínimo, por meio da qual calculou-se o teste *F*. Na Tabela 3, observa-se que o valor de *F* do modelo para flavonoides (412,8758) é maior que o *F*tab (4,30), que assim rejeita a hipótese nula (não há linearidade), aceitando-se que a curva é linear. Quanto à falta de ajuste, ocorre o inverso, o valor de *F* (1,121615) é menor que *F*tab (2,74), então aceitando-se a hipótese nula (não há falta de ajuste).

Tabela 3. Resultados de ANOVA para linearidade do método de determinação de flavonoides totais

	SS	**DF**	**MS**	***F***	***F*tab**
Modelo	3835,398	1	3835,398	412,8758	4,30
Resíduo	204,368	22	9,289	Linear	
Falta de ajuste	60,50833	6	10,08472	1,121615	2,74
Erro puro	143,8600	16	8,991250	Não há falta de ajuste	

Onde: SS: soma dos quadrados; DF: graus de liberdade; MS: média dos quadrados, *F*: valor *F* do teste; *F*tab: valor do *F* tabelado.

Os resultados obtidos para a quantificação de flavonoides totais também estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais

Extrato/Fração	**Fenólicos** $mg.100g^{-1}$	**Flavonoides** $\mu g.mL^{-1}$
Extrato Bruto	236,188 ±0,884	2,000 ±0,191
Metanólica	225,250 ±0,442	0,340 ±0,017
Acetato de etila	123,375 ±2,210	0,651 ±0,093
Clorofórmica	-	0,241 ±0,007
Hexânica	-	0,134 ±0,017

Segundo Simões e colaboradores (2003), os compostos fenólicos, de um modo geral, podem ser encontrados nas plantas na forma de ésteres ou heterosídeos que propiciam sua solubilidade nos meios celulares vegetais. Desta forma, são facilmente extraídos por solventes polares quando do processo de obtenção dos extratos vegetais.

Decorrente desta característica se espera obter maiores concentrações destas substâncias em extratos de maior polaridade como as frações metanólica e acetato de etila, quando comparados com as frações clorofórmica e hexânica (solventes de menor

polaridade). De fato, os resultados comprovam tal informação, pois a presença de fenólicos totais foi observada apenas nas frações mais polares.

O resultado obtido para fenólicos totais na fração metanólica foi menor do que o encontrado para o extrato bruto de *E. umbellata*, corroborando os dados relatados por Munhoz e colaboradores (2014) em seu trabalho. Muito possivelmente a menor quantidade de fenólicos totais determinados na fração metanólica, pode ser atribuída à distribuição destes compostos por outras frações como a fração acetato de etila. Outros trabalhos científicos, com espécies vegetais pertencentes à mesma família (Euphorbiaceae), e que empregaram a mesma metodologia para quantificar os compostos fenólicos encontraram valores distintos aos verificados em nosso trabalho. Chirinos e colaboradores (2013) trabalharam com diferentes cultivares da espécie *Plukenetia volubilis* L. e observaram valores de 64,6 a 80,0 $mg.100g^{-1}$ para os compostos fenólicos. Estes autores usaram em seu estudo o mesmo reagente, Folin-Ciocalteau. Já Araújo e colaboradores (2014), ao avaliarem a quantidade de compostos fenólicos totais em extratos metanólicos e acetônico secos e frescos da espécie *Euphorbia tirucalli* obtiveram quantidades de 30,54 a 7,73 $mg.100g^{-1}$. Este último resultado apresenta valores bem menores que o observado neste estudo, entretanto, diferente do realizado no presente trabalho e apresentado no trabalho de Araújo e colaboradores, os autores empregaram o reagente de Folin-Denis. Estes dois reagentes são muito utilizados para determinação de compostos fenólicos, entretanto o reagente de Folin-Ciocalteau é, muitas vezes, mais usado por diminuir a tendência à precipitação do complexo formado e assim apresentar uma maior sensibilidade para a quantificação de fenóis reduzidos (CURCIO et al., 2009; SOUSA et al., 2007; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Já o teste para quantificação de flavonoides totais nas amostras demonstrou que as frações mais polares avaliadas continham maior quantidade destas substâncias, apesar de também ser possível se determinar a presença dessas nas frações menos polares.

Tal resultado pode ser justificado pelo fato de que o procedimento empregado para determinação de flavonoides totais apresentar maior sensibilidade do que a utilizada para quantificação de compostos fenólicos.

Ainda, vale ressaltar que a classe dos flavonoides, diferentemente da classe dos fenólicos simples, constitui-se em uma classe de grande diversidade estrutural. Nesta classe podem ser encontradas desde substâncias com características menos polares como flavonas e flavonóis nas suas formas não glicosiladas (agliconas) e metiladas (possivelmente presentes nas frações menos polares), até estruturas glicosiladas e poli-hidroxiladas que são extraídas das plantas por solventes mais polares (SIMÕES et al., 2003).

Inúmeros trabalhos avaliam de forma qualitativa ou quantitativa a presença dos flavonoides em extratos vegetais. Diferentemente dos resultados encontrados no presente trabalho, Badgujar (2014) realizou um *screening* fitoquímico do látex de três espécies vegetais da família Euphorbiaceae (*Pedilanthus tithymaloides*, *E. nivulia* e *E. umbellata*). Segundo este autor, foi verificado que as espécies *E. nivulia* e *E. umbellata* (*S.grantii*) não continham flavonoides no material avaliado. Entretanto, estes resultados podem estar relacionados a características do material vegetal utilizado, como época que foi obtido e a parte do vegetal estudada. Sabe-se que fatores sazonais, como a parte do vegetal podem interferir na quantidade de metabólitos secundários nos vegetais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Com um enfoque quantitativo, buscando estimar a concentração de flavonoides, o trabalho de Soares e colaboradores (2003) avaliaram os extratos de espécie *Phylantus niruri* (Euphorbiaceae). Estes autores obtiveram resultados positivos para flavonoides totais, em diferentes concentrações de amostra (0,819 g% em 0,400 g de amostra, 2,8125 g% em 1,125 g de amostra, 4,6250 g% em 1,850 g de amostra) concordando com os dados encontrados neste trabalho.

Também Marques e colaboradores (2012) avaliaram procedimentos distintos de tratamento de amostra e aplicaram a determinação espectrofotométrica para determinação de flavonoides totais para a espécie *Bauhinia forficata* (Fabaceae). Estes autores inferiram, em seu estudo, que a hidrólise ácida no preparo da amostra aumenta a sensibilidade do método em relação à diluição direta (apesar de ambos os métodos terem sido considerados apropriados ao controle de qualidade de drogas vegetais). Isto reforça, segundo estes autores, a importância de se utilizar a hidrólise ácida, também

utilizada no presente trabalho, para se determinar a concentração de flavonoides em extratos de espécies vegetais.

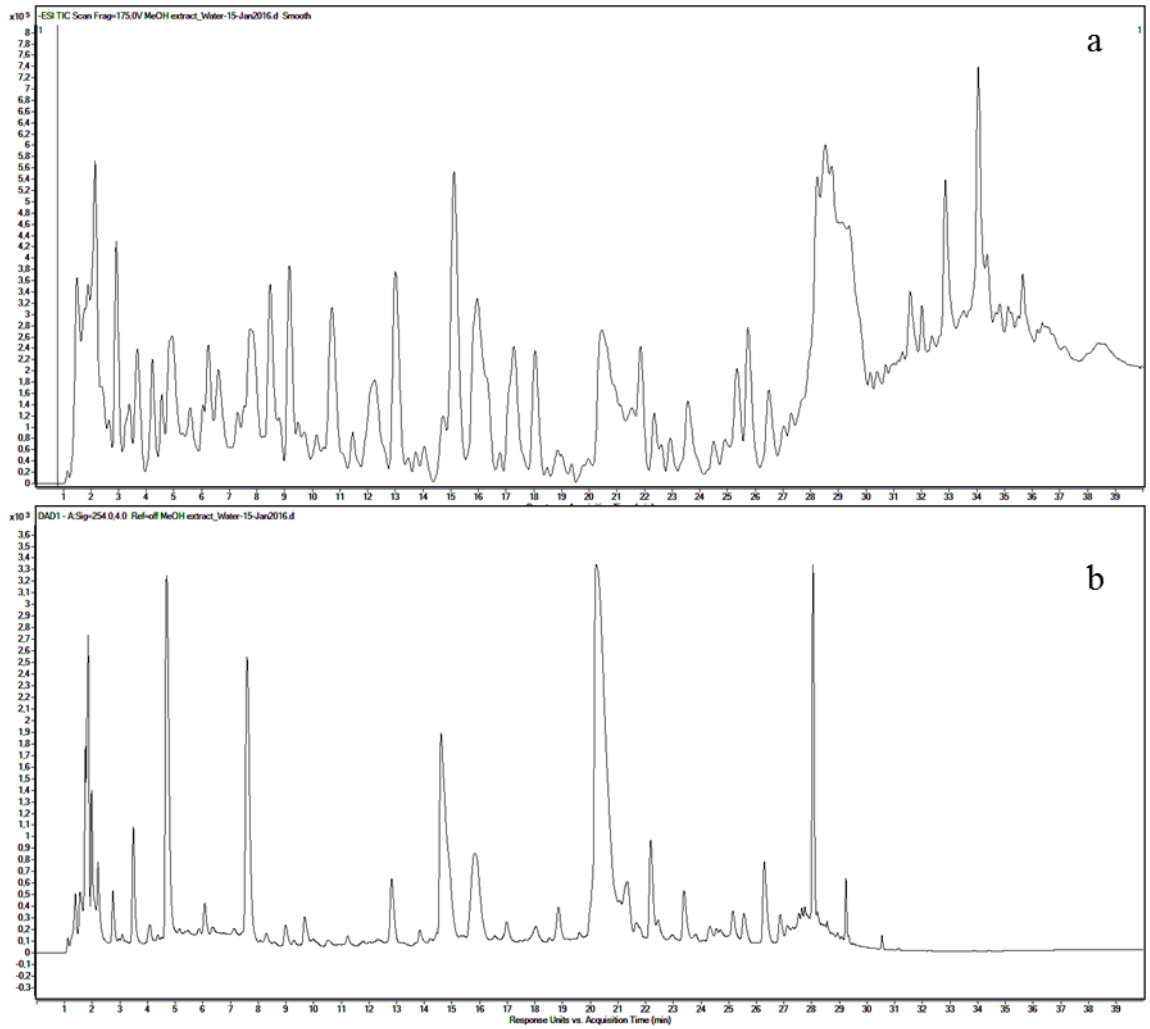
5.2 Avaliação cromatográfica da fração metanólica de *E. umbellata*

Após a avaliação quantitativa do extrato bruto e das frações utilizando a técnica de espectrofotometria UV-VIS, verificou-se que dentre todas as frações avaliadas, a fração metanólica foi a que continha a maior concentração de compostos fenólicos.

Considerando que esta classe de substâncias é importante para a reversão de quadros inflamatórios, realizou-se uma avaliação qualitativa empregando a técnica de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) com o objetivo de se analisar e sugerir possíveis moléculas presentes na fração metanólica que justificassem os resultados encontrados até o momento e, permitindo também, conduzir adequadamente as demais etapas do trabalho.

Primeiramente, foi estudada a influência de diversas condições cromatográficas no processo de separação das substâncias com o objetivo de se conseguir um cromatograma que fosse representativo da diversidade estrutural presente na fração. Avaliações de diferentes colunas (C_8, C_{18}, e Fenil-hexil), assim como diferentes modificadores orgânicos (ACN e MeOH) foram estudados, para se tentar encontrar a melhor característica de seletividade para os compostos presentes na FM. Após definição da melhor condição cromatográfica a análise da FM permitiu a obtenção do cromatograma demonstrado na Figura 6.

Figura 6. Perfil cromatográfico representativo dos compostos presentes na FM obtidos por UHPLC-QToF-MS, de acordo com o tempo de retenção



a – cromatograma de íons totais obtido a partir de detector de massas; b – cromatograma obtido por detector UV a 254 nm.

Fonte: O autor.

Os dados obtidos a partir da avaliação dos picos da FM foram comparados com moléculas identificadas em diversas espécies do gênero *Euphorbia* e, deste modo, pôde-se sugerir 23 possíveis moléculas, conforme o sumarizado na Tabela 5:

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM (CONTINUA)

Pico	Tempo de retenção (min)	Fórmula molecular	*m/z* Teórica $[M+H]^+$ $[M-H]^-$	*m/z* Experimental $[M+H]^+$ $[M-H]^-$	Fragmento	Tentativa de identificação de Substância	Referência
1	2,2	$C_{13}H_{16}O_{10}$ (332.0743)	333,0816 331,0671	333,0817 331,0667	-	Glucogalina	AHN et al., 1995
2	2,3	$C_{26}H_{32}O_{20}$ (663.1487)	333,0816 663,1414	333,0817 663,1400	-	Glucogalina (dímero)	AHN et al., 1995
3	3,1	$C_7H_6O_5$ (170.0215)	171,0288 169,0142	171,0288 169,0137	-	Ácido gálico	JAHAN et al., 2013
4	6,6	$C_{34}H_{24}O_{22}$ (784.0759)	785,0832 783,0686	785,0837 783,0686	633,0728	Casuarina	LEE et al., 1990
5	8,8	$C_8H_8O_5$ (184.0372)	185,0444 183,0299	185,0444 183,0291	183,0286	Metil-galato	PFUNDSTEIN et al., 2010

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM

(CONTINUA)

6	9,8	$C_{20}H_{20}O_{14}$ (484.0853)	485,0926 483,0780	485,0916 483,0774	-	1,6-Di-*O*-galoil-glucose	PFUNDSTEIN et al., 2010
7	13,8	$C_{27}H_{22}O_{18}$ (634.0806)	635,0879 633,0733	n.d.* 633,0732	-	Corilagina	PFUNDSTEIN et al., 2010
8	15,3	$C_{20}H_{16}O_{13}$ (464.0585)	465,0664 463,0518	465,0663 463,0508	303,0135 197,0457	Ácido elágico-glucose	FRACASSETTI et al., 2013
9	15,7	$C_9H_{10}O_5$ (198.0528)	199,0601 197,0455	199,0601 197,0455	-	Etil-galato	RAMANANDRAIBE et al., 2008
10	16,6	$C_{34}H_{22}O_{22}$ (782.0597)	783,0675 781,053	783,0680 n.d.*	-	Emblicanina A	NAZEEM et al., 2014

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM

(CONTINUA)

11	16,8	$C_{41}H_{28}O_{27}$ (952.0818)	953,0891 951,0745	953,0874 951,0737	197,0445 300,9982	Geranina/ Granatina B/ Carpinusina/ Euphorscopina/ Ácido gerânico/ Helioscopinina A/ Plylantusina A	ELENDRAN et al., 2015
12	21,0	$C_{14}H_6O_8$ (302.0063)	303,0135 300,999	303,0135 300,9962	-	Ácido elágico	PFUNDSTEIN et al., 2010
13	21,2	$C_{28}H_{24}O_{16}$ (616.1059)	617,1137 615,0992	617,1124 615,0975	193,0492	Quercetina-galoil-galactosídeo	YANG et al., 2011

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM

(CONTINUA)

14	21,7	$C_{41}H_{28}O_{27}$ (952.0817)	953,0891 951,0745	953,08792 951,0738	-	Geranina/ Granatina B/ Carpinusina/ Euphorscopina/ Ácido gerânico/ Helioscopinina A/ Plylantusina A	ELENDRAN et al., 2015
15	22,2	$C_{21}H_{20}O_{12}$ (464.0955)	465,1028 463,0882	465,1028 n.d.*	303,0488	Isoquercetrina	PFUNDSTEIN et al., 2010
16	22,5	$C_{41}H_{24}O_{17}$ (788.1013)	789,1086 787,0941	n.d.* 787,0993	300,9979	n.i.**	___
17	23,3	$C_{21}H_{18}O_{12}$ (462.0798)	463,0871 461,0725	463,0849 461,0708	-	Ácido elágico-dimetóxi-xilose	PFUNDSTEIN et al., 2010

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM

(CONTINUA)

18	23,7	$C_{15}H_{12}O_8$ (320.0532)	321,0605 319,0459	321,0586 319,0447	-	Dihidromiricetina	CHATURVEDULA; HUANG, 2013
19	24,2	$C_{20}H_{18}O_{11}$ (434.0844)	435,0922 433,0776	435,0921 n.d.*	303,0485	Quercetina-3-*O*-arabinopiranose	ABU-REIDAH et al., 2015
20	24,8	$C_{17}H_{20}O_{14}$ (448.0853)	449,0926 447,0778	449,0947 447,0789	303,0494	Ácido málico-galoil-hexose	ABU-REIDAH et al., 2015
21	25,7	$C_{41}H_{28}O_{27}$ (952.0818)	953,0891 951,0745	953,0874 951,0737	300,9983	Geranina/ Granatina B/ Carpinusina/ Euphorscopina/ Ácido gerânico/ Helioscopinina A/ Plylantusina A	ELENDRAN et al., 2015

Tabela 5. Dados de espectrometria de massas obtidos a partir da FM

(FINAL)

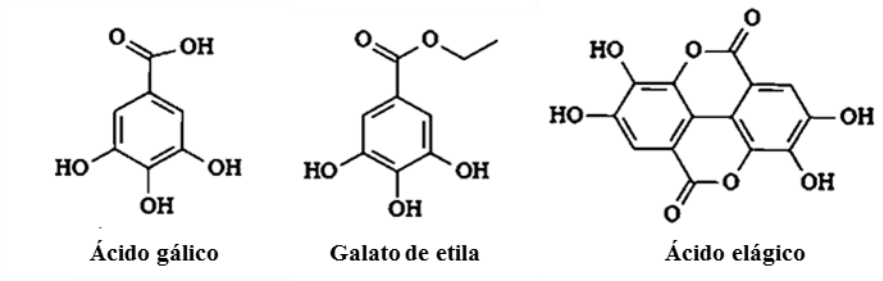
22	26,1	$C_{21}H_{20}O_{11}$ (448.1)	449,1078 447,0933	449,1071 447,0922	303,0491	Quercetrina	ZHANG et al., 2014
23	28,2	$C_{21}H_{20}O_{10}$ (432.1051)	433,1129 431,0984	433,1120 n.d.*	287,0544	Campferol-ramnosídeo	SHARAF; EL-ANSARI; SALEH, 1997
24	28,3	$C_{22}H_{20}O_{12}$ (476.0949)	477,1028 475,0882	477,1016 n.d.*	-	Ácido elágico-dimetóxi-ramnosídeo	SIRAT; REZALI; UJANG, 2010

*não detectado

**não identificado

A partir da injeção de padrões e comparação das massas exatas foi possível confirmar 3 substâncias na FM: ácido gálico, galato de etila e ácido elágico (Figura 7).

Figura 7. Estruturas das substâncias identificadas na FM



Os resultados obtidos permitiram reafirmar a presença de compostos fenólicos na FM, de modo que esta foi a fração de escolha para realizar o preparo das membranas de quitosana. Ainda, os compostos ácido gálico, ácido elágico e quercetina (não mostrado no cromatogramas da Figura 7), identificados na FM, foram escolhidos como marcadores para futuras avaliações do material em estudo.

5.3 Membranas de quitosana

5.3.1 Formulação e concentração de impregnação das membranas

Após o processo de desenvolvimento das membranas, no qual foram testadas diversas formulações, bem como variações do processo, chegou-se a seguinte formulação:

Tabela 6. Fórmula centesimal de membranas de quitosana contendo FM

Componente	**Concentração (% m/m)**
Solução de quitosana a 1,5% (Sigma-Aldrich®, 448877)	88,2
Benzoato de sódio	0,1
PEG 400	1,5
TWEEN 80	0,2
Solução aquosa de fração metanólica de *E. umbellata*[*]	10

[*]Soluções aquosas de diferentes concentrações, preparadas de modo a atingir, em um mesmo volume, as massas necessárias para obter as membranas com as 3 concentrações distintas de FM.

A partir dos testes sequenciais de crescentes concentrações de FM na formulação, foi determinada que a maior concentração desta em relação ao peso de quitosana que poderia ser incorporado a formulação, sem que houvesse precipitação de material, seria a concentração de 100% (1:1, m/m). Assim, definida esta concentração máxima aceitável para a formulação, propôs-se uma concentração intermediária e uma concentração baixa, 50% e 10% consecutivamente.

Deste modo, foram obtidas as amostras a serem avaliadas. Estas se apresentaram visualmente homogêneas na constituição e aparentemente com resistência adequada. Este material foi utilizado para realizar caracterização e avaliação dos aspectos físico-químicos (Figura 8).

Figura 8. Amostra M100FM obtida a partir da fórmula e das condições ideais desenvolvidas

5.4 Caracterização das membranas de quitosana

5.4.1 Microscopia Eletrônica – MEV e FEG

Inicialmente, por microscopia eletrônica, foi realizada a avaliação morfológica das membranas com a análise da superfície superior e inferior das membranas de quitosana, presença de poros nestas superfícies e espessura das membranas. Para a caracterização inicial, foram analisadas tanto as membranas preparadas em placas de Petri de vidro quanto às preparadas em placas de Petri de plástico, ressaltando que todas as amostras foram preparadas em placas de mesmo diâmetro e contendo mesma massa de formulação.

Os resultados de espessura obtidos para as membranas de quitosana são apresentados na Tabela 7.

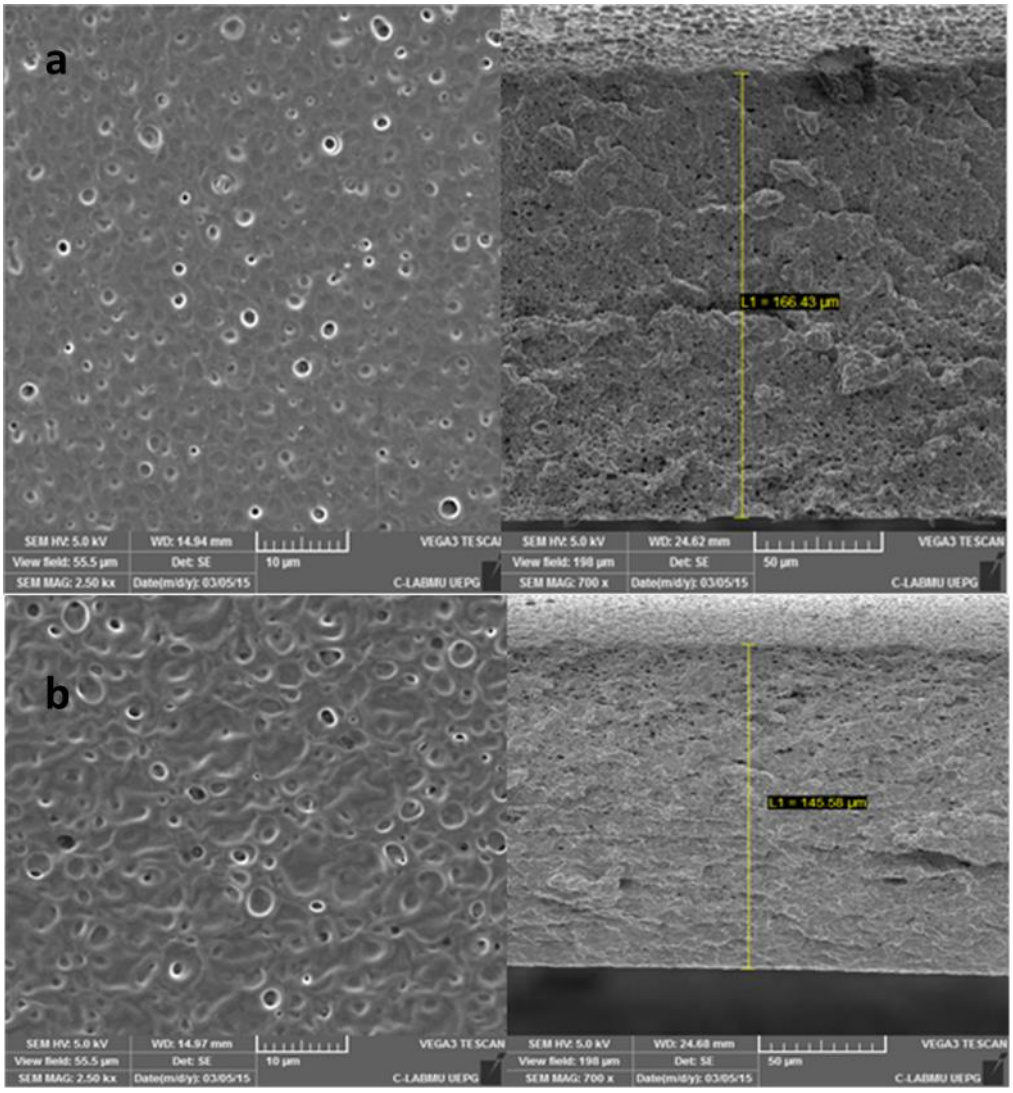
Tabela 7. Membranas de quitosana e suas espessuras avaliadas por MEV

Nº da Placa	**Material da Placa**	**% FM em relação à quitosana**	**Espessura (µm) (n=1)**
1	VIDRO	100%	166,43
2	VIDRO	50%	118,17
3	VIDRO	10%	113,15
4	PLÁSTICO	100%	145,58
5	PLÁSTICO	50%	113,15
6	PLÁSTICO	10%	71,83

Quando comparadas as espessuras entre as placas com diferentes concentrações de FM, pôde-se verificar que quanto maior a concentração de FM, maior a espessura da membrana produzida, o que possivelmente ocorreu pelo próprio aumento da massa da fração na formulação. Outra diferença observada foi que as membranas feitas em placas de vidro apresentaram maior espessura do que as membranas feitas em placas de plástico, o que pode ter relação com a diferença notada visualmente quanto aos diâmetros e números de poros formados nestas membranas (Figura 9). Ao analisamos as imagens para as amostras sem FM (MB) pelo software *ImageJ* obtemos uma porosidade média de 21±3% e 39±4% para a amostras preparadas em placas de plástico e vidro, respectivamente.

Comparando as membranas (preparadas com as mesmas concentrações de FM) obtidas tanto em placas de Petri de vidro e em plástico, foi possível verificar que a superfície de ambas apresentava a formação de poros e com rugosidade (Figuras 9).

Figura 9. Imagens da superfície superior e da espessura das membranas M100FM preparadas em placas de vidro e plástico – (a) membrana obtida em placa de Petri de plástico; (b) membrana obtida em placa de Petri de vidro

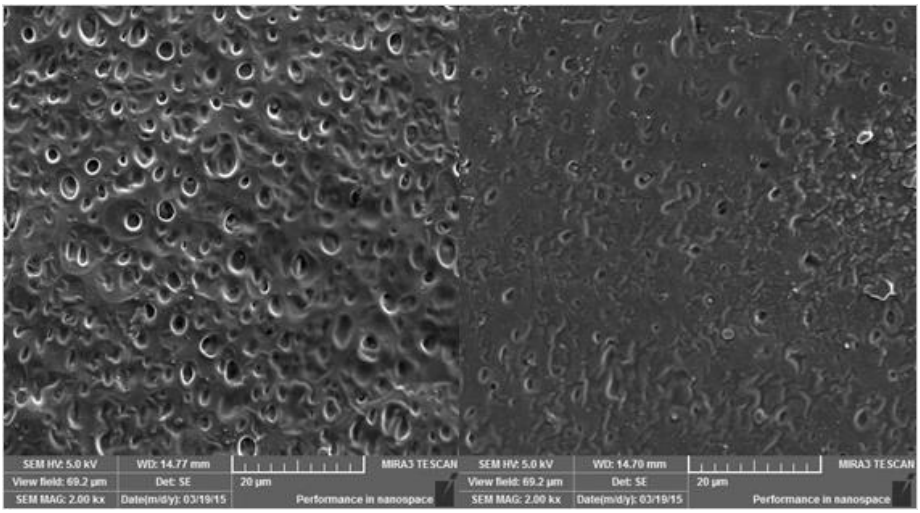


Imagens obtidas por MEV (microscopia eletrônica de varredura – VEGA3 TESCAN).

Fonte: O autor.

Ao analisar os dois lados destas membranas, foi possível observar a presença de poros e rugosidade em ambas as faces, porém a superfície inferior apresentou-se com menor quantidade de poros e rugosidade do que a superfície superior (Figura 10). O mesmo comportamento foi observado para as amostras MB e as contendo FM em diferentes concentrações, feitas tanto nas placas de Petri de vidro e de plástico.

Figura 10. Imagens da superfície superior (à esquerda) e inferior (à direita) da Membrana 4 (M100FM feita em placa de plástico)

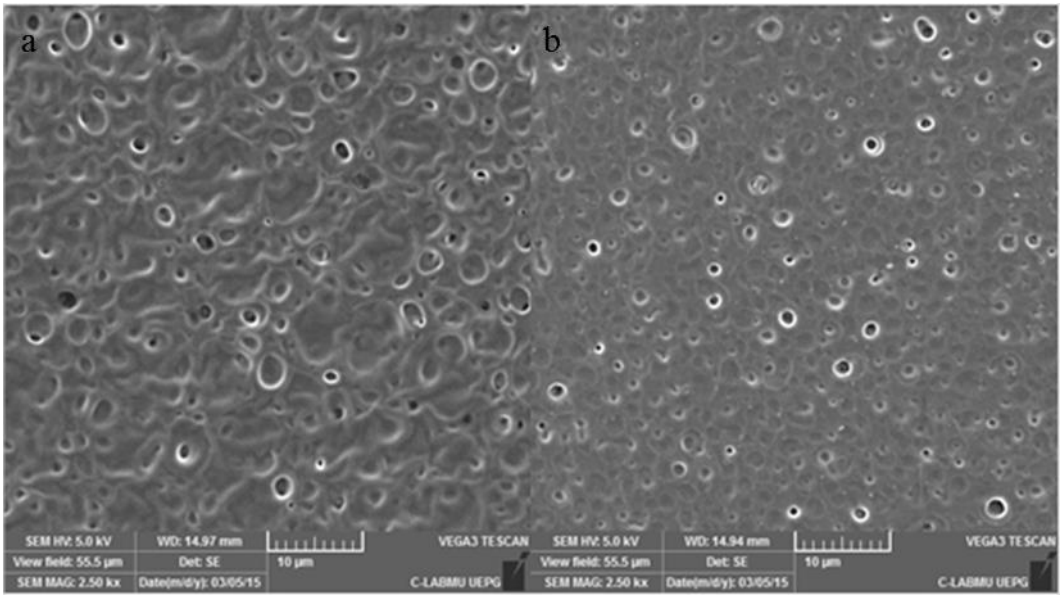


Imagens obtidas por FEG (microscopia eletrônica de varredura por efeito de campo – MIRA3 TESCAN)

Fonte: O autor.

A avaliação das possíveis diferenças entre as membranas feitas em placas de plástico e de vidro permitiu determinar que as membranas formadas apresentavam diferenças quanto a quantidade e diâmetro dos poros e rugosidade da superfície das membranas (Figura 11). A Membrana 1, M100FM obtida em placa de vidro, apresentou a formação de poros grandes (porosidade estimada de 10±1%) e rugosidade mais grosseira do que a Membrana 4 (porosidade de 4,1±0,5%) M100FM que foi preparada em placa de plástico. Estas características podem ter surgido em decorrência da diferença entre a velocidade de aquecimento e resfriamento que ocorrem com os materiais vidro e plástico, respectivamente, durante o processo de obtenção das membranas. A diferença dos coeficientes de condutividade térmica do vidro (1,3 W. $m^{-1}K^{-1}$) (JOHNSON; HASSELMAN, 1987) e do plástico (0,15 $W.m^{-1}K^{-1}$) (LIU et al., 2014) podem promover diferenças no processo de secagem e assim, alterar as características de formação de poros e rugosidade durante o preparo das membranas de quitosana.

Figura 11. Imagens da superfície superior de amostras M100FM produzidas em placas de Petri de vidro (a - Membrana 1) e de plástico (b - Membrana 4) obtidas por MEV (microscopia eletrônica de varredura – VEGA3 TESCAN)



Fonte: O autor.

Para a escolha do material do molde foi efetuado um estudo preliminar da estabilidade das membranas de quitosana em função do tempo de armazenagem destas, avaliando-se a cristalinidade relativa das mesmas. Por este estudo foi possível observar que as membranas preparadas em placas de vidro apresentavam maior cristalinidade devido a maior retenção de água nas membranas, o que não é interessante para a aplicação proposta neste trabalho.

5.4.2 Quimiometria – Análise das membranas de quitosana por FTIR em função do tempo

Com a finalidade de auxiliar a escolha do material do molde das membranas de quitosana (vidro ou plástico), de modo complementar aos dados observados na microscopia eletrônica, foi realizado um estudo em função do tempo de armazenagem com as membranas MB. Para tanto, dentro de um período de 28 dias, amostras MB

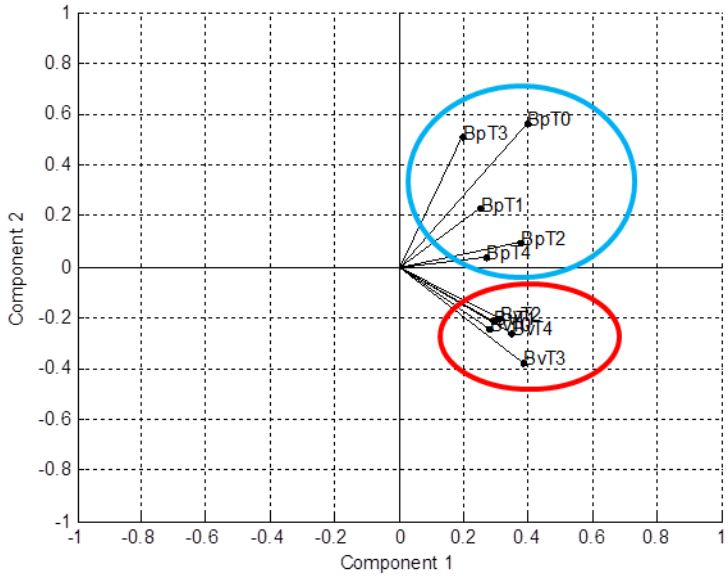
feitas em placas de Petri de vidro e em placas de Petri de plástico (em triplicata) foram submetidas à espectroscopia FTIR.

Os dados foram suavizados utilizando regressão não-paramétrica via *wavelets* e, posteriormente, aplicou-se *base-line* para alinhar as curvas. Para alinhar as curvas, foram selecionados quatro regiões (630 a 650 cm^{-1}, 800 a 830 cm^{-1}, 1100 a 1200 cm^{-1} e 1320 a 1340 cm^{-1}), calculou-se os mínimos de cada curva para realizar o ajuste. Então se selecionou a região dos espectros entre 650 e 1300 cm^{-1} para aplicar a análise multivariada. A componente principal 1 explicou 97,81% da variabilidade total, enquanto que a componente principal 2 explicou 1,70%, deste modo, ambas foram capazes de explicar 99,51% da variabilidade dos dados experimentais.

Os espectros obtidos foram avaliados qualitativamente, o que está demonstrado pela Análise de Componentes Principais (ACP). Nota-se que as amostras agrupam-se de acordo com o tipo de molde em que foi preparada e não de acordo com o tempo. Na Figura 12, têm-se um grupo com as amostras feitas em vidro (em vermelho) e outra com as amostras feitas em plástico (em azul), corroborando os dados da microscopia, a qual demonstrou que a diferença de materiais empregados no preparo das membranas gera amostras com características distintas.

A partir dos dados quimiométricos, que classificaram as membranas produzidas em molde plástico e vidro em diferentes grupos, e as demais características observadas neste estudo, optou-se por padronizar o plástico como material do molde das membranas a serem estudadas.

Figura 12. Gráfico da Análise multivariada de Componentes Principais (ACP) dos espectros de FTIR, obtidos por avaliações periódicas em 28 dias, das amostras MB preparadas em moldes de vidro (em vermelho) e de plástico (em azul)



Fonte: O autor.

5.4.3 Densidade aparente

Em decorrência da observação de características de porosidade distintas obtidas entre as membranas preparadas com o mesmo molde em diferentes concentrações de fração metanólica, propôs-se avaliar possíveis diferenças de densidade aparente, elegendo para a realização deste estudo as membranas obtidas utilizando as placas de Petri de plástico.

Para tanto, incialmente foram avaliados diferentes solventes os quais poderiam possibilitar o desenvolvimento do teste. Para que fosse considerado adequado, o solvente a ser empregado no teste deveria apresentar uma força de empuxo menor do que a força peso. Solventes como água, metanol, acetona, entre outros, foram avaliados, entretanto nenhum se mostrou adequado para a metodologia e amostras propostas. Por fim, o hexano foi escolhido como fluido a ser empregado, cuja densidade em 25°C é 0,659 $g.ml^{-1}$, possibilitando com que fosse feita uma adequada medida da densidade aparente. A Tabela 8 traz os valores obtidos para a densidade aparente das amostras MB, M10FM, M50FM e M100FM:

Tabela 8. Densidade das membranas de quitosana pelo método de Arquimedes

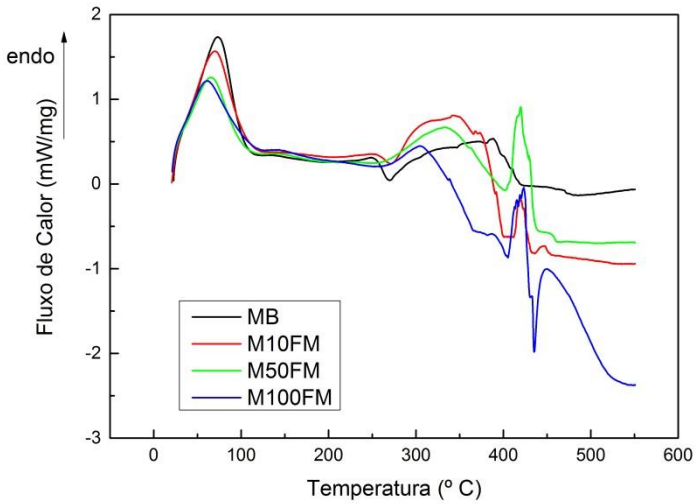
Amostra	Densidade ($g.cm^{-3}$)	Desvio Padrão
MB	1,17	0,04
M10FM	1,18	0,02
M50FM	1,27	0,03
M100FM	1,25	0,03

Os dados obtidos permitiram constatar que com o aumento da concentração de FM incorporada à membrana M50 e M100, obteve-se um aumento da densidade aparente frente as membranas base (MB) e M10MF. De acordo com Siripatrawan e Harte (2010) é possível que os compostos fenólicos se encaixem na matriz polimérica e façam interações como ligações de hidrogênio ou covalentes com os grupamentos reativos da quitosana, proporcionando uma maior quantidade de ligações possíveis o que, consequentemente, causou o aumento da densidade das membranas, de acordo com a quantidade de extrato incorporado.

5.4.4 Calorimetria exploratória diferencia (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA)

Análise de DSC e TGA permitiram determinar características de temperaturas de fusão, variação de entalpia no pico exotérmico e perdas de massa das amostras de quitosana contendo diferentes concentrações da FM (M10FM, M50FM e M100FM) e amostras sem FM (MB) (Figuras 13 e 14). Assim como relatado no experimento anterior, as amostras submetidas à análise térmica foram obtidas apenas em placa de Petri de plástico.

Figura 13. Curva DSC para as membranas de quitosana. Razão de aquecimento 10 °C.min^{-1} até 550 °C



Fonte: O autor.

A interpretação das curvas de DSC (Figura 13) permitiu constatar que todas as amostras apresentaram um pico endotérmico na região entre 70-90 ºC (73 ºC para a MB e 61 ºC para a amostra M100FM). Também, notou-se uma redução na intensidade deste mesmo pico com o aumento da concentração da FM, com consequente diminuição na entalpia (ΔH_{endo}). Este deslocamento para temperaturas mais baixas relacionadas à adição de extrato foi observado por Zhang e Kosaraju (2007) e foi atribuído à interação dos compostos polifenólicos com a quitosana. Ainda, segundo Prashanth, Kittur e Tharanathan (2002), os polissacarídeos, como a quitosana, geralmente possuem uma forte afinidade com a água no estado sólido, e a estrutura desordenada que essas macromoléculas apresentam podem facilmente permitir a hidratação da estrutura do polímero. Estas duas observações permitem confirmar que a variação na posição do pico endotérmico, nas amostras analisadas, com a adição das diferentes concentrações da FM, indica que essas macromoléculas sofrem uma forte interação quando se adiciona a fração levando à diminuição da capacidade da membrana em reter água e assim, proporcionando a redução nas interações do polímero com a água. Chao (2008), em seu trabalho, também comenta sobre a ocorrência de deslocamento do pico endotérmico

para temperaturas menores. O autor relaciona este comportamento ao fato das membranas terem menos grupos amino disponíveis para formar ligações de hidrogênio com as moléculas de água por estarem interagindo com a FM (CHAO, 2008).

Outro dado importante a ser analisado é o pico exotérmico na região entre 250 ºC e 300 ºC que é mais proeminente para a amostra MB e M10FM, já para as amostras M50FM e M100FM ocorreu um alargamento desse pico resultando na diminuição da intensidade e da entalpia (ΔH_{exo}), além do deslocamento observado para temperaturas mais baixas, de 269 ºC da membrana MB para 251 ºC para a membrana M100FM.

Este deslocamento para temperaturas mais baixas com a adição de FM foi observado novamente por Zhang e Kosaraju (2007) e foi atribuído, como citado anteriormente, à interação dos compostos polifenólicos com a quitosana. Complementarmente, também se pode atribuir à decomposição da estrutura sacarídica na quitosana (ZHANG et al., 2006). Portanto, pelos resultados de DSC, pode-se dizer que ocorre interação do extrato com a quitosana, provavelmente por ligações de hidrogênio, fazendo com que as membranas retenham menos água, reduzindo a decomposição da estrutura sacarídica.

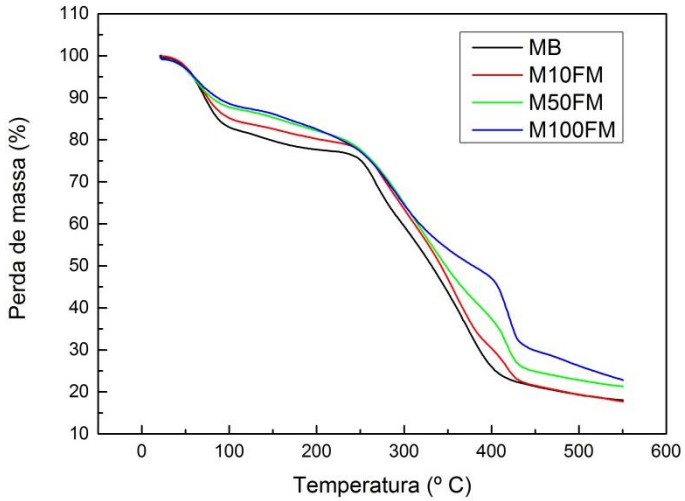
Os dados de DSC podem ser observados mais detalhadamente na Tabela 9:

Tabela 9. Transições térmicas e massa residual das membranas de quitosana preparadas em diferentes concentrações de FM

Amostra	**Pico endotérmico**		**Pico exotérmico**		**Quantidade de massa residual em 550º (%)**
	Posição (ºC)	**(ΔH_{endo}) (mW/mg)**	**Posição (ºC)**	**(ΔH_{exo}) (mW/mg)**	
MB	73,34	92,56	269,91	-6,46	18
M10FM	70,08	92,18	270,98	-2,02	18
M50FM	65,11	75,85	256,23	-0,62	21
M100FM	61,35	74,43	251,23	-0,80	22

As análises de TGA para as membranas de quitosana contendo FM e sem FM estão demonstradas na Figura 14.

Figura 14. Análise termogravimétrica de membranas de quitosana



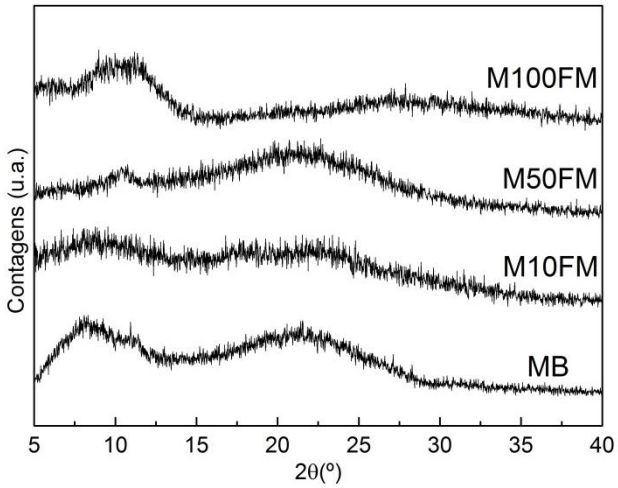
Fonte: O autor.

Pode-se notar o 1º estágio de perda de massa que vai até aproximadamente 100 ºC. Este estágio é relacionado com a evaporação de água do polímero, sendo que a maior perda (18%) foi para a amostra MB e a menor perda de massa, no valor de 12%, foi para a membrana M100FM, confirmando os dados de DSC. O 2º estágio pode ser relacionado à desidratação dos anéis sacarídicos, despolimerização e decomposição das unidades acetiladas e desacetiladas do polímero (ZHANG; ZHAO, 2015). A massa residual de membrana em 550 ºC consta na Tabela 7. Como a quitosana utilizada na preparação de todas as membranas possui o mesmo grau de acetilação (85%), pode-se atribuir a diferença na variação da perda de massa com a temperatura à quantidade de fração metanólica incorporada às membranas de quitosana, assegurando assim que a adição da FM nas membranas reduz a decomposição sacarídica da quitosana, pelas interações formadas entre o material vegetal e a quitosana.

5.4.5 Difração de raios X (DRX)

O estudo e a caracterização das formulações quanto a sua cristalinidade foram conduzidos para as amostras feitas em placas de plástico, empregando a técnica de difração de raios X. A partir da análise dos dados gerados para as membranas branco, 10%, 50% e 100% de fração metanólica em relação à quitosana foram obtidos os difratogramas demonstrados na Figura 15:

Figura 15. Difratograma das membranas de quitosana



Fonte: O autor.

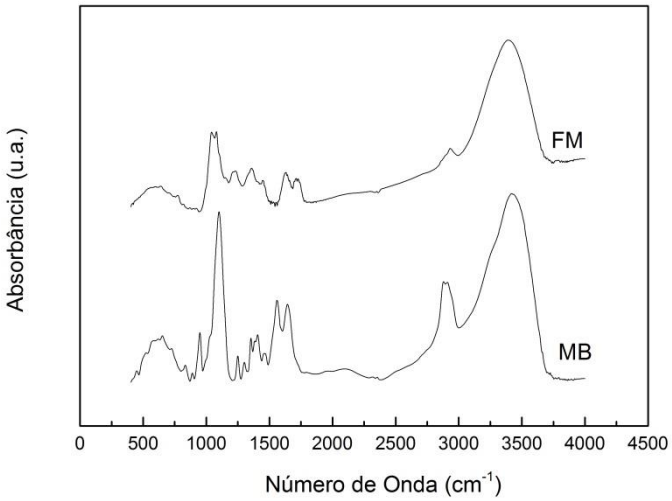
A partir da análise dos difratogramas, foi possível notar-se 2 halos especialmente bem evidentes na membrana sem extrato, sendo a reflexão em 2θ de 8° e 20°. O primeiro ângulo é atribuído à presença de cristais de quitosana hidratados, devido à integração das moléculas de água na rede cristalina da quitosana. O segundo halo centrado em aproximadamente 20° pode ser atribuído à rede cristalina regular da quitosana (RUBILAR et al., 2013; EPURE et al., 2011; KITTUR; KUMAR; ZHANG et al., 2006; THARANATHAN, 2003; PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002; OGAWA; YU; MIYA, 1992).

Para as membranas com FM notou-se um deslocamento do halo de 8° para 11°, bastante perceptível na amostra M100FM. Também se observa a ocorrência de um deslocamento do halo de 21° para 28°, associado a um decréscimo na intensidade deste. Este comportamento pode ser atribuído a um aumento nas interações intermoleculares da cadeia polimérica da quitosana com os compostos polifenólicos da FM, pois o mesmo comportamento também foi observado por Vieira e colaboradores (2006) para íons de Hg(II) adsorvidos nas membranas de quitosana. Existe ainda a possibilidade de explicação deste efeito causado pelas interações intermoleculares da cadeia de quitosana com compostos polifenólicos que pode ocorrer como já citado por Siripatrawan e Harte (2010). Estes autores relataram a ocorrência de interações de hidrogênio ou ligações covalentes das substâncias presentes na FM com grupos reativos da quitosana, acarretando o deslocamento observado.

5.4.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourrier (FTIR)

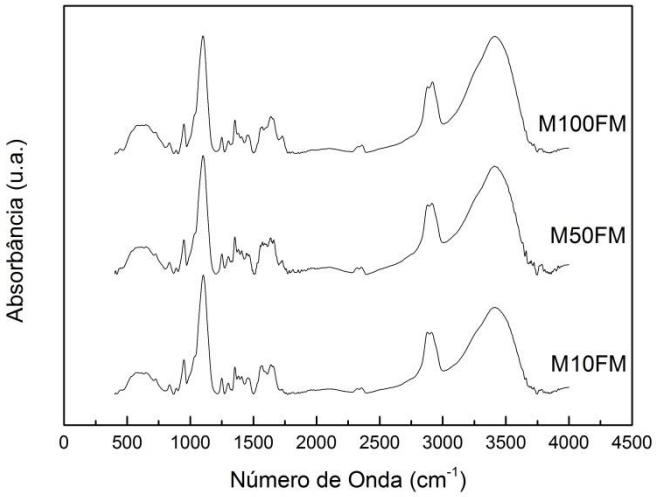
A técnica de FTIR permite investigar a ocorrência de possíveis diferenças entre amostras que podem ser atribuídas à composição ou às interações/ligações químicas entre os componentes de uma mesma formulação. Sendo assim, primeiramente procurou-se caracterizar a membrana MB e a FM (Figura 16), para, a partir dos resultados obtidos, avaliar as membranas M10FM, M50FM e M100FM. Os espectros obtidos para as membranas contendo FM estão demonstrados nas Figuras 16 e 17 e os principais picos estão indexados na Tabela 10.

Figura 16. Espectros de FTIR da FM e da membrana MB na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1}



Fonte: O autor.

Figura 17. Espectros de FTIR das membranas de quitosana contendo a FM na faixa de número de onda de 4000 a 400 cm^{-1}



Fonte: O autor.

Tabela 10. Atribuições às vibrações/aos grupamentos por FTIR das membranas de quitosana

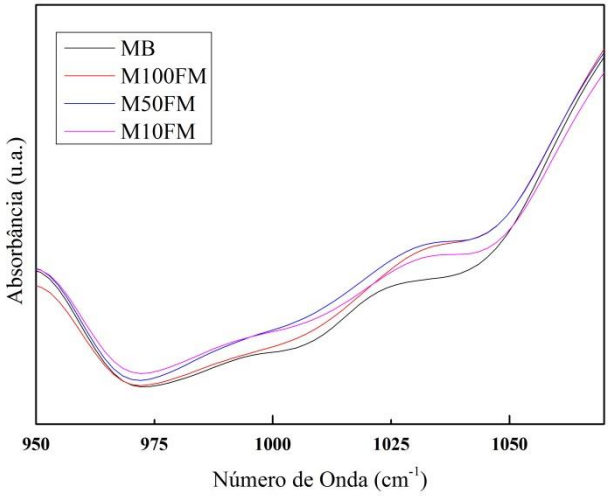
Posição do pico de FTIR (cm^{-1})	**Modo vibracional atribuído**	**Referência**
889	Estiramento de CO de compostos glicosídicos	KASAAI, 2008; SANTOS et al., 2003
1300	Deformação axial de CN de grupos amino	SANTOS et al., 2003
1322	Deformação axial de CN de grupos amino	SANTOS et al., 2003
1350	Deformação axial de CN de grupos amino	SANTOS et al., 2003
1382	Deformação angular de CH3	SANTOS et al., 2003
1410	Deformação angular CH2	KASAAI, 2008
1559	Deformação angular NH	KASAAI, 2008
1592	Deformação angular de NH	SANTOS et al., 2003
2877	Estiramento de CH	KASAAI, 2008
1636-1657	Deformação axial de C=O	KASAAI, 2008
1660-1670	Deformação axial de grupamentos C=O de amida I	SANTOS et al., 2003
1727-1732	Deformação angular CH3	SILVERSTEIN, WEBSTER & KIEMLE, 2000

Santos e colaboradores (2003) afirmaram que picos na região de 890 cm^{-1} a 1156 cm^{-1} são referentes à estruturas polissacarídicas. Na amostra MB avaliada, foram observados picos próximos a 889 cm^{-1}, podendo ser referente ao estiramento de CO de compostos glicosídicos (Kasaai, 2008).

Ao analisar os espectros e comparar os dados entre as membranas com diferentes concentrações da FM e a MB, foram observadas algumas diferenças.

O pico observado na região de 1024 cm^{-1} para a amostra MB sofreu deslocamento em relação às demais amostras, estando o pico da membrana M100FM observado em 1035 cm^{-1} (Figura 18). Este deslocamento indica que deve ter ocorrido interação como, por exemplo, ligações de hidrogênio entre os compostos químicos da FM e a quitosana da membrana.

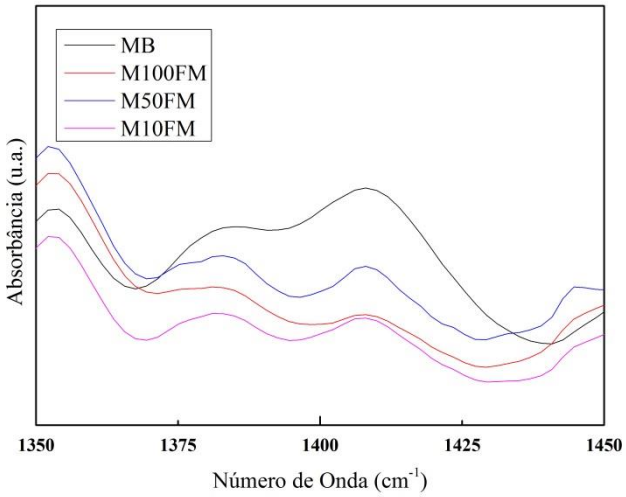
Figura 18. Espectros de FTIR de membranas de quitosana MB, M10FM, M50FM e M100FM, evidenciando o deslocamento de pico entre 1024 e 1035 cm^{-1}



Fonte: O autor.

Ainda, na região entre 1308 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} (observação de três picos neste intervalo, sendo eles em 1300 cm^{-1}, 1322 cm^{-1} e 1350 cm^{-1}), também foram observados diferenças espectrais entre a amostra MB e as amostras contendo FM, sendo que nos resultados verificou-se uma inversão de intensidade dos picos entre as amostras (Figura 19). De acordo com Santos e colaboradores (2003), nesta região são encontrados picos referentes à deformação axial de CN de grupos amino e picos correspondentes à deformação angular simétrica de grupamento CH_3.

Figura 19. Espectros de FTIR de membranas de quitosana MB, M10FM, M50FM e M100FM, inversão da intensidade dos picos entre 1380 e 1383 cm^{-1}



Fonte: O autor.

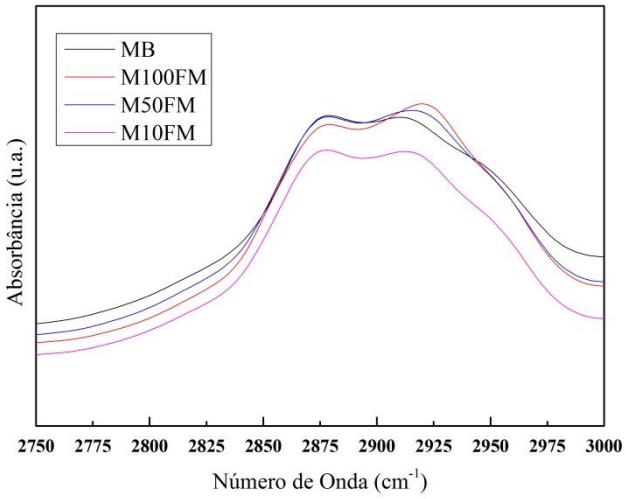
Em 1410 cm^{-1}, há um pico referente à deformação de grupamento CH_2, o qual pode sofrer alterações de acordo com a cristalinidade da amostra (KASAAI, 2008). Observou-se ainda um pico na região de 1559 cm^{-1} referente a grupamentos NH (KASAAI, 2008).

Na região de 1592 cm^{-1} observou-se um aumento da intensidade das bandas em todas as amostras que foi acompanhada do aumento da concentração de FM, este pico possivelmente é referente à deformação angular de NH (Santos et al., 2003).

Entre 1636 cm^{-1} e 1657 cm^{-1} observou-se o aumento da intensidade dos picos de modo que o aumento dos picos entre as membranas contendo FM deu-se pelo acompanhamento crescente de concentração de extrato nas amostras, ou seja, quanto maior a concentração de extrato, maior a intensidade do pico. Estes picos podem ser atribuídos a grupamentos C=O, considerando que, de acordo com Kasaai (2008), bandas entre 1663 cm^{-1} e 1626 cm^{-1} correspondem a estes grupamentos.

Também entre 1660 cm^{-1} e 1670 cm^{-1} (não apresentado) ocorreu uma inversão de intensidade dos picos para a amostra MB quando comparadas às membranas M10FM, M50FM e M100FM, também se observou o aumento da intensidade dos picos com o aumento da concentração de FM; de acordo com Santos e colaboradores (2003), picos nesta região são referentes à deformação axial de grupamentos C=O de amida I. Na região entre 1727 cm^{-1} e 1732 cm^{-1} observou-se também o aumento da intensidade dos picos acompanhando o aumento da concentração de FM; este pico é referente à deformação angular simétrica de metilas (CH_3) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2000). Vale ressaltar que na amostra branco não foram observados picos nesta região. Na região de 2877 cm^{-1} notou-se um pico referente ao estiramento de grupamento CH (KASAAI, 2008). Outro deslocamento foi observado no pico na região de 2915 cm^{-1} na membrana MB e 2922 cm^{-1} na membrana M100FM (Figura 20).

Figura 20. Espectros de FTIR de membranas MB, M10FM, M50FM e M100FM de FM. Deslocamento de pico entre 2915 cm^{-1} e 2922 cm^{-1}



Fonte: O autor.

Os picos e as alterações identificadas permitiram comprovar que ocorrem interações entre a quitosana e a FM, porém apenas o emprego desta técnica

isoladamente não permite elucidar as mesmas. As possíveis interações serão melhor exploradas com a avaliação dos resultados obtidos por espectroscopia UV-VIS.

5.4.7 Determinação de cor (UV-VIS)

Os resultados foram expressos de acordo com a escala CIELAB, na qual $L^* = 0$ (preto) para $L^* = 100$ (branco), de $-a^*$ (verde) para $+a^*$ (vermelho) e de $-b^*$ (azul) para $+b^*$ (amarelo). Os valores das médias obtidos para a cor das membranas MB e com diferentes concentrações de FM, em diferentes tempos estão dispostos na Tabela 11.

Ao manipular as amostras, é possível constatar visualmente que com o aumento da concentração de FM, as membranas tornam-se mais escuras e de coloração castanho escuro. Ou seja, as membranas tornam-se mais avermelhadas, a variável a^* passa de -1,993 (membrana branco, tempo 0) para 10,709 (membrana 100%, tempo 0); e mais amareladas, a variável b^* passa de 5,142 (membrana branco, tempo 0) para 57,911 (membrana 100%, tempo 0). Ainda é possível atestar que as membranas com menor concentração de FM são mais claras, L^* passa de 86,989 (MB, tempo 0) para 64,133 (M100FM, tempo 0). Todas estas alterações apresentam diferença estatística significativa ($p<0,05$, teste de Tukey).

Tabela 11. Medidas médias de cor (*L**, *a**, *b** e ΔE) das membranas de quitosana de acordo com a variação de tempo e concentração de FM (CONTINUA)

Amostra	Tempo (dias)	L^*	EP	*a**	EP	b^*	EP	Δ*E*	EP
MB	**T=0**	86,989^{a}	± 2,853	-1,933^{a}	± 0,060	5,142^{a}	± 0,220	12,675^{a}	± 2,295
	T=7	86,572^{a}	± 1,433	-2,268^{a}	± 0,097	6,740^{a}	± 0,332	12,294^{a}	± 1,308
	T=14	87,068^{a}	± 1,726	-2,954^{a}	± 0,156	8,294^{a}	± 0,463	13,394^{a}	± 0,918
	T=21	83,595^{a}	± 0,910	-1,931^{a}	± 0,095	6,025^{a}	± 0,257	14,596^{a}	± 0,904
	T=28	82,293^{ab}	± 1,588	-3,099^{a}	± 0,164	9,874^{a}	± 0,621	17,736^{a}	± 1,301
M10FM	**T=0**	85,143^{a}	± 1,298	-0,547^{a}	± 0,751	35,910^{b}	± 1,823	38,286^{b}	± 1,734
	T=7	72,203^{bc}	± 1,071	0,891^{ab}	± 0,848	37,035^{b}	± 2,955	43,638^{bc}	± 2,786
	T=14	79,909^{abc}	± 1,866	5,849^{bc}	± 0,933	49,049^{c}	± 1,539	51,010^{c}	± 1,921
	T=21	78,721^{abc}	± 1,276	2,952^{abc}	± 0,683	36,506^{b}	± 1,664	39,757^{b}	± 1,727
	T=28	70,226^{c}	± 2,031	7,726^{c}	± 0,572	47,954^{c}	± 1,002	54,372^{c}	± 1,597
M50FM	**T=0**	70,51^{c}	± 2,330	5,872^{bc}	± 1,859	56,676^{cd}	± 1,147	63,534^{d}	± 1,259

Tabela 11. Medidas médias de cor (*L**, *a**, *b** e ΔE) das membranas de quitosana de acordo com a variação de tempo e concentração de FM (FINAL)

	T=7	63,175^{cd}	± 1,110	11,035^{cd}	± 1,282	64,187^{de}	± 1,239	72,220^{de}	± 1,140
	T=14	55,466^{de}	± 1,782	19,363^{e}	± 0,422	58.512^{def}	± 2,707	73,443^{e}	± 2,436
	T=21	58,843^{de}	± 1,804	15,954^{de}	± 0,832	59.344^{def}	± 2,214	71,354^{de}	± 2,172
	T=28	49,721^{e}	± 2,538	19,502^{e}	± 1,351	61.463^{def}	± 1,874	79,465^{e}	± 0,826
M100FM	**T=0**	64,133^{cde}	± 1,337	10,709^{cd}	± 1,470	57.911^{ce}	± 2,144	67,511^{de}	± 1,619
	T=7	57,155^{def}	± 4,390	8,252^{cd}	± 2,732	54.122^{cef}	± 1,658	68,217^{de}	± 2,074
	T=14	49,002^{ef}	± 3,389	20,295^{e}	± 0,780	48.675^{c}	± 3,630	71,793^{def}	± 1,679
	T=21	50,102^{ef}	± 0,975	22,140^{e}	± 0,337	47.420^{c}	± 2,210	69,516^{def}	± 1,824
	T=28	33,123^{f}	± 0,864	23,457^{e}	± 0,420	42.192^{bc}	± 1,549	79,624^{def}	± 0,568

Duas médias seguidas da mesma letra, na mesma coluna, não apresentam diferença estatística significativa ($p<0,05$) pelo teste de Tukey. EP é o erro padrão da média.

Trabalhos envolvendo membranas de quitosana e ativos contendo compostos polifenólicos têm demonstrado este mesmo comportamento para *L**, *a** e *b** (RUBILAR et al., 2013; WANG et al., 2013; SIRIPATRAWN; HARTE, 2010). Rubilar e colaboradores (2013) ao desenvolver e avaliar membranas de quitosana com carvacrol, um composto polifenólico com atividade antimicrobiana e antifúngica, observaram as mesmas alterações de cor e sugeriram que este comportamento deve-se aos compostos polifenólicos. Do mesmo modo Siripatrawan e Harte (2010) utilizaram extrato de chá verde e Wang e colaboradores (2013) um chá rico em polifenólicos para impregnar membranas de quitosana, obtendo resultados semelhantes.

Ao analisar as amostras de membranas em relação ao tempo, quanto a *L**, é possível notar que as amostras MB e M10FM não apresentaram alterações significativas. Por outro lado, as membranas com maior concentração de FM (M50FM e M100FM) demonstraram escurecimento gradativo ao longo dos dias, de forma mais proeminente entre os tempos 0 dias e 28 dias após seu preparo.

Quanto aos valores de *a** e *b** é possível verificar alterações a partir da amostra M10FM em relação ao tempo. Porém é mais pronunciada especialmente na membrana M100FM, na qual os valores de *a** apresentam diferença significativa a partir de 14 dias, em comparação com o tempo 0 dias.

Para a diferença de cor total (ΔE) nota-se a heterogeneidade significativa entre as diferentes concentrações de FM. Esta diferença foi destacada também no trabalho de Wang e colaboradores (2013).

Leceta e colaboradores (2015) e Leceta, Guerrero e Caba (2013) avaliaram a cor de membranas de quitosana com diferentes concentrações de plastificante (glicerina), as quais foram testadas em diferentes tempos de estocagem e outras expostas ao calor. Estes autores observaram alterações de *a**, *b** e ΔE semelhantes às encontradas no presente trabalho. Ambos os trabalhos sugerem que estas alterações são decorrentes da reação de Maillard, na qual ocorre a condensação de grupos amino com grupos carbonila dos grupamentos terminais glucose redutores. Primeiramente envolvendo a formação de conjugados entre grupos carbonila com grupamentos amino da quitosana,

produzindo bases de Schiff, com subsequentes ciclos de produção de compostos Amadori e compostos poliméricos insolúveis e coloridos (YASIR et al., 2007).

Compostos fenólicos identificados na FM como o ácido gálico, por exemplo, apresentam grupos carbonila os quais poderiam interagir com a quitosana de acordo com a reação citada anteriormente. Isto justificaria as alterações de cor observadas no presente trabalho, bem como as características de solubilidade das membranas. Os resultados da análise térmica demonstraram que quanto maior a concentração de FM, menor é a hidratação da membrana, o que pode ocorrer devido à reação de Maillard. Estas reações possivelmente ocasionaram os dois deslocamentos (de 1024 para 1035 cm^{-1}; de 2915 para 2922 cm^{-1}) e as duas inversões de picos (entre 1380 e 1383 cm^{-1}; entre 1660 e 1670 cm^{-1}) observadas nos resultados de FTIR.

5.5 Atividade Antioxidante

Embora inúmeros trabalhos avaliem e explorem a atividade antioxidante de extratos de plantas ricos em compostos fenólicos (LOU et al., 2016; MRABET et a., 2016; WANG et al., 2016), poucos têm avaliado este potencial quando incorporados estes extratos à membranas de quitosana (FERREIRA et al., 2014; KANATT et al., 2012).

Da mesma forma, diversos trabalhos avaliam o potencial antioxidante de espécies do gênero *Euphorbia* como *Euphorbia tirucalli*, *Euphorbia supina*, *Euphorbia cotinifolia* e *Euphorbia heterofila* (MUNRO et al., 2015; ARAUJO et al., 2014; CHOI; LIM, 2014; JAYALAKSHMI; RAVEESHA; AMRUTHESH, 2014; KEERTHANA et al., 2014). Contudo, são escassos os trabalhos com a espécie *E. umbellata* que avaliam a sua atividade antioxidante (MUNHOZ et al., 2014).

A atividade antioxidante da FM liberada das membranas de quitosana foi determinada por dois métodos distintos: DPPH e ABTS, os quais testam a capacidade de capturar radicais livres. Os valores de inibição em porcentagem (%) e as CI_{50} (concentração necessária de antioxidante para reduzir em 50% o radical) para estes

testes, das membranas M50FM e M100FM estão apresentados no Apêndice - A. Os dados estão representados pelas médias ± desvio padrão.

Primeiramente, avaliando-se os resultados do teste de DPPH, observa-se que para a amostra M50FM a % de inibição em 24 horas foi de 85,49%, e para o ABTS foi de 100% no mesmo tempo. Para a membrana M100FM, em 24 horas foi atingida uma inibição de 77,45% para o teste DPPH e de 100% para o teste ABTS.

Neste sentido, Ferreira e colaboradores (2014) ao testar membranas de quitosana com extrato de bagaço de uva observaram uma inibição do radical $DPPH^{\bullet}$ de aproximadamente 35%, enquanto que para o radical $ABTS^{\bullet}$ obtiveram cerca de 25%. Por outro lado, Kanatt e colaboradores (2012) avaliaram membranas de quitosana com extrato de romã e de hortelã em diferentes tempos de obtenção das amostras a partir das membranas. O comportamento observado para a maioria das membranas foi o aumento da atividade antioxidante com o passar do tempo, atingindo um máximo de aproximadamente 80% de inibição do radical $DPPH^{\bullet}$. Os tempos, em horas, adotados por estes autores foram: 0,5, 1, 2, 6 e 24.

Os dados de CI_{50} obtidos a partir dos testes DPPH e ABTS para as amostras M50FM e M100FM estão representados na Tabela 12:

Tabela 12. Dados de CI_{50} dos testes DPPH e ABTS para as membranas M50FM e M100FM

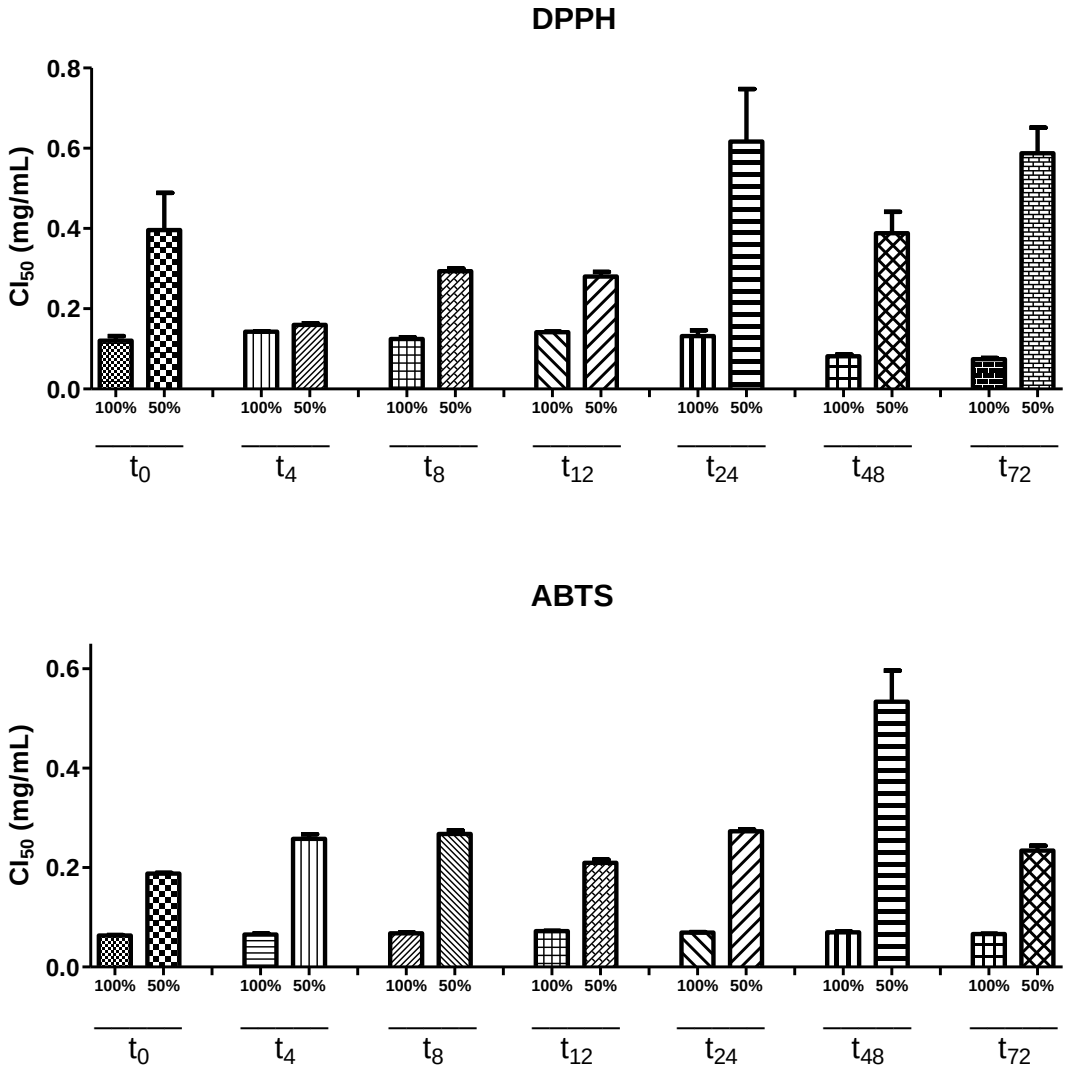
Amostra	Tempo (horas)	DPPH CI_{50} (mg.mL^{-1})	ABTS CI_{50} (mg.mL^{-1})
M50FM	**0**	0,400 ±0,160	0,188 ±0,002
	4	0,160 ±0,007	0,258 ±0,016
	8	0,293 ±0,012	0,268 ±0,012
	12	0,280 ±0,020	0,209 ±0,011
	24	0,620 ±0,226	0,273 ±0,006
	48	0,390 ±0,093	0,613 ±0,244
	72	0,590 ±0,110	0,234 ±0,016
M100FM	**0**	0,120 ±0,020	0,063 ±0,002
	4	0,143 ±0,001	0,065 ±0,003
	8	0,124 ±0,008	0,068 ±0,002
	12	0,142 ±0,001	0,072 ±0,001
	24	0,132 ±0,025	0,069 ±0,002
	48	0,082 ±0,008	0,070 ±0,002
	72	0,074 ±0,006	0,066 ±0,001

Minozzo (2015) ao avaliar o padrão quercetina (substância amplamente empregada como padrão de compostos fenólicos) quanto ao potencial antioxidante, DPPH e ABTS, encontrou valores de CI_{50} 0,368 mg.mL^{-1} (±0,193) e 0,068 mg.mL^{-1} (±0,016), respectivamente. A partir do qual se pode dizer que as formulações M50FM e M100FM demonstraram boa atividade *scavenger* dos radicais testados, sendo assim promissoras quanto à atividade biológica.

Avaliando-se os resultados do teste de DPPH, observa-se que para a membrana M50FM a CI_{50} em tempo 0 horas foi de 0,400 $mg.mL^{-1}$ e para o tempo máximo (72 horas) foi de 0,590 $mg.mL^{-1}$. Enquanto que para a membrana M100FM a CI_{50} em tempo 0 horas foi de 0,120 $mg.mL^{-1}$ e para o tempo de 72 horas foi 0,074 $mg.mL^{-1}$. Para o teste ABTS a CI_{50} para a amostra M50FM vai de 0,188 $mg.mL^{-1}$ (0 horas), para 0,234 $mg.mL^{-1}$ (72 horas), já para a amostra M100FM variou de 0,063 $mg.mL^{-1}$ (0 horas) para 0,066 $mg.mL^{-1}$ (72 horas).

Ao observar os gráficos das CI_{50} das membranas M50FM e M100FM para os testes DPPH e ABTS (Figura 22) é possível perceber que os resultados obtidos a partir da membrana M50FM são maiores do que para a membrana M100FM. Isto demonstra um maior potencial antioxidante obtido da amostra M100FM. Isto era esperado, visto que a atividade antioxidante é, principalmente, decorrente de substâncias presentes na FM, em especial os compostos fenólicos. Destacando-se especialmente para o teste DPPH os tempo 0, 24, 48 e 72 horas e todos os tempos do teste ABTS nos quais os dados apresentam diferença estatística significativa ($p<0,05$, teste de Tukey).

Figura 21. Atividade antioxidante das amostras liberadas a partir membranas de quitosana M50FM e M100FM, avaliada periodicamente em um período de 72 horas



Fonte: O autor.

A membrana M10FM apresentou valores de inibição inferiores a 50%, alcançando o máximo de 29,31% para DPPH e 37,5% para ABTS, sendo que não foi possível calcular CI_{50}, nos moldes experimentais determinados no presente trabalho. A amostra MB não demonstrou inibição nos testes.

5.6 Atividade Antimicrobiana

As membranas foram avaliadas pelo método de difusão em ágar e os resultados estão demonstrados na Tabela 13.

Tabela 13. Halos de inibição das membranas de quitosana impregnadas com FM

Membrana	**pH do meio de cultura**	***C. albicans*** **(mm)**	***S. aureus*** **(mm)**	***P. aeruginosa*** **(mm)**	***E. faecalis*** **(mm)**	***E. coli*** **(mm)**
MB	7,2	0	0	0	0	0
	5,5	0	0	0	0	0
M10FM	7,2	0	0	0	0	0
	5,5	0	0	8	0	0
M50FM	7,2	0	0	0	0	0
	5,5	0	7,5	10	0	0
M100FM	7,2	7	0	0	7,3	0
	5,5	6,5	13	10	7	0
Controle Positivo	7,2	17	24	31	16	30
	5,5	22	23	33	15	30

É possível notar inibição do crescimento *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis* principalmente na membrana M100FM e com pH do meio 5,5. O pH mais baixo, próximo ao pH da formulação e da pele inflamada, pode ter facilitado a difusão dos ativos. A membrana M50FM apresentou atividade para *S. aureus* e *P. aeruginosa* em pH 5,5, enquanto que a membrana M10FM demonstrou inibição apenas para *P. aeruginosa*. Nenhuma das formulações, nas condições testadas, foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli*.

Apesar da atividade conhecida da quitosana contra os micro-organismos testados (KONG et al., 2010), nas condições estabelecidas para o teste de difusão em ágar não foi possível observar resultados concordantes com a literatura (MÜLLER, 2013; KONG et al., 2010; GOY; BRITTO; ASSIS, 2009). Entretanto, o emprego do pH 5,5, mais próximo do pH da formulação, demonstrou resultados para *P. aeruginosa* nas 3 membranas contendo fração metanólica.

Ostrosky e colaboradores (2008) ao avaliar a utilização de técnicas para testar a atividade antimicrobiana de ativos naturais concluíram que a técnica de difusão em ágar é a mais disseminada, pela sua simplicidade de execução e interpretação. Apesar disto, a técnica com maior confiabilidade para avaliar esta atividade é a determinação de concentração inibitória mínima. Deste modo, os resultados observados, não excluem as membranas desenvolvidas como potenciais formulações antimicrobianas.

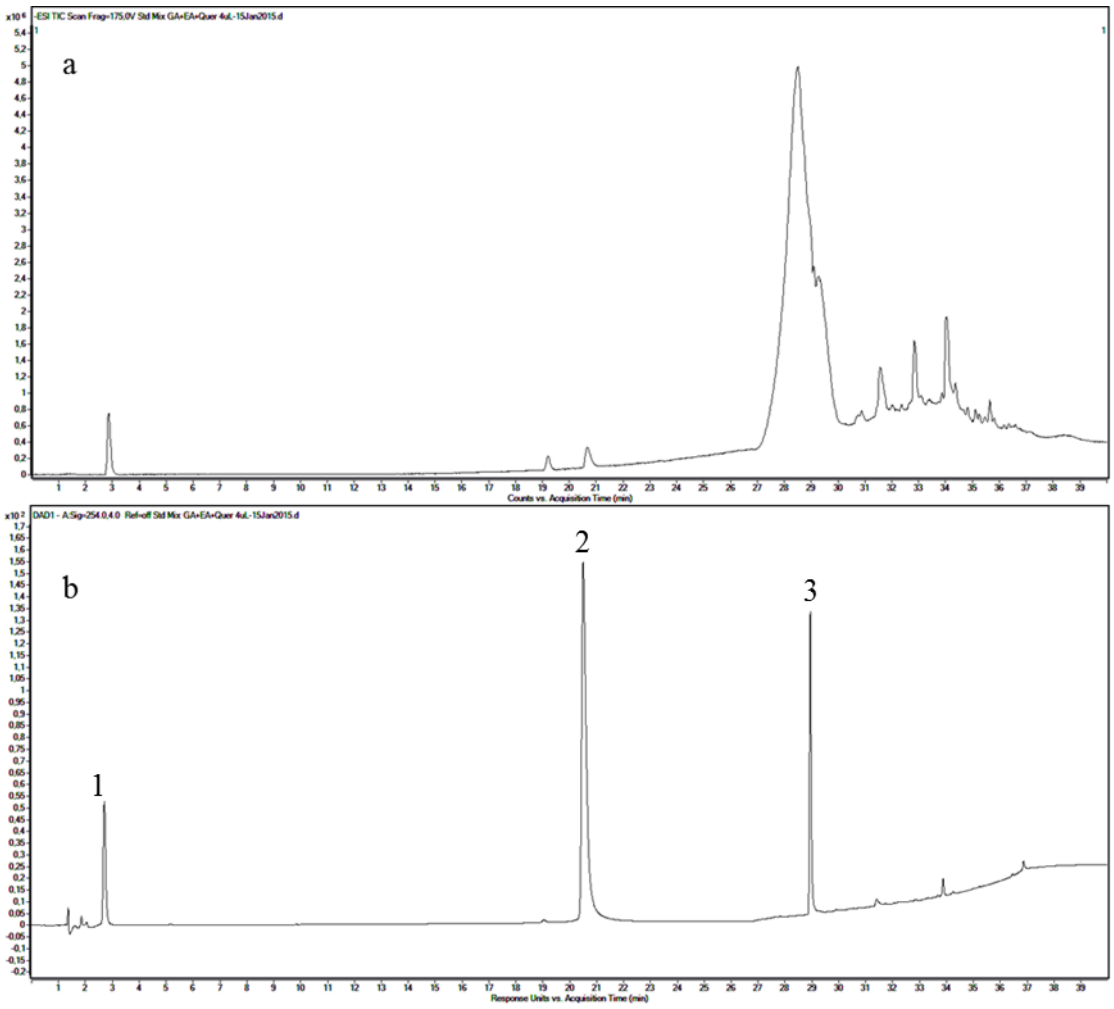
5.7 Estudo de permeação *ex vivo* – célula de difusão de Franz

Considerando que os compostos fenólicos são empregados em diversas formulações de aplicação tópica e demonstram reconhecida permeação cutânea (THITILERTDECHA; ROWAN; GUY, 2015; BARREIRA et al., 2013; HAN et al., 2014; DINIZ et al., 2007; BONINA et al., 1996), o presente estudo pretendeu verificar se a formulação proposta, com suas diferentes concentrações de FM, seria capaz de promover um transporte percutâneo das substâncias previamente identificadas na FM. Para tanto a identificação e quantificação destas substâncias foi realizada empregando a técnica de UHPLC-MS em amostras obtidas a partir do sistema de difusão vertical.

Aplicando as condições estabelecidas na avaliação qualitativa da FM, foram avaliadas as amostras obtidas a partir do uso do sistema de difusão vertical de célula de Franz e as amostras de padrões (ácido gálico, ácido elágico e quercetina).

As primeiras avaliações foram feitas para padrões ácido gálico, ácido elágico e quercetina e estão demonstradas na Figura 22:

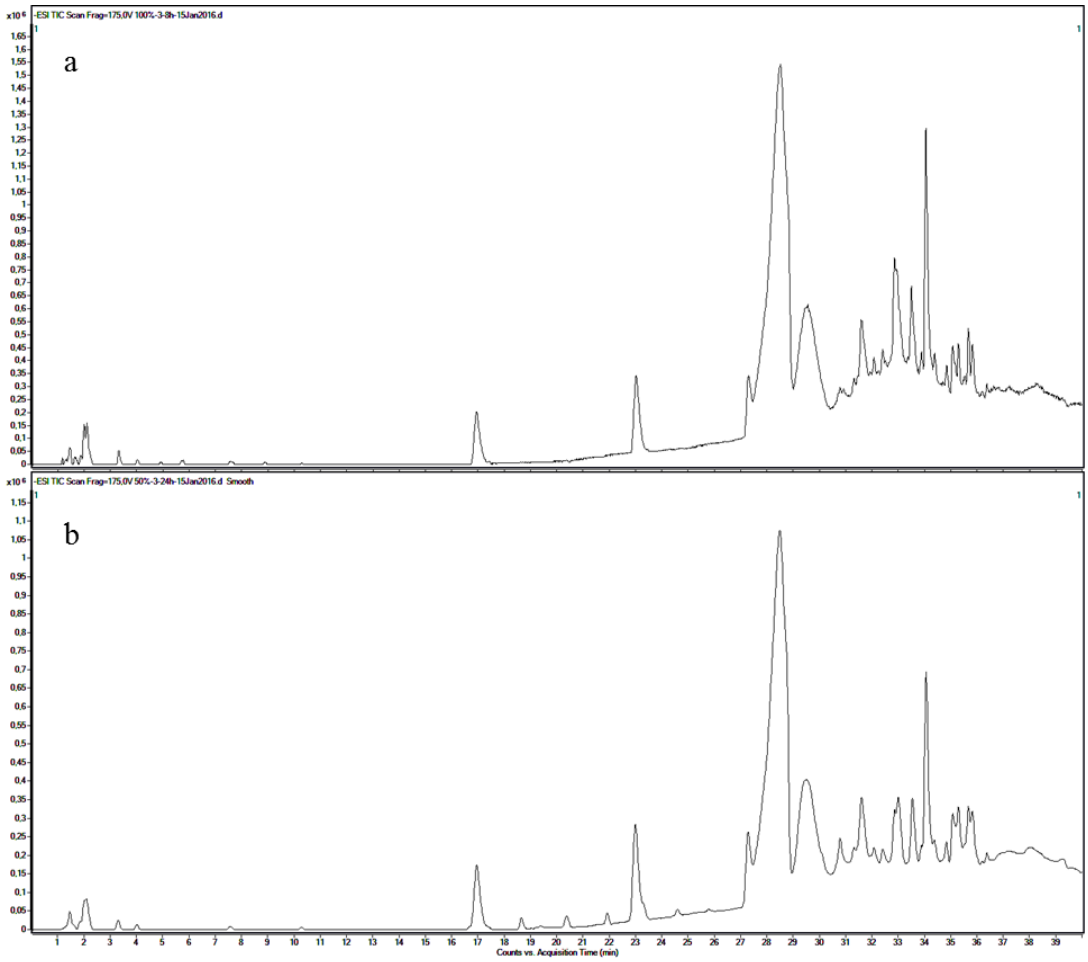
Figura 22. Espectros dos padrões ácido gálico (1), ácido elágico (2) e quercetina (3) obtidos por UHPLC-MS



a – cromatograma de íons totais obtido a partir de detector de massas; b – cromatograma obtido por detector UV a 254 nm.

As amostras das membranas MB e M10FM, M50FM e M100FM foram avaliadas (Figuras 23). Contudo, os picos referentes aos padrões não foram detectados nas mesmas. No entanto, considerando os resultados dos experimentos antioxidantes, as amostras de maior interesse são as M50FM e M100FM e os cromatogramas de íons totais dessas estão demonstradas na Figura 23.

Figura 23. Espectros das membranas M50FM (a) e M100FM (b) obtidos por UHPLC-MS



Apesar das substâncias padrão não terem sido detectadas nas amostras de acordo com a metodologia padronizada neste estudo, trabalhos como o de Nuño e colaboradores (2012), ao avaliarem a permeação cutânea de formulações com extratos ricos em compostos fenólicos, conseguiram quantificar 11 µg de compostos fenólicos. No mesmo sentido, Zhang e colaboradores (2013) identificaram e quantificaram 10 substâncias e Thitilertdecha, Rowan e Guy (2015) 4 substâncias representantes dos compostos fenólicos no ensaio de permeação.

Ainda que não tenha sido observada a permeação de polifenólicos, os resultados dos ensaios antioxidantes revelaram que os compostos da FM estão sendo liberados da

matriz polimérica. Desta forma, conjecturamos que a potencial ação anti-inflamatória da formulação seja tópica.

Considerações Finais

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando a técnica de UV-VIS foi possível quantificar os compostos fenólicos e flavonoides totais no extrato bruto e nas frações da casca do caule da espécie *E. umbellata*, definindo que a fração metanólica (FM) é a que contém a maior quantidade desses compostos. Os compostos fenólicos são conhecidos pelas suas ações antioxidantes, antimicrobianas e anti-inflamatórias e por isto a FM foi escolhida para compor a formulação da membrana de quitosana proposta neste trabalho.

Neste sentido, a avaliação cromatográfica empregando UHPLC-MS permitiu caracterizar a FM e sugerir 23 possíveis substâncias. As substâncias sugeridas são pertencentes às classes dos flavonoides, ácidos orgânicos e taninos, sendo que destas, 3 foram identificadas como sendo o ácido gálico, galato de etila e ácido elágico (por meio de experimentos de massas e avaliação de padrões de referência). Deste modo, além de reforçar a presença dos compostos fenólicos na FM, foi possível elencar algumas substâncias padrão (marcadores) que podem ser utilizadas na avaliação de controle da qualidade da própria fração, bem como de produtos que contenham esta fração na formulação. Além disto, estes dados contribuem para um maior conhecimento para a espécie vegetal, uma vez que a literatura ainda não traz muitos dados químicos sobre a mesma.

Os ensaios de caracterização (MEV e FEG, densidade, DSC e TGA, DRX, FTIR e determinação de cor UV-VIS) permitiram verificar particularidades da formulação, bem como avaliar as alterações e interações da FM com a membrana de quitosana. A análise multivariada feita ao longo do tempo com a membrana MB por FTIR, juntamente com as imagens do MEV e FEG, possibilitou determinar o plástico como material mais adequado para o preparo (molde) das amostras. As análises de FTIR e DRX também indicaram uma possível interação de compostos fenólicos da FM com a estrutura da membrana. Ainda, a determinação de cor permitiu verificar que estas interações possivelmente são decorrentes de uma reação de Maillard a qual gera compostos pouco solúveis e alteram a coloração das membranas.

Quanto aos testes DPPH e ABTS das membranas, foi possível determinar que as amostras M50FM e M100FM demonstraram potencial antioxidante promissor por um período de, pelo menos, 72 horas.

Do mesmo modo, para a atividade antimicrobiana a inibição do crescimento ocorreu principalmente para as formulações M50FM e M100FM, especialmente para *S. aureus*, *P. aeruginosa* no pH 5,5.

Sendo assim, apesar de ocorrerem interações químicas entre os compostos da FM e a quitosana, as maiores concentrações de fração, na formulação estudada, demonstraram-se promissoras para a aplicação tópica, uma vez que os experimentos de permeação *ex vivo* indicaram que os compostos existentes na membrana não são capazes de atravessar a pele, sugerindo que sua deposição, após a liberação, a partir da membrana, dê-se no local de aplicação.

Este trabalho apresenta como perspectivas a avaliação microbiológica das membranas de quitosana por realização da técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC), a realização de testes *in vivo* para avaliar o potencial anti-inflamatório e cicatrizante das formulações. Ainda, buscar elucidar as interações químicas que ocorrem entre a matriz de quitosana e compostos da fração metanólica do extrato das cascas de *E. umbellata*, e qual o real impacto dessas interações no potencial das formulações.

REFERÊNCIAS

AADIL, R. et al. Comparative study of in vitro antioxidant activity of plant extracts of *Acacia arabica*, *Murraya koeingii*, *Catharanthus roseus* and *Rouwolfia serpentina*. **Int. J. Phitomed.**, v. 4, p. 543-551, 2012.

ABREU, F. O. M. S. et al. Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Microondas. **Polím.**, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.

ABU-REIDAH, I. M. et al. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food Chem.**, v. 166, p. 179-191, 2015.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content and metabolism. **Nutr.**, v. 18, n. 1, 2002.

AHN, B. T. et al. A chemotaxonomic study on Euphorbiaceae in Korea. **Nat. Prod. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 86-98, 1995.

ALLEN Jr, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** 9. ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda., 2011. 716 p.

ALVES, A. C. S.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Nanoencapsulation of gallic acid and evaluation of its cytotoxicity and antioxidant activity. **Mat. Sci. Eng.**, v. 60, p. 126-134, 2016.

ALVES, M. V. Checklist das espécies de Euphorbiaceae Juss. Ocorrentes no semi-árido pernambucano, Brasil. **Acta. Bot. Bras.**, v. 12, n. 3, p. 485-495, 1998.

ANDERSEN, O.M.; JORDHEIM, M.; BYAMUKAMA, R.; MBABAZI, A.; SKAAR, I.; KIREMIRE, B. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1558-1563, 2010.

ANDERSEN, O. M. et al. Anthocyanins with unusual furanose sugar (apiose) from leaves of *Synadenium grantii* (Euphorbiaceae). **Phytochemistry**, v. 71, p. 1558, 2010.

ANSEL, H. C.; LOYD, V. A.; POPOVICH, N. G. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos.** 8. ed. São Paulo: Premier, 2005, 251 p.

ANTONISAMY, P.; DURAIPANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of friedelin isolated from *Azima*

tetracantha Lam. in mouse and rat models. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 63, p. 1070-1077, 2011.

ARAÚJO, K. M. et al. Identification of Phenolic Compounds and Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Properties of *Euphorbia Tirucalli* L. **Antioxidants**, v. 3, p. 159-175, 2014.

ASGAR, A. Anti-diabetic potential of phenolic compounds: a review. **Int. J. Food Prop.**, v. 16, p. 91-103, 2013.

BADGUJAR, S. B. Evaluation of hemostatic activity of latex from three Euphorbiaceae species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, p. 733-739, 2014.

BAGAVATHI, R.; SORG, B.; HECKER, E. Tigliane-type diterpene esters from *Synadenium grantii*. **Planta Med.** Stuttgart, v. 54, n. 6, p. 506-510, 1988.

BARREIRA, J. C. M. et al. *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits: Characterization in phenolic compounds and incorporation of their extracts in hydrogel formulations for topical application. **Ind. Crops Prod.**, v. 49, p. 169-176, 2013.

BENINCÁ, J. P. et al. Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. **Food Chem.**, v. 124, p. 468-475, 2011.

BEPPU, M. M.; ARRUDA, E.; SANTANA, C. C. Síntese e Caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polím.: Ciênc. e Tecnol.**, v. 1, p. 163,1999.

BERTOLDI, A. D. et al. Self-Medication Among Adolescents Aged 18 Years: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. **J. Adolescent Health**, v. 55, p. 175-181, 2014.

BITTNER, M. et al. Estudio quimico de especies de La família Euphorbiaceae em Chile. **Bol. Soc. Chil. Quim.**, v. 46, p. 1-15, 2001.

BONINA, F. et al. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **Int. J. Pharm.**, v. 145, p. 87-94, 1996.

BORGES, C. C. et al. *Bidens pilosa L*. (Asteraceae): traditional use in a community of southern Brazil. **,** v. 15, n. 1, 2013. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_pdf&pid=S1516-05722013000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 05 mai. 2014.

BORGES, R. et al. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanolic Extract from *Synadenium umbellatum* Pax. (Euphorbiaceae) Leaves and Its Fractions. **Evid.-Bas. Complem. Alt. Med.**, 2013. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1155/2013/715650>. Acesso em: 03 jan. 2016.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BURI, P.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à liberation prolongeé II. Matrices hydrophiles. **Pharm. Acta Helv.**, v. 55, n. 7-8, p. 189-197, 1980.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **J. Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, P. M. B. G. M.; MERCÚRIO, D. G. Farmacologia e a Pele. **Ver. Bras. Med.**, v. 66, p. 15-21, 2009.

CARVALHO, M. F. et al. Utilization of medicines by the Brazilian population, 2003. **Cad. Saúde Pública**, v. 21, p. S100-S108, 2005.

CHE, H. et al. *Euphorbia supina* inhibits inflammatory mediators in mouse bone marrow-derived mast cells and macrophages. **Int. Immunopharmacol.**, v. 29, p. 966-973, 2015.

CHAO, A.-C. Preparation of porous chitosan/GPTMS hybrid membrane and its application in affinity sorption for tyrosinase purification with *Agaricus bisporus*. **J. Membrane Sci.**, v. 311, p. 306-3018, 2008.

CHATURVEDULA, V. S. P.; HUANG, R. Isolation and NMR spectral studies of Dihydromyricetin. **J. Pharmacog. Phytochem.**, v. 2, n. 4, p. 113-115, 2013.

CHEN, J. et al. In Vitro Anti‐inflammatory Activity of Fractionated *Euphorbia hirta* Aqueous Extract on Rabbit Synovial Fibroblasts. **Biomed. J.**, v. 38, n. 4, p. 301-306, 2015.

CHIRINOS, R. et al. Sacha inchi (*Plukenetia volubilis*): A seed source of polyunsaturated fatty acids, tocopherols, phytosterols, phenolic compounds and antioxidant capacity. **Food Chem.**, v. 141, p. 1732-1739, 2013.

CHOI, H. M.; LIM, S. Y. Effect of *Euphorbia supina* Extract on Antioxidant Activity. **The Open Nutrac. J.**, v. 7, p. 28-32, 2014.

COSTA, E. M. et al. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. **Anaerobe**, v. 18, p. 305-309, 2012.

COSTA, T. A. C. et al. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córneas de coelhos. **Arq. Bras. Oftalmol.** V. 69, n. 6, p. 817, 2006.

COSTA, J. O. et. al. Structural and functional comparison of proteolytic enzymes from plant latex and snake venoms. **Biochemie**., v. 92, p. 1760, 2010.

COSTA, E. M. et al. Evaluation and insights into chitosan antimicrobial activity against anaerobic oral pathogens. **Anaerobe**, v. 18, p. 305-309, 2012.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Rer. Virt. De Quím.**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 19, n. 2, 2009.

CURCIO, M. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. **J. Agr. Food Chem.**, v. 57, p. 5933-5938, 2009.

da SILVA, A. L. A. **Síntese e caracterização de cromitas de lantânio dopadas com estrôncio e bário para aplicação em células a combustível de óxido sólido.** 2011, 129 f. Tese (Doutorado em ciências em tecnologia de processos químicos e bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

DAS, N. G.; DAS, S. K. Controlled-release of oral dosage forms. Formulation, Fill & Finish – a Technology Primer 2003 – a supplement to Pharm. Tec., v. 27, p. 10-16, 2003. Disponível em: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/232003/59302/article.pdf> Acesso em: 10 ago. 2011.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **J. Biotechnol. Biod.**, v. 4, n. 3, p. 184-191, 2013.

DINIZ, A. et al. Permeability Profile Estimation of Flavonoids and other Phenolic Compounds by Biopartitioning Micellar Capillary Chromatography. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 8372-8379, 2007.

DASARI, N. P. et al. Quantification of phytochemical constituents and in vitro antioxidant activity of *Synadium grantii*. **Free Radicals and Antiox.**, v. 2, n. 2, p. 68, 2012.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. **Vis. Acad.**, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DE-PAULA, K. B. et al. Self-Medication Among Adolescents Aged 18 Years: The 1993 Pelotas (Brazil) Birth Cohort Study. **Braz. Oral Res.**, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2014.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory Agents: Present and Future. **Lead. Edge Rev.**, v. 140, p. 935-950, 2010.

DO CAMPO, P. et al. Eritrodermia secundaria a planta productora de látex (*Synadenium grantii*). **Arch. Arg. de Ped.**, v. 108, p. 126-129, 2010.

DURGAWALE, P. P. et al. Differential erythrocyte agglutination pattern in normal and cancer patients with *Synadenium grantii* root (Hook f) lectin. **Ind. J. Clinical Biochem.**, v. 16, n. 1, p. 110, 2001.

ELENDRAN, S.et al. The physicochemical properties of geraniin, a potential antihyperglycemic agent. **Pharm. Biol.**, p. 1-8, 2015.

ELY, L. S. et al. Use of anti-inflammatory and analgesic drugs in an elderly population registered with a Family Health Program. **Rev. Bras. Geriatr. Gerontol,** v. 18, n. 3, p. 475-485, 2015.

EL-SHANAWANY, A. M. et al. Chemical constituents, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Anisotes trisulcus*. **Bul. Facult. Pharm.**, Cairo University, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.02.004>. Acessado em: 28/05/2014.

EPURE, V. et al. Structure and properties of glycerol plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohyd. Polym.**, v. 83, n. 2, p. 947-952, 2011.

ERNST, M. et al. Global medicinaluses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 176, p. 90-101, 2015.

FARMACOPÉIA Brasileira. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERREIRA, A. S. et al. Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. **Carb. Polym.**, v. 113, p. 490-499, 2014.

FINISIE, M. R. et al. Synthesis of calcium-phosphate and chitosan bioceramics for bone regeneration. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 73, n. 4, p. 525, 2001.

FLORES, M. P.; CASTRO, A. P. C. R.; NASCIMENTO, J. S. Topical analgesics. **Rer. Bras. Anestesiol.**, v. 62, n. 2, p. 244-252, 2012.

FORZZA, R. C. et al. New Brazilian Floristic List Highlights Conservation Challenges. **Bioscience**, v. 62, n. 1, p. 40-45, 2012.

FRACASSETTI, D. et al. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin C and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myriaria dubia*). **Food Chem.**, v. 139, p. 578-588, 2013.

FWU-LONG, M. et al. Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. **J. Biom. Materials Reserc.,** v. 59, n. 3, p. 438–449, 2002.

FWU-LONG, M. et al. Asymmetric chitosan membranes prepared by dry/wet phase separation: a new type of wound dressing for controlled antibacterial release. **J. Membrane Sci.**, v. 212, p. 273-254, 2003.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007, 576 p.

GELEIJNSE, J. M. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis: the Rotterdam Study. **Arch. Intern. Med.**, v. 159, n. 18, p. 2170-2174, 1999.

GEUSENS, B. et al. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.43, p. 199-211, 2011.

GIBIS, M.; ZEEB, B.; WEISS, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. **Food Hydrocolloid.**, v. 38, p. 28-39, 2014.

GINANI, M. F. et al. Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. **Quim. Nova**, v. 22, n. 6, p. 801, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOY, R. C.; BRITTO, D. de; ASSIS, O. B. G. A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. **Pol.: Ciênc. e Tecnol.**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Quim. Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C. M. O. et al. (orgs) **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Editora da UFRGS, Editora da UFSC. Porto Alegre/Florianópolis, 2005.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 434-436.

HAN, S. B. et al. Physical characterization and in vitro skin permeation of solid lipid nanoparticles for transdermal delivery of quercetin. **Int. J. Cosmetic Sci.**, v. 36, p. 588-597, 2014.

HASSAN, E. M.; MOHAMMED, M. M. D.; MOHAMED, S. M. Two new phorbol-type diterpene esters from *Synadenium grantii* Hook f. leaves. **Rec. Nat. Prod.**, v. 6, p. 255, 2012.

HERTOG, M. G. L. Epidemiological evidence on potential health roperties of flavonoids. **P. Nutr. Soc.**, v. 55, p. 385-397, 1996.

HIRANO S.; TOBETTO K.; NOISHIKI Y. SEM ultrastructure studies of N-acyl- and N-benzylidene-chitosan and chitosan membranes. **J. Biomed. Mater. Res**., v. 5, n. 6, p. 903-11, 1981.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomed. Pharmacother.**, v. 51, n. 8, p. 305-310, 1997.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food Chem. Toxicol.**, v. 37, n. 9-10, p. 937-942, 1999.

HOLLMAN, P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. **J. Sci. Food Agric.**, v. 81, n. 9, p. 842-852, 2001.

HORN, J. W. et al. Phylogenetics and the evolution of major structural characters in the giant genus *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **Molec. Phylogenetic. Evol.**, v. 63, p. 305-326, 2012.

HYUN, T. K. et al. Anti-inflammatory activity and phenolic composition of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. **Ind. Crop. Prod.**, v. 74, p. 263-270, 2015.

JAHAN, N. et al. Phenolic acid and flavonol contents of gemmo-modified and native extracts of some indigenous medicinal plants. **Pakist. J. Bot.**. v. 45, n. 5, p. 1515-1519, 2013.

JAYALAKSHMI, B.; RAVEESHA, K. A.; AMRUTHESH, K. N. Evaluation of antibacterial and Antioxidant potential of *Euphorbia cotinifolia* linn. Leaf extracts. **Chem. Ind. Eng. Q.**, v. 20, n. 1, p. 19-28, 2014.

JOHNSON, L. F.; HASSELMAN, D. P. H. Thermal diffusivity and conductivity of a carbon fibre-reinforced borosilicate glass. **J. Mater. Sci.**, v. 22, p. 3111-3117.

JOSUÉ, A. et al. Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(ácido acrílico). **Polím.: Ciênc. e Tecnol.**, v. 10, n. 3, p. 116, 2000.

JUDD, W. S. et al. **Plant systematics – a phylogenetic approach.** 2. ed. Sunderland, Sinauer Associates, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 84 p.

KANATT, S. R. et al. Active chitosan-polyvinyl alcohol films with natural extracts. **Food Hydrocolloid.**, v. 29, p. 290-297, 2012.

KANG, J. et al. Bioactivities of açaí (*Euterpe precatoria* Mart.) fruit pulp, superior antioxidant and anti-inflammatory properties to *Euterpe oleracea* Mart. **Food Chem.**, v. 133, p. 671-677, 2012.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohyd. Polym.**, v. 71, p. 497-508, 2008.

KEERTHANA, K. et al. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of *Euphorbia heterophylla* L. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 6, p. 549-553, 2014.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histologia e Biologia Celular:** uma introdução à Patologia. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, 704 p.

KINGHORN, D.A. Major skin-irritant principle from *Synadenium grantii*. **J. Pharm. Sci.**, v. 69, n. 12, p. 1446, 1980.

KITTUR, F. S. et al. Low molecular weight chitosans-preparation by depolymerization with *Aspergilus niger* pectinase, and characterization. **Carb. Res.**, v. 338, p. 1283-1290, 2003.

KONG, M. et al. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **Int. J. of Food Microbiol.**, v. 144, p. 51-63, 2010.

KOST, J.; LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v. 64, p. 327-341, 2012.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 50-88.

LECETA, I.; GUERRERO, P.; CABA, K. de la. Functional properties of chitosan-based films. **Carb. Polym.**, v. 93, p. 339-346, 2013.

LECETA, I. et al. Ageing of chitosan films: Effect of storage time on structure and optical, barrier and mechanical properties. **Europ. Pol. J.**, v. 66, p. 170-179, 2015.

LEE, D. E. et al. Euphorbiaceae: Acalyphoideae fossils from early Miocene New Zealand: *Mallotus–Macaranga* leaves, fruits, and inflorescence with in situ *Nyssapollenites endobalteus* pollen.**Rev. Palaeobot. Palyno.**, v. 163, p. 127-138, 2010.

LEE, S. H. et al. Hydrolysable tannins from Euphorbia thymifolia. **Phytochemistry**, v. 29, n. 11, p. 3621-3625, 1990.

LEHR, C. M et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **Int. J. Pharm.**,v. 78, p. 43, 1992.

LI, X. et al. Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs. **Int. J. Pharm.**, v. 420, p. 371-377, 2011.

LIU, J. et al. Size effect on the thermal conductivity of ultrathin polystyrene films. **Appl. Phys. Lett.**, v. 104, p. 153110/4, 2014.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrifílicos. **Braz. J. Pharm. Sciences**, v. 41, n. 2, abr./jun., 2005.

LOU, S. et al. Phenolic content, antioxidant activity and effective compounds of kumquat extracted by different solvents. **Food Chem.**, v. 197, p. 1-6, 2016.

LUZ, L. E. C. et al. Cytotoxicity of latex and pharmacobotanical study of leaves and stem of *Euphorbia umbellata* (Janaúba). **Rev. Bras. de Farmacog.**, v. 25, p. 344-352, 2015.

MACHADO, A. A. **Caracterização fitoquímica e avaliação da citotoxicidade de *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae).** 2008, 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

MADELEINE-PERDRILLAT, C. et al. Water-induced local ordering of chitosan polymer chains in thin layer films. **Carbohyd. Polym.**, v. 118, p. 107-114, 2015.

MAJID, M. et al. Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic activities of *Euphorbia dracunculoides*. **BMC Compl. Alt. Med.**, v. 15.

MANO, D. M. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos com vitamina E TPGS para veiculação de siRNA na terapia gênica**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MARQUES, G. S. et al. Evaluation of procedure for spectrophotometric quantification of total flavonoids in leaves of *Bauhinia forficate* Link. **Quim. Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MARTINELLI, G.; MORAES, M. A. **Livro Vermelho da Flora do Brasil.** 1. ed. Rio de Janeiro: Andrea Jakobson: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotech. Adv.**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MELO-REIS, P. R. et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Biol.**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

MENON, M. et al. Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, f. **Plant Sci.**, v. 163, p. 131-139, 2002.

MINOZZO, B. R. **Ação gastroprotetora da fração metanólica das cascas de *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns:** envolvimento de ciclooxigenases, óxido nítrico e seu papel antioxidante. 2016, 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)

– Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2016.

MORIMOTO, M. et al. Synthesis of organosoluble chitosan derivatives with polyphenolic side chains. **Carbohyd. Polym.**, v. 90, p. 1259-1264, 2012.

MOTA, M. F. et al. Investigation of Ehrlich ascites tumor cell death mechanisms induced by *Synadenium umbellatum* Pax. **J. Ethnopharmacol.**, v. 139, p. 319-329, 2012.

MRABET, A. et al. Antioxidant phenolic extracts obtained from secondary Tunisian date varieties (*Phoenix dactylifera* L.) by hydrothermal treatments. **Food Chem.**, v. 196, p. 917-924, 2016.

MUNHOZ, A. C. M. et al. Chemical and Pharmacological Investigation of the Steam Bark of *Synadenium grantii*. **Planta Med.**, v. 80, p. 458-464, 2014.

MÜLLER, L. **Incorporação de óleo essencial de cravo em membranas de quitosana e avaliação da atividade cicatrizante e antimicrobiana.** 2013, 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MUTHURAMAN, A.; SOOD, S.; SINGLA, S. K. The antiinflammatory potential of phenolic compoundsfrom *Emblica officinalis* L. in rat. **Inflammopharmacol.**, v. 19, p. 327-334, 2011.

MUNRO, B. et al. Phytochemical, Antioxidant and Anti-Cancer Properties of *Euphorbia* tirucalli Methanolic and Aqueous Extracts. **Antioxidants**, v. 4, p. 647-661, 2015.

NADPAL, J. D. et al. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. **Food Chem.**, v. 192, p. 907-914, 2016.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. **J. Pharmaceut. Biomed.**, V. 41, P. 1523-1542, 2006.

NAZEEM, P. A. et al. In silico docking studies of phytocompounds on pi3k/nf-κb mediated signalling pathway. **Int. J. Pharma Bio Sci.**, v. 5, n. 1, p. 721-729, 2014.

NAYAK, S. B. et al. Wound Healing Activity of the Fruit Skin of *Punica granatum*. **J. Med. Food**, v. 16, n. 9, 2013.

NOGUEIRA, I. A. L. **Atividade antitumoral e antiangiogênica de *Synadenium umbellatum* PAX in vitro e in vivo**.2008, 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 549-554, 2006.

NUÑO, G. et al. Antioxidant/Antibacterial Activities of a Topical Phytopharmaceutical Formulation Containing a Standardized Extract of *Baccharis incarum*, an Extremophile Plant Species from Argentine Puna. **Phytother. Res.**, v. 26, p. 1759-1767, 2012.

OGAWA, K.; YUI, T.; MIYA, M. Dependence on the Preparation Procedure of the Polymorphism and Cristallinity of Chitosan Membranes. **Biosci. Biotech. Biochem.**,v. 56, n. 6, p. 858-862, 1992.

OLIVEIRA, R. B. et al. Toxicidade aguda de látex e extrato etanólico de folhas de *Synadenium umbellatum* em camundongos. **Ver. Eletr. de Farm**. Goiânia, v. 2, n. 2, suplemento, 2005.

OLIVEIRA, R. B.; LIMA, E.M. Polímeros na obtenção de sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Eletr. de Farm.**, v. 3, n. 1, p. 29-35, 2006.

OLIVEIRA, T. L. et al. Antitumoural effect of *Synadenium grantii* Hook f. (Euphorbiaceae) latex. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 263-269, 2013.

ORTÊNCIO, W. B. **Medicina popular do centro-oeste**. 2. Ed. Thesaurus, Brasília, 1997.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, p. 301-307, 2008.

OUESLATI, S. et al. Phenolic content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities ofthe edible halophyte *Suaeda fruticosa* Forssk. **Food Chem.**, v. 132, p. 943-947.

ÖZBILGIN, S.; ÇITOGLU, G. S. Uses of some euphorbia species in traditional medicine in turkey and their biological activities. **Turk J. Pharm. Sci.**, v. 9, n. 2, p. 241-256, 2012.

PATE V.; PATEL M.; PATEL R. Chitosan: A unique pharmaceutical excipient. **Drug Develop. Del.**, v. 5, n. 6, p. 1, 2005.

PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 18, n. 1, p. 18-23, 2004.

PELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid radical cation decolorization assay. **Methods Enzymol.**, v. 299, p. 379-389, 1999.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **J. Biotechnol. and Biod.**, v. 3, n. 4, p. 146-152, nov. 2012.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacog. Rev.**, v. 6, p. 1-5, 2012.

PFUNDSTEIN, B. et al. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1132-1148, 2010.

PRASHANTH, K.V.H.; KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. **Carbohyd. Polym.**, v. 50, p. 27-33, 2002.

PREMARATNA, A.; SHDAKSHARASWAMY, M.; NANJAPPA. Isolation, purification and properties of a lectin from the latex *Synadenium grantii* Hook f. **Ind. J. of Biochem. & Bioph.**, v. 18, p. 32-35, 1984a

PREMARATNA, A. et al.. Some biological properties of *Synadenium grantii* lectin. **Ind. J. Pathol. Microbiol.**, v. 27, p. 91, 1984b.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Fermentation and dry fractionation increase bioactivity of cloudberry (*Rubus chamaemorus*). **Food Chem.**, v. 197, p. 950-958, 2016.

QUINTÃO, F. J. O. et al. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 23, n.1, p. 101-107, 2013.

RAMANANDRAIBE, V. et al. Antiplasmodial pheolic compunds from *Piptadenia pervillei*. **Planta Med.**, v. 74, p. 417-421, 2008.

RAJESH, R. et al. Purification and characterization of 34-kDa, heat stable glycoprotein from *Synadenium grantii* latex: action on human fibrinogen and fibrin clot. **Biochimie**, v. 88, p. 1313-1322, 2006.

RIZC, A.-F. M. The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae. **Bot. J. Linn. Soc.**, v. 94, p. 293-326, 1987.

RUBILAR, J. F. et al. Physico-mechanical properties of chitosan films with carvacrol and grape seed extract. **J. Food Eng.**, v. 115, p. 466-474, 2013.

SALEEM, U. et al. Anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-pyretic activities of latex and leaves methanol extract of *Euphorbia helioscopia*. **Asian Pac. Trop. Dis.**, v. 5, n. 4, p. 322-328.

SANTOS, J. E. et al. Caracterização de quitosana comerciais de diferentes origens. **Polím.: Ciênc. e Tecnol.**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SOARES, L. A. L. et al. Total Flavonoid Determination for the Quality Controlof Aqueous Extractives from *Phyllanthus niruri* L.**Lat. Am. J. Pharm.**, v. 22,n. 3, p. 203-207, 2003.

SHARAF, M.; EL-ANSARI, M. A.; SALEH, N. A. M. Flavonoids of four Cleome and Three *Capparis* species. **Biochem. System. Ecol.,** v. 25, n. 2, p. 161-166, 1997.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P. R. (2004a). Produtos de origem natural e o desenvolvimento de medicamentos. In: **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Editora da Universidade/UFRGS e UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, p. 371-400.

SHI, Q. W.; SU, X. H.; KIYOTA, H. Chemical and pharmacological research of the plants in genus *Euphorbia*. **Chem. Rev.**, v. 108, p. 4295-4327, 2008.

SHYONG, J. Y. et al. Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. **Biomaterials**, v. 22, n. 2, p. 165, 2001.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: Derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

SILVA, L. C. et al. Antimicrobial Activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a Biomonitored Study. **Lat. American J. Pharm.**, v. 30, n. 1, p. 147-153, 2011.

SILVA, S. S. et al. Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. **Carbohyd. Polym.**, v. 98, p. 581-588, 2013.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 5. ed., Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5. ed. Florianópolis: Ufsc, 2003.

SIRAT, H.; REZALI, M. F.; UJANG, Z. Isolation and identification of radical scavenging and tyrosinase inhibition of polyphenols from *Tibouchina semidecandra* L. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, p. 10404-10409, 2010.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B. R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Food Hydrocolloid.**, v. 24, p. 770-775, 2010.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Rer. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOUSA, C. M. de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punnus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents**. J. Sci. Food Agric.**, v.19, p. 63-68, 1959.

TANG, Q. et al. LC-MS method for detecting prostratin in plant extracts and identification of a high-yielding population of *Euphorbia fischeriana*. **Phytochem. Lett.**, v. 5, p. 214-218, 2012.

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. **Herbarium Compêndio de Fitoterapia**. 2. ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico, 1995.

THITILERTDECHA, P.; ROWAN, M. G.; GUY, R. H. Topical formulation and dermal delivery of active phenolic compounds in the Thai medicinal plant – *Clerodendrum petasites* S. Moore. **Int. J. Pharm.**, v. 478, p. 39-45, 2015.

TIMMERS, M. A. et al. Characterization of Phenolic Compounds and Antioxidant and Antiinflammatory Activities from Mamuyo (*Styrax ramirezii* Greenm.) Fruit. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 10459-10465, 2015.

TORRES, A. A. F. N. et al. Microesferas de quitosana para utilização como sistemas de liberação controlada de fitoterápicos. **IV CONNEPI – Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica.** Belém – PA, 2009.

TRINDADE, M. J. S.; LAMEIRA, O. A. Species from the Euphorbiaceae family used for medicinal purposes in Brazil. **Rev. Cub. De Plantas Med.**, v. 19, n. 1, p. 292-309, 2014.

VALLADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L.C. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Braz. J. of Pharm. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 631-638, 2007.

VILLANOVA, J.C.O.; ORÉFICE, R. L. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Pol.: Ciênc. e Tecnol.**, v. 20, n. 1, p. 51-64, 2010.

VILLAS BÔAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n.6, p. 1463-1471, 2007.

VODNAR, D. C. Inhibition of Listeria monocytogenes ATCC 19115 on ham steak by tea bioactive compounds incorporated into chitosan-coated plastic films. **Chem. Central J.**, v. 74, n. 6, p. 1-6, 2012.

WANG, L. et al. Structural characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of the phenolic-rich fraction from defatted adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. ma-yuen Stapf) seed meal. **Food Chem.**, v. 196, p. 509-517, 2016.

WANG, L. et al. Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. **Food Hydrocolloid.**, v. 32, p. 35-41, 2013.

WANG, L. et al.. Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. **J. Biomed. Mater Res.**, v. 63, n. 5, p. 610-618, 2002.

WILLI, P.; CHANDRA, P. S. Chitosan and alginate wound dressings: A short review. **Trends Biomater. and Artif. Organs**, v. 18, n. 1, 2004.

YANG, A. M. et al. Biflavonoids from *Euphorbia altotibetica*. **Chem. of Nat. Compounds**, v. 51, n. 6, 2015.

YANG, Z. G. et al. Inhibitory effects of constituents from *Euphorbia lunulata* on differentiation of 3T3-L1 cells and nitric oxide production in RAW264.7 cells. **Molecules**, v. 16, p. 8305-8318, 2011.

YASIR, S. B. M. et al. The impact of Maillard cross-linking on soy proteins and tofu texture. **Food Chem.**, v. 104, p. 1502-1508, 2007.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim. Nova**, v. 24, n.1, p. 147-152, 2001.

ZHANG, H.; ZHAO, Y. Preparation, characterization and evaluation of tea polyphenole-Zn complex loaded β-chitosan nanoparticles. **Food Hydrocolloid.**, v. 48, p. 260-273, 2015.

ZHANG, L. et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Selected MedicinalPlants Containing Phenolic and Flavonoid Compounds. **J. Agr. Food Chem.**,v. 59, p. 12361-12367, 2011.

ZHANG, L.; KOSARAJU, S. L. Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. **Eur. Polym. J.**, v. 43, p. 2956-2966, 2007.

ZHANG, C. et al. Novel Chitosan-Derived Nanomaterials and Their Micelle-Forming Properties. **J. Agr. Food Chem.**, v. 54, p. 8409-8416, 2006.

ZHANG, Q. et al. Effect of Vehicles on the Maximum Transepidermal Flux of Similar Size Phenolic Compounds. **Pharm. Res.**, v. 30, p. 32-40, 2013.

ZHANG, Y. et al. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity. **PLOS One**, v. 9, n. 8, p. 1-11, 2014.

Apêndice A – Resultados dos ensaios antioxidantes obtidos a partir das membranas de quitosana contendo fração metanólica do extrato das cascas de *E. umbellata*

Amostra	Tempo horas	Concentração mg/mL	DPPH %		CI50 mg/mL	Concentração mg/mL	ABTS %		CI50 mg/mL
M50FM	0	0,531	76,16	±1,56	0,400 ±0,160	0,600	100,23	±0,55	0,188 ±0,002
		0,354	61,55	±2,14		0,400	98,99	±0,59	
		0,142	23,88	±3,18		0,160	43,59	±1,88	
		0,708	15,45	±5,68		0,080	20,29	±2,77	
		0,035	11,02	±2,42		0,040	5,03	±4,40	
		0,007	5,58	±2,03		0,008	-6.14	±1,62	
	4	0,974	97,18	±4,89	0,160 ±0,007	0,916	100,12	±0,81	0,258 ±0,016
		0,649	84,19	±2,84		0,611	100,41	±0,58	
		0,260	80,96	±1,28		0,244	50,80	±3,80	
		0,130	33,76	±8,01		0,122	23,84	±3,23	
		0,065	15,21	±5,20		0,061	8,84	±1,17	
		0,0130	7,64	±4,70		0,012	-1,59	±6,70	

8	0,971	81,75	±1,90		0,923	99,57	±0,26	
	0,648	85,44	±1,49		0,615	100	±0	
	0,259	37,40	±3,01	0,293 ±0,012	0,246	51,08	±2,36	0,268 ±0,012
	0,130	5,44	±2,02		0,123	25,41	±1,86	
	0,065	17,39	±2,94		0,062	13,73	±3,64	
	0,013	7,28	±2,04		0,012	2,64	±1,86	
12	0,962	84,28	±2,31		0,886	99,33	±0,88	
	0,641	83,42	±1,70		0,590	99,15	±0,28	
	0,257	43,44	±4,86	0,280 ±0,020	0,236	58,72	±2,85	0,209 ±0,011
	0,128	20,70	±3,73		0,118	31,07	±0,64	
	0,064	10,83	±1,24		0,059	11,50	±1,66	
	0,013	4,28	±7,89		0,012	-4,70	±3,92	

24	0,936	85,49	±3,19		0,949	100.339	±0,17	
	0,624	5,31	±2,29		0,632	100.112	±0,43	
	0,250	47,23	±4,26	0,620 ±0,226	0,253	45.6199	±1,52	0,273 ±0,006
	0,125	45,85	±5,01		0,126	13,94	±3,05	
	0,062	20,68	±2,84		0,063	-5,39	±1,31	
	0,012	19,14	±9,20		0,013	-15,46	±5,54	
48	0.790	86,68	±1,73		0,528	95,68	±0,15	
	0.526	85,47	±1,52		0,352	70,28	±0,36	
	0.211	24,18	±9,74	0,390 ±0,093	0,141	24,96	±1,93	0,613 ±0,244
	0.105	28,24	±2,32		0,070	12,35	±1,54	
	0.053	21,01	±1,67		0,035	4,80	±0,35	
	0.010	-47,62	±2,40		0,007	-3,09	±2,18	
72	1.117	84,23	±1,38	0.590 ±0,110	0,959	99,08	±1,30	0,234 ±0,016

		0.744	69,53	±1,47		0,640	100	±0,10	
		0.298	34,60	±3,50		0,256	59,95	±2,47	
		0.149	19,64	±5,91		0,128	32,81	±0,60	
		0.074	3,83	±2,05		0,064	18,12	±2,48	
		0.015	-3,14	±1,08		0,013	2,69	±1,59	
	0	0,982	86,20	±2,13		0,640	100	±0	
		0,654	86,95	±1,72		0,426	99,29	±0,30	
		0,262	88,23	±0,33	0,120 ±0,020	0,171	100	±0,61	
M100FM		0,131	51,25	±7,88		0,085	69,00	±1,06	0,063 ±0,002
		0,065	26,73	±5,52		0,043	36,39	±3,40	
		0,013	9,83	±1,21		0,008	9,46	±1,68	
	4	1,078	76,39	±1.72	0,143 ±0,001	1,024	100	±0,76	0,065 ±0,003
		0,718	78,77	±0,17		0,68	100	±0,18	

	0,287	81,92	±0,39		0,27	98,90	±0,92	
	0,144	48,12	±2,58		0,14	97	±3,99	
	0,072	19,92	±1,28		0,07	59,35	±5,30	
	0,014	13,50	±2,59		0,01	12,65	±3,70	
8	1,061	73,58	±0.70		1,06	99,96	±0,83	
	0,708	73,14	±6,47		0,71	99,90	±0,72	
	0,283	78,79	±1,38	0,124 ±0,008	0,28	99,93	±0,27	0,068 ±0,002
	0,142	56,62	±0,79		0,14	98,47	±2,20	
	0,071	1,69	±2,08		0,07	64,26	±0,38	
	0,014	-32,93	±2,08		0,01	16,84	±4,37	
12	1,058	79,92	±2,11		1,118	99,02	±0,84	
	0,705	78,86	±0,69	0,142 ±0,001	0,745	100	±0,18	0,072 ±0,001
	0,282	82,58	±0,33		0,298	99,59	±0,51	

	0,141	39,65	±2,00		0,149	99,47	±0,19	
	0,070	5,83	±1,21		0,074	63,98	±1,38	
	0,014	-39,36	±9,21		0,015	13,48	±3,50	
24	1,094	77,45	±1,98		1.056	100,04	±0,55	
	0,730	79,78	±1,48		0.704	100,06	±0,10	
	0,292	84,98	±0,92	0,132 ±0,025	0.2816	99,41	±1,22	0,069 ±0,002
	0,146	43,71	±4,34		0.1408	100,88	±2,64	
	0,073	13,52	±13,58		0.0704	59,94	±4,77	
	0,014	-41,44	±5,56		0.01408	14,01	±4,90	
48	1,151	86,68	±1,68		1,170	101,41	±1,47	
	0,768	85,70	±2,02	0,082 ±0,008	0,780	100,68	±0,92	0,070 ±0,002
	0,307	90,14	±1,68		0,312	99,88	±0,41	
	0,154	82,44	±5,36		0,156	98,94	±0,61	

	0,077	37,07	±9,80		0,078	73,96	±1,80	
	0,015	-1,75	±3,28		0,016	29,32	±4,13	
72	1,117	90,44	±6,06		1,024	100,91	±1,46	
	0,744	88,49	±1,66		0,683	99,16	±0,54	
	0,298	93,79	±7,09	0,074 ±0,006	0,273	99,66	±0,63	0,066 ±0,001
	0,149	84,70	±3,66		0,137	99,09	±1,43	
	0,074	48,00	±5,45		0,068	62,73	±0,72	
	0,015	7,79	±3,21		0,014	14,69	±4,61	