



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ESTUDOS SISTEMÁTICOS DE OBTENÇÃO E IMPREGNAÇÃO SUPERCRÍTICA DE EXTRATOS DE *BACCHARIS*

ALINE MACHADO LUCAS

ENGENHEIRA QUÍMICA

MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO CASSEL

Tese realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Trabalho vinculado ao Projeto: PROSCN - PROSUP / Cursos Novos - CAPES

**Porto Alegre
Março, 2015.**

SUMÁRIO

SUMÁRIO	2
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos Específicos	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1. Gênero <i>Baccharis</i>	18
3.2. Compostos não voláteis	19
3.1. Obtenção de extratos não voláteis	19
3.1.1. Extração por fluido supercrítico	20
3.2. Atividades biológicas e análises de extratos não voláteis.....	22
3.3. Composição de extratos não voláteis e atividades farmacológicas e biológicas de espécies do gênero <i>Baccharis</i>	22
3.4. Impregnação supercrítica (IS).....	23
3.4.1. Funcionamento	24
3.5. Análises de controle	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Coleta do material vegetal	27
4.2. Extração por fluido supercrítico	27
4.3. Separação dos compostos por cromatografia em coluna	30
4.4. Análise dos compostos	34
4.4.1. Cromatografia em Camada Delgada	34
4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE.....	35
4.5. Análise de atividade antioxidante.....	36
4.6. Determinação de compostos fenólicos totais	37

4.7. Determinação de flavonoides totais	38
4.8. Atividade antimicrobiana – Bioautografia e Concentração Inibitória Mínima 39	
4.9. Impregnação supercrítica (IS)	40
4.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
4.11. Quantificação do material impregnado	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	44
5.1. Resultados da primeira etapa: estudo inicial de 06 espécies do gênero <i>Baccharis</i>	44
5.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	45
5.1.2. Cromatografia em coluna.....	46
5.1.3. Análises CLAE.....	46
5.1.4. Análise antioxidante	49
5.1.5. Análise de compostos fenólicos totais.....	50
5.1.6. Atividade antimicrobiana	51
5.2. Resultados da segunda parte: seleção da <i>B. vulneraria</i> e inclusão da <i>B.</i> <i>uncinella</i> para a continuação dos estudos	51
5.2.1. Rendimento	52
5.2.2. Cromatografia em Camada Delgada	53
5.2.3. Análise Atividade Antioxidante.....	55
5.2.4. Análise de compostos fenólicos totais.....	56
5.2.5. Determinação de flavonoides totais.....	57
5.2.6. Atividade Antimicrobiana	58
5.3. Resultados da terceira parte: Definição da espécie <i>B. uncinella</i> para dar continuidade aos ensaios de impregnação supercrítica.....	59
5.3.1. Fracionamento	61
5.3.2. Atividade antioxidante das frações.....	63
5.3.3. Impregnação supercrítica – análises de quantificação de material impregnado.....	63
5.3.4. Análise de liberação do material impregnado - quantificação.....	68
5.3.5. Atividade antioxidante do fio impregnado.....	70
5.4 Considerações finais	72
6. CONCLUSÕES	76

7. PROPOSTA DE AÇÕES FUTURAS..... 79
8. REFERÊNCIAS 80

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me dado força e saúde para concluir todas as etapas da minha vida até agora. A minha família pela dedicação e apoio durante toda a minha formação. Aos meus colegas de laboratório, em especial a bolsista Maria Eduarda Sanvido por ter me acompanhado durante boa parte destes quatro anos de realização do doutorado e a todos aqueles colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço também ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Cassel que me acompanha desde a graduação e sempre me deu muito apoio para a realização de minhas atividades. Aos professores que de alguma forma contribuíram com conhecimento para a realização deste trabalho, em especial a professora Berenice Dedavid por ter dado todo o apoio necessário na parte de microscopia. Às pesquisadoras Carmen Elisa Hernandez e Azucena González do *Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) - Espanha*, pelo apoio durante minha estadia naquele país para a realização de algumas atividades experimentais. O conhecimento obtido durante este período foi de fundamental importância para a finalização deste trabalho.

Por fim, gostaria de agradecer a *CAPES* pelo projeto e por ter me dado subsídio financeiro para a execução deste trabalho durante os quatro anos de duração do doutorado.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Imagens representativas de duas espécies do gênero *Baccharis*: A) *B. articulata*; B) *B. uncinella*.(Lorenzi, 2008) 18
- Figura 3.2. Representação do diagrama de fases com a região de fluido supercrítico (Cassel et al., 2008).21
- Figura 3.3. Representação esquemática do processo de extração por fluido supercrítico (adaptado de Cassel et al., 2008). 1- Vaso extrator, 2- Bomba de alta pressão, 3- Trocador de calor, 4- Válvula de expansão, 5- Trocador de calor, 6- Separador, 7- Extrato livre de solvente.22
- Figura 3.4. Esquema de montagem básico do equipamento de IS. PT - transdutor de pressão, TC - controlador de temperatura, MS - placa de agitação magnética, VV - válvula de despressurização (Varona et al., 2011).....25
- Figure 4.1. Unidade piloto de extração por fluido supercrítico (Bedinot et al, 2011). 29
- Figura 4.2. Diagrama esquemáticos dos equipamentos do processo de extração com fluido supercrítico: C – cilindro de CO₂, HE – Trocador de calor, CV – Válvula de retenção, P1 – Bomba de alta pressão de CO₂, P2 – Bomba de cossolvente, R – Reservatório de co-solvente, EV1 – Vaso de extração, TT – Controladores de temperatura, PT – Controlador de pressão, VS – Vaso de separação, MFT – Medidor de vazão, MV- Válvula micrométrica, SV – Válvula de bloqueio (Brun, 2012)29
- Figura 4.3. Esquema de funcionamento do fracionamento de amostras em cromatografia em coluna. A amostra é inserida na coluna recheada normalmente com sílica gel. Solventes puros ou misturas vão sendo adicionados a fim de separar os diversos compostos da amostra de acordo com a polaridade destes (Skoog et al., 2008).31
- Figura 4.4. Esquema de desenvolvimento da CCD. A amostra é aplicada na base inferior da placa cromatográfica e inserida na cuba de vidro contendo a fase móvel. Durante o desenvolvimento, os compostos da amostra vão sendo separados. Quando a frente do solvente atingir o topo da placa, retira-se da cuba e deixa-se evaporar o solvente.34
- Figura 4.5. Curva padrão de DPPH 37
- Figura 4.6. Curva padrão de ácido gálico..... 38
- Figura 4.7. Curva padrão de quercetina.....39

- Figura 4.8. - 1: cilindro de CO₂; 2: bomba termostática; 3: Célula de impregnação; 4: Agitador magnético; 5: Vaso de expansão; TT: Transmissor de temperatura; CT: Controlador de temperatura; IP: indicador de pressão. 41
- Figura 4.9. Equipamento de Impregnação Supercrítica 41
- Figura 4.10. Suporte em aço inox para extrato e fios de sutura para o experimento de impregnação supercrítica. 42
- Figura 4.11. Curva de calibração da Fração 06 utilizada nas impregnações para quantificação do material impregnado. 43
- Figura 5.1. Análise em CCD dos extratos de acordo com identificação da Tabela 4.1. Cada cor apresenta um composto ou um grupo de compostos com características cromatográficas similares..... 46
- Figura 5.2. Cromatograma do extrato 5 (*B. megapotamica* 150 - CO₂ + cossolvente) mostrando o pico majoritário com 22,24% em área no tempo 53,01 min. 48
- Figura 5.3. Cromatograma do extrato 8 (*B. vulneraria* 150 - CO₂) mostrando o pico majoritário com 17,30% em área no tempo 68,79 min..... 48
- Figura 5.4. Cromatograma do extrato 10 (*B. usteri* 150 - CO₂) mostrando os picos majoritários com 17,05% e 35,40% em área nos tempos 50,75 min e 68,86 min, respectivamente. 49
- Figura 5.5. CCD de *B. vulneraria* e *B. uncinella* reveladas com vanilina sulfúrica. Identificação: V1 - CO₂ 150 bar; V2 - CO₂ 200 bar; V3 - CO₂+Etanol 150 bar; V4 - CO₂+Etanol 200 bar; V5 - CO₂+H₂O 150 bar; V6 - CO₂+H₂O 200 bar. U1 - CO₂ 150 bar; U2 - CO₂ 200 bar; U3 - CO₂+Etanol 150 bar; U4 - CO₂+Etanol 200 bar; U5 - CO₂+H₂O 150 bar; U6 - CO₂+H₂O 200 bar. 54
- Figura 5.6. CCD de *B. vulneraria* e *B. uncinella* reveladas com DPPH. Identificação: V1 - CO₂ 150 bar; V2 - CO₂ 200 bar; V3 - CO₂+Etanol 150 bar; V4 - CO₂+Etanol 200 bar; V5 - CO₂+H₂O 150 bar; V6 - CO₂+H₂O 200 bar. U1 - CO₂ 150 bar; U2 - CO₂ 200 bar; U3 - CO₂+Etanol 150 bar; U4 - CO₂+Etanol 200 bar; U5 - CO₂+H₂O 150 bar; U6 - CO₂+H₂O 200 bar. . 54
- Figura 5.7. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (Março e Poppi, 2008) 57
- Figura 5.8. Fracionamento em coluna do extrato bruto de *B. uncinella*. 62
- Figura 5.9. CCD comparativa entre o extrato bruto de *B. uncinella* e as frações obtidas no fracionamento primário revelados com vanilina sulfúrica e

DPPH. As identificações F1 a F6 referem-se as seis frações obtidas no fracionamento primário, a identificação B refere-se ao extrato bruto.....62

Figura 5.10. Imagens do fio antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.64

Figura 5.11. Imagens do fio tratado com acetona, antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.....65

Figura 5.12. Imagens do fio tratado com CO₂, antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.....66

Figura 5.13. Imagens do fio sem pré-tratamento antes e após o processo de impregnação a 150 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.....67

LISTA DE TABELAS

- Tabela 4.1. Identificação numérica dos extratos obtidos e suas respectivas condições de extração. Todas as extrações foram realizadas a 60°C variando apenas a pressão.30
- Tabela 4.2. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna.33
- Tabela 4.3. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas no fracionamento por cromatografia em coluna nos experimentos realizados no IPNA na Espanha.33
- Tabela 5.1. Massa dos extratos obtidos por extração supercrítica de 06 espécies de *Baccharis* em diferentes condições de pressão na temperatura de 60°C. A identificação dos extratos é a mesma mostrada na Tabela 4.1. A massa de planta utilizada em todas as extrações foi de 100 g.45
- Tabela 5.2. Extratos fracionados por cromatografia em coluna e os respectivos números de frações obtidas em cada experimento.46
- Tabela 5.3. Tempos de retenção dos picos que apareceram em mais de um extrato e suas respectivas identificações. O “ * ” que aparece ao lado de algumas plantas, refere-se a um percentual em área menor que 0,5% dos picos do cromatograma.47
- Tabela 5.4. Picos majoritários obtidos nos extratos identificados e seu respectivo tempo de retenção e % em área. TR é o tempo, em minutos, em que o pico aparece no cromatograma. % Área é o percentual relativo de cada pico no cromatograma.47
- Tabela 5.5. Valores da atividade antioxidante dos extratos analisados, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH. EC₅₀ Indica a quantidade de extrato necessário para decair a absorbância pela metade de uma g de DPPH em solução.49
- Tabela 5.6. Identificação dos extratos avaliados o % de compostos fenólicos totais. Os resultados são dados em % em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas.50
- Tabela 5.8. Rendimento em massa dos extratos obtidos por extração supercrítica das espécies *B. vulneraria* e *B. uncinella*.52
- Tabela 5.9. Valores da atividade antioxidante dos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH. EC₅₀

- Indica a quantidade de extrato necessário para decair a absorvância pela metade de uma g de DPPH em solução.55
- Tabela 5.10. Avaliação do % de compostos fenólicos totais nos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*. Os resultados são dados em % em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas.....56
- Tabela 5.11. Avaliação do % de flavonoides nos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*. Os resultados são dados em % em massa de flavonoides presentes nas amostras analisadas, tendo com referência a concentração de quercetina dihidratada.58
- Tabela 5.12. Concentração inibitória mínima de *B.uncinella* e *B. vulneraria* nas diferentes condições de extração. Microrganismos testados: EC – *Escherichia coli*; EF – *Enterococcus fecallis*; AS – *Staphylococcus aureus*.59
- Tabela 5.13. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH para o extrato bruto e suas respectivas frações.....63
- Tabela 5.14. Quantificação do material impregnado da Fração 06 para as condições de impregnação a 150 e 200 bar a 40 °C. Os resultados são apresentados em massa de material impregnado em fragmentos de 03 cm de fio em imersão por 05 min, 07 e 15 dias em PBS, juntamente com os respectivos desvios padrão.69
- Tabela 5.15. Quantificação do material impregnado da Fração 06 para as condições de impregnação a 200 bar a 40 °C para o fio pré-tratado com acetona. Os resultados são apresentados em massa de material impregnado em fragmentos de 3 cm de fio em imersão por 05 min em PBS, juntamente com o respectivo desvio padrão.....70
- Tabela 5.16. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SR) para os fragmentos de fio de sutura impregnados a 150 e 200 bar a 40 °C com leituras realizadas em diferentes tempos de imersão do fio na solução de DPPH. Os desvios padrão também são apresentados. O “-” indicado no desvio padrão de algumas análises significa que a leitura não teve desvio por tratar-se de uma medida única. As demais análises foram realizadas em triplicata.71
- Tabela 5.17. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SR) para os fragmentos de fio de sutura pré-tratados com acetona e impregnados a 200 bar e 40 °C com leituras realizadas em diferentes tempos de imersão do fio na solução de DPPH. O desvio padrão também é apresentado. As análises foram realizadas em triplicata.72

LISTA DE SÍMBOLOS

bar	Unidade de pressão
°C	Unidade de temperatura – graus Celsius
K	Unidade de temperatura – Kelvin
cm	Unidade de comprimento – centímetros
nm	Unidade de comprimento - nanômetros
cm ³	Unidade de volume – centímetros cúbicos
mL	Unidade de volume – mililitros
µL	Unidade de volume – microlitros
g	Unidade de massa - gramas
mg	Unidade de massa - miligramas
CCD	Cromatografia em camada delgada
CL	Cromatografia em coluna
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
EM	Espectrômetro de massas
EC ₅₀	Concentração eficiente
IS	Impregnação supercrítica
FS	Fluido supercrítico

RESUMO

LUCAS, Aline Machado. **Estudo Sistemático de Obtenção e Impregnação Supercrítica de *Baccharis***. Porto Alegre. 2015. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O gênero *Baccharis* possui mais de 500 espécies descritas sendo que 90% destas ocorrem na América do Sul. Possui importante destaque na medicina popular sendo utilizadas para problemas digestivos. Estudos reportam a presença de compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos em seus extratos não voláteis. Extratos não voláteis normalmente são obtidos por infusão e/ou maceração de partes de planta em solvente. Uma forma de obtenção de extratos puros sem necessidade de evaporação do solvente é a extração por fluido supercrítico. O objetivo do presente estudo foi obter compostos não voláteis de sete espécies de *Baccharis*: *Baccharis microdonta*, *B. megapotamica*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*, *B. uncinella* por extração supercrítica em diferentes condições de operação, analisá-los por diferentes métodos cromatográficos e testar suas atividades biológicas tais como atividade antioxidante e antimicrobiana. Por apresentar um potencial antioxidante elevado e grande disponibilidade na natureza, a espécie *B. uncinella* foi selecionada para dar continuidade aos estudos e realizar a impregnação supercrítica do extrato selecionado em fios de sutura, uma matriz polimérica de PLGA. A atividade antioxidante foi a característica escolhida para agregar ao fio de sutura com o objetivo de potencializar a cicatrização do local onde for aplicado. Os resultados obtidos mostram que o material impregnado não foi visualizado através da análise de imagens, mas testes de quantificação e liberação, assim como de atividade antioxidante, comprovaram que ocorre a impregnação do extrato. A condição de impregnação a 150 bar apresentou resultados superiores em relação a impregnação a 200 bar, aproximadamente 50% mais massa impregnada e e uma atividade antioxidante 30% maior.

Palavras-Chaves: *Baccharis*, compostos fenólicos, extração supercrítica, impregnação supercrítica.

ABSTRACT

LUCAS, Aline Machado. **Systematic Study for the Supercritical Obtention and Impregnation of Baccharis**. Porto Alegre. 2015. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul.

The *Baccharis* genus has more than 500 species described and 90% occur in South America. It has highlighted important feature in the folk medicine being used for digestive problems. Studies report the presence of phenolic compounds and phenolic acids in its non-volatile extracts. Non-volatile extracts are obtained by infusion and/or maceration of parts of the plant in solvent. One way to obtain pure extracts without the need of evaporation of the solvent is the extraction by supercritical fluid. The aim of the present study was to obtain non-volatile compounds of seven *Baccharis* species: *Baccharis microdonta*, *B. megapotamica*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*, *B. uncinella* by supercritical extraction in different conditions of operation, analyze them in different chromatographic methods and test its biological activities such as antioxidant and antimicrobial. As it shows high antioxidant potencial and high availability in the nature, the *B. uncinella* species were selected to continue our studies in order to perform the supercritical impregnation of the extract in sutures, one polymer matrix of PLGA. The antioxidant activity was the chosen characteristic to aggregate in the suture with the objective to enhance the healing were it is used. The results obtained shows that the impregnated material was not visualized through image analysis, but quantification and liberation tests as well as antioxidant activity shows that the impregnation has occurred. The impregnation condition at 150 bar showed superior results in relation to the impregnation at 200 bar, about 50% more mass impregnated and a 30% higher antioxidant activity.

Key-words: *Baccharis*, phenolic extracts, supercritical extraction, supercritical impregnation.

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho teve por objetivo estudar compostos não voláteis de espécies do gênero *Baccharis* extraídos com dióxido de carbono (CO₂) supercrítico e avaliar quais espécies possuem potencial de utilização, baseado em análises de caracterização e em atividades biológicas. De posse dos resultados das análises e aplicações, realizou-se o estudo de impregnação em meio supercrítico dos extratos selecionados em matrizes poliméricas biocompatíveis.

A riqueza de recursos que a natureza pode oferecer é imensurável. Várias substâncias produzidas pelo metabolismo secundário dos organismos estão sendo utilizadas na indústria farmacêutica para produção de fitoterápicos e cosméticos. Tais substâncias são responsáveis por mecanismos de proteção e ambientação das espécies (Simões et al., 2007) e estão cada vez mais sendo estudadas a fim de propor uma utilização benéfica aos seres humanos de uma forma sustentável. As espécies vegetais nativas estão entre as mais estudadas, isso porque se trata de um recurso disponível e renovável, assim como é uma forma de valorizar o que a natureza de cada região pode oferecer.

Entre as plantas nativas, o gênero *Baccharis* possui mais de 500 espécies descritas, sendo que 90% destas ocorrem na América do Sul. Seu exemplar mais conhecido é a *Baccharis trimera* (carqueja), que é amplamente utilizada na medicina popular para problemas digestivos. Estudos relatam efeitos hepatoprotetor, antiglicemiante, antiviral e anti-inflamatório (Borella et al., 2006).

Grande parte dos estudos relata a obtenção de extratos de *Baccharis* com solventes orgânicos a baixas pressões (Baggio et al., 2003; Januário et al., 2005). Este método de extração leva a uma etapa posterior de remoção do solvente remanescente (Feresin et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Boller et al., 2010).

O uso da extração com fluido supercrítico, basicamente utilizando CO₂ como solvente, é justificado devido à capacidade obter o extrato livre de solvente residual, além da capacidade de ser um processo seletivo a compostos fenólicos, segundo é relatado em estudos prévios (Cassel et al., 2008; Piantino et al., 2008). Especificamente para o caso de extratos oriundos de matéria-prima vegetal, este processo se torna importante porque opera a baixas temperaturas, devido a baixa temperatura crítica do CO₂, evitando a degradação térmica dos compostos obtidos.

A caracterização química dos extratos vegetais obtidos se baseia em técnicas de separação como a cromatografia líquida, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada. Estas técnicas também podem ser utilizadas de forma preparativa, possibilitando o fracionamento do extrato e o isolamento de compostos de interesse. (Rodrigues et al., 2009; Borella et al., 2006). Métodos espectroscópicos também podem ser utilizados para a identificação de moléculas, como ressonância magnética nuclear, espectroscopia de infravermelho e espectroscopia de ultravioleta (Feresin et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Vidari et al., 2003; Borella et al., 2006; Boller et al., 2010).

Análises de atividade antioxidante, do teor de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana são muito utilizadas para caracterizar extratos vegetais (Borella et al., 2006; Oliveira et al., 2003; Feresin et al., 2003; Oliveira² et al., 2005; Grecco et al., 2010). Existem diferentes métodos de realização das análises citadas, entre eles o método de captura do radical livre DPPH para atividade antioxidante (Brand-Williams et al., 1995), método Follin-Ciocalteau (Follin e Ciocalteau, 1927) para análise de compostos fenólicos totais e método de difusão em ágar por bioautografia para testes antibacterianos e antifúngicos (Pereira, 2010).

A impregnação supercrítica consiste na incorporação de um produto de interesse em matrizes sólidas, utilizando um fluido supercrítico como solvente. É utilizada na deposição de fármacos em matrizes poliméricas pela indústria farmacêutica e também na impregnação de biocidas e conservantes em madeiras e alimentos (Lucas et al., 2007; Richter et al., 2012). É objeto de estudo pela indústria farmacêutica devido à capacidade de liberação controlada de fármacos, auxiliando

nos tratamentos e evitando a intoxicação dos pacientes causada por doses excessivas de medicamentos.

No presente estudo, 08 espécies de *Baccharis* foram inicialmente utilizadas com o intuito de eleger uma espécie para dar continuidade ao trabalho. O objetivo foi obter os extratos supercríticos, analisá-los por diferentes técnicas cromatográficas e avaliá-los frente a sua atividade antioxidante, quanto a concentração de compostos fenólicos totais e de flavonoides. Os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna, a fim de isolar um composto puro, e todas as análises foram repetidas para as frações obtidas. Após essa etapa, o extrato ou o composto isolado, foi impregnado em uma matriz polimérica biocompatível, inicialmente em fios de sutura, a fim de imprimir características benéficas para seu uso.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho foi extrair, fracionar, analisar e avaliar o potencial biológico de extratos não voláteis de espécies do gênero *Baccharis*. De posse destes resultados, impregnar os compostos selecionados em polímeros biocompatíveis, utilizando a técnica de impregnação supercrítica.

2.1. Objetivos Específicos

- Obtenção de compostos não voláteis por extração com CO₂ supercrítico de 07 espécies do gênero *Baccharis*: *Baccharis microdonta*, *B. megapotamica*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*, e *B. uncinella*.

- Fracionamento dos extratos por cromatografia em coluna utilizando solventes de diferentes polaridades a fim de identificar compostos com potencial aplicação.

- Caracterização dos extratos por cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

- Avaliação das atividades biológicas dos extratos e de suas frações através de métodos espectrofotométricos para análise de atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais e análise antimicrobiana utilizando o método de difusão em ágar por bioautografia indireta e concentração inibitória mínima.

- Seleção do(s) extrato(s) e/ou suas frações que apresentam potencial de aplicação em função dos compostos majoritários e de suas atividades biológicas.

- Impregnação supercrítica em matrizes poliméricas dos extratos e/ou frações em polímeros biocompatíveis em meio supercrítico.

- Avaliação da liberação controlada do extrato impregnado em matriz polimérica biocompatível.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* inclui mais de 500 espécies distribuídas dos Estados Unidos da América à Argentina, sendo que 90% ocorrem na América do Sul. No Brasil existem aproximadamente 120 espécies descritas (Verdi et al., 2005). Apresentam-se como arbustos perenes de 0,5 a 4,0 m de altura. Sua importância econômica está principalmente no combate à erosão do solo e na medicina popular (Budel et al., 2005; Verdi et al., 2005). A Figura 3.1 mostra dois exemplares de espécies de *Baccharis*.



Figura 3.1. Imagens representativas de duas espécies do gênero *Baccharis*: A) *B. articulata*; B) *B. uncinella*.(Lorenzi, 2008)

As espécies de *Baccharis* possuem importante destaque na medicina popular, sendo utilizadas principalmente para problemas digestivos. Estudos prévios reportam a presença de compostos fenólicos como flavonoides e ácidos fenólicos,

diterpenos e saponinas em seus extratos não voláteis. Suas propriedades biológicas e farmacológicas descritas são anti-inflamatória, analgésica, antioxidante e antibacteriana (Feresin et al., 2003; Oliveira et al., 2006).

3.2. Compostos não voláteis

Os organismos vegetais, de forma geral, produzem uma série de substâncias para gerar energia para sua sobrevivência e também para se proteger no meio onde vivem. As substâncias que são essenciais para a sobrevivência do organismo fazem parte de um conjunto de reações metabólicas que constituem o metabolismo primário. Já aquelas substâncias que não são essenciais para garantir a sobrevivência, mas que garantem proteção à sua existência no ecossistema, fazem parte do metabolismo secundário (Bruneton, 2001; Simões et al., 2007,).

O metabolismo secundário produz substâncias que conferem características de proteção e adaptação ao meio onde as plantas estão inseridas. Entre as características, podem-se citar a defesa contra herbívoros, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores e os efeitos alelopáticos, entre outras (Simões et al., 2007).

Os compostos não voláteis extraídos de plantas fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais. São designados não voláteis devido a seu maior peso molecular. Grande parte dos constituintes dos extratos não voláteis são os compostos fenólicos, que incluem uma grande diversidade de estruturas, possuem pelo menos um anel aromático e um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. Dentre eles, citam-se os alcaloides, taninos, flavonoides, ligninas, cumarinas entre outros (Simões et al., 2007).

3.1. Obtenção de extratos não voláteis

Os extratos não voláteis, independentemente da matéria-prima vegetal, normalmente são obtidos por infusão e/ou maceração a baixas pressões de partes da planta em solvente, de acordo com a polaridade deste e dos compostos que se deseja obter (Januário et al., 2005; Boller et al., 2010; Grecco et al., 2010). Alguns

extratos podem ser fracionados por cromatografia em coluna com o objetivo de isolar um composto de interesse presente no extrato bruto (Vidari et al., 2003). Outra forma de se obter os extratos é através da extração com fluido supercrítico. Desta maneira se obtém o extrato sem resíduo de solvente, evitando assim a necessidade da etapa de remoção do solvente. Estudos mostram que este processo é mais seletivo para a extração de compostos fenólicos quando comparado a extratos alcoólicos (Piantino et al., 2008).

3.1.1. Extração por fluido supercrítico

A extração supercrítica pode ser definida como a solubilização de compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente nas condições supercríticas. É um processo que vem sendo utilizado na obtenção de extratos vegetais. Entre outros pontos positivos da extração supercrítica, o solvente mais comumente utilizado, dióxido de carbono, apresenta uma série de vantagens quando comparado aos solventes orgânicos utilizados nas extrações tradicionais como ser atóxico, não inflamável e estar no estado gasoso na pressão e temperatura ambiente (Reverchon e De Marco, 2006; Cassel et al., 2008; Municio et al., 2011;).

Um fluido supercrítico (FS) pode ser qualquer substância que se encontrar acima do seu ponto crítico, isto é, acima de sua pressão e temperatura crítica. Esta condição é representado no diagrama de fases na Figura 3.2. Nessas condições, o fluido possui viscosidade análoga a de um gás e uma capacidade de dissolução elevada como a de um líquido. Existem vários solventes que podem ser utilizados em processos de extração supercrítica, sendo o mais usual o CO₂, devido a suas propriedades como baixa temperatura e pressão crítica, 304 K (31°C) e 72 bar, respectivamente, além das propriedades supracitadas.

Devido à dificuldade do CO₂ em dissolver moléculas polares a altas pressões, costuma-se adicionar solventes tais como água, etanol, metanol, entre outros, com o objetivo de aumentar a polaridade e, conseqüentemente, o poder de solvência e seletividade do processo. Estes solventes auxiliares são chamados de cossolventes (Cassel et al., 2008).

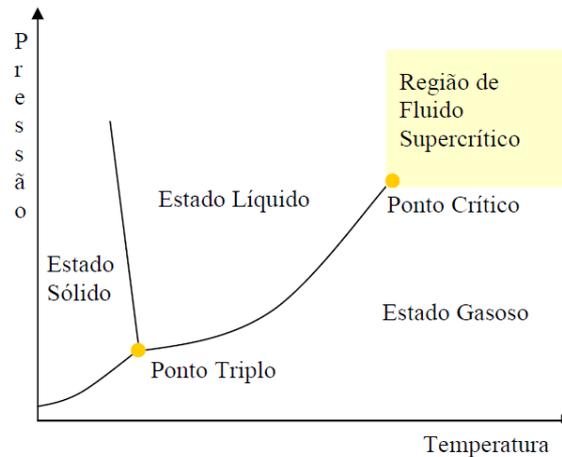


Figura 3.2. Representação do diagrama de fases com a região de fluido supercrítico (Cassel et al., 2008).

O funcionamento básico do processo de extração por fluido supercrítico se inicia com o solvente sendo comprimido e liquefeito em uma bomba de alta pressão e em seguida é aquecido por um pré-aquecedor até as condições supercríticas. O fluido nestas condições é introduzido no vaso de extração. Quando se trabalha com cossolvente, este é alimentado de um reservatório e passa por um vaso de mistura antes do pré-aquecedor, ocorrendo a homogeneização entre solvente e cossolvente. Depois de efetuada a extração, o solvente e o cossolvente, se aplicado, juntamente com o extrato obtido, passam por uma válvula de expansão onde ocorre uma rápida expansão. Neste momento o solvente retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação (Cassel et al., 2008). A Figura 3.3 mostra uma representação esquemática do processo de extração por fluido supercrítico.

Durante a extração o solvente no estado supercrítico percola o leito de plantas no vaso de extração e dissolve os compostos presentes nesta matéria-prima. As plantas absorvem o solvente e os compostos extraídos dissolvem-se neste. Os compostos dissolvidos seguem para a etapa de expansão, onde se precipitarão quando o solvente passar do estado supercrítico para o estado gasoso (Lucas, 2011).

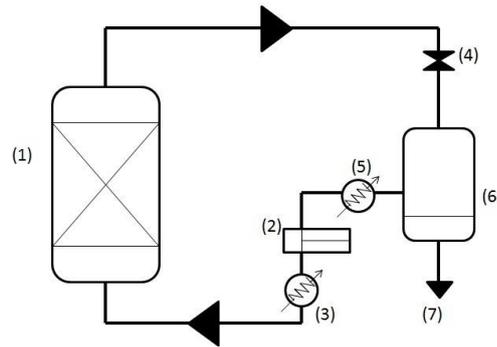


Figura 3.3. Representação esquemática do processo de extração por fluido supercrítico (adaptado de Cassel et al., 2008). 1- Vaso extrator, 2- Bomba de alta pressão, 3- Trocador de calor, 4- Válvula de expansão, 5- Trocador de calor, 6- Separador, 7- Extrato livre de solvente.

3.2. Atividades biológicas e análises de extratos não voláteis

Muitas atividades biológicas são atribuídas aos compostos não voláteis de organismos vegetais. Atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral e antimicrobiana estão entre as mais conhecidas (Baggio et al., 2003; Noldin et al., 2003; Oliveira et al., 2003; Oliveira¹ et al., 2005; Oliveira² et al., 2005; Montanha et al., 2004; Boller et al., 2010; Florão et al., 2012).

A análise e identificação dos extratos não voláteis são normalmente realizadas através de métodos cromatográficos e métodos espectroscópicos. A cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são as mais utilizadas (Oliveira et al., 2003; Oliveira² et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Piantino et al., 2008). Os extratos podem ser analisados por cromatografia gasosa (CG) após passarem por derivatização (Simões et al., 2007). Técnicas espectroscópicas, tais como infravermelho (IV), ultravioleta (UV) e ressonância magnética nuclear (RMN), são muito utilizadas para a elucidação da estrutura da molécula (Januário et al., 2005; Boller et al., 2010; Grecco et al., 2010).

3.3. Composição de extratos não voláteis e atividades farmacológicas e biológicas de espécies do gênero *Baccharis*

Muitos estudos demonstram a presença de compostos fenólicos com ação antioxidante nos extratos não voláteis de *Baccharis* (Oliveira et al., 2006; ; Piantino

et al., 2008; Grecco et al., 2010). Estudos fitoquímicos de espécies deste gênero relatam uma predominância de compostos polares, principalmente flavonoides e terpenóides (Oliveira² et al., 2005; Rodrigues et al., 2009).

Na medicina popular as *Baccharis* são muito utilizadas em forma de chá para problemas gastrointestinais. Tais doenças são muitas vezes atribuídas ao processo oxidativo dos tecidos do estômago e demais órgãos do aparelho digestivo (Baggio et al., 2003; Oliveira et al., 2003). A comprovação da atividade antioxidante de extratos de *Baccharis* (Piantino et al., 2008) pode ser uma explicação empírica para o seu uso em doenças gastrointestinais, mesmo sem provas científicas.

Os principais compostos encontrados em extratos não voláteis de espécies de *Baccharis* são: Ball (4-O-B-D-glucopiranosil-3,5-dimetoxibenzil-cafeato) na *B. articulata* (Oliveira et al., 2003), ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico (Artepillin C), ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (PHCA), ácido dihidro cafeico (DHCA), ácido hidroxicinâmico (exemplo, ácido p-cumárico) e kaempferide na *B. dracunculifolia* (Piantino et al., 2008) e ácido oleanólico, ácido ursólico, pectolinarigenina, hispidulina, ácido caféico e ácido ferrúlico na *B. uncinella* (Grecco et al., 2010).

Diversas atividades farmacológicas e biológicas foram testadas para o gênero *Baccharis*. *Baccharis usterii* e *B. spicata* apresentaram ação antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* (Oliveira¹ et al., 2005).

3.4. Impregnação supercrítica (IS)

A impregnação supercrítica consiste na deposição de um produto de interesse em matrizes sólidas, utilizando um fluido supercrítico como meio de solubilizar o extrato a ser incorporado. É uma técnica muito utilizada na deposição de drogas em matrizes poliméricas na indústria farmacêutica e também na impregnação de biocidas e conservantes em madeiras e na indústria alimentícia (Lucas et al., 2007; Richter et al., 2012).

Algumas vantagens deste método são a ausência de resíduo de solvente no produto final, a não geração de grande quantidade de resíduos e a versatilidade de produtos a serem impregnados em matrizes porosas, quando se utiliza uma mistura como solvente através da adição de cossolventes (Cortesi et al., 2000; Braga et al., 2008; Costa¹ et al., 2010; Municio et al., 2011; Varona et al., 2011).

Vários materiais podem ser utilizados como matrizes porosas, derivados da quitosana, carvão ativado, matrizes de sílica, madeira, lentes de contato, polímeros, fibras de algodão entre outras (Soppimath et al., 2001; Varona et al., 2011).

Sem dúvida a utilização da impregnação supercrítica mais difundida é a impregnação de *drogas* oftalmológicas em lentes de contato (Duarte et al., 2007; Braga et al., 2008; Costa¹ et al., 2010; Costa² et al., 2010). Este fato se deve a limitações na aplicação e distribuição fisiológica de medicamentos oftalmológicos (Duarte et al., 2007). Outros empregos da técnica já estão sendo estudados, como a impregnação de fungicidas em madeiras utilizadas para poste (Lucas et al., 2007), na aplicação de conservantes em oleaginosas e frutas (Richter et al., 2012), na formulação de medicamentos (Municio et al., 2011), entre outros.

3.4.1. Funcionamento

O esquema da montagem básica do equipamento de impregnação supercrítica é mostrado na Figura 3.4.

O funcionamento da impregnação supercrítica consiste na introdução do solvente (FS) na célula de impregnação, previamente carregada com a matriz, o material a ser impregnado e o cossolvente, caso seja usado, nas condições de pressão e temperatura estabelecidas. A placa de agitação está em constante funcionamento a fim de solubilizar e homogeneizar o material de interesse e o solvente comprimido. A quantidade de material a ser impregnado é determinada levando em consideração a solubilidade nas condições operacionais. O sistema é mantido nestas condições de operação durante um tempo pré-estabelecido. Após esse período, o solvente comprimido, ou a mistura do solvente com o cossolvente, é removido pela despressurização do sistema (Braga et al., 2008).

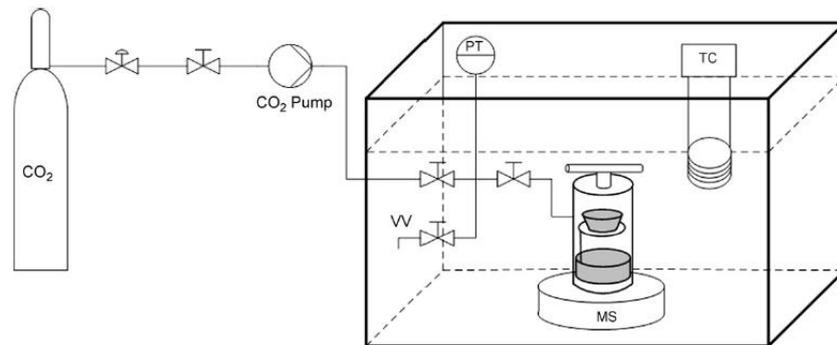


Figura 3.4. Esquema de montagem básica do equipamento de IS. PT - transdutor de pressão, TC - controlador de temperatura, MS - placa de agitação magnética, VV - válvula de despressurização (Varona et al., 2011).

Alguns autores descrevem que a impregnação ocorre por meio de dois mecanismos. O primeiro seria uma simples deposição do material quando o FS deixa a matriz. O soluto é solubilizado no FS e a matriz é exposta a solução por um período determinado seguido pela despressurização controlada do sistema. O segundo mecanismo não seria diretamente ligado às características do FS e sim devido interações químicas fracas entre o soluto e a matriz (Municio et al., 2011).

O soluto a ser impregnado e a interação entre a matriz e o solvente são dois importantes parâmetros para o processo, visto que a impregnação se dá como consequência do balanço de interações entre o material a ser impregnado, a matriz e o FS, resultando na adsorção ou uma deposição química do soluto na matriz porosa (Varona et al., 2011).

A solubilidade do material a ser impregnado no FS é um parâmetro de fundamental importância, sendo que cossolventes podem ser utilizados a fim de otimizar o processo (Cortesi et al., 2000). Outro parâmetro importante é a velocidade de despressurização. Uma despressurização rápida pode causar a quebra das matrizes, já uma despressurização muito lenta pode causar uma impregnação preferencial de determinados compostos em relação a outros (Varona et al., 2011; Richter et al., 2012).

3.5. Análises de controle

A avaliação do material impregnado pode ser realizada por diversas técnicas analíticas. Entre elas estão cromatografia gasosa (Varona et al., 2011), HPLC (Duarte et al., 2007), espectrofotometria (Lima et al., 2010), diferença de massas (Braga et al., 2008), entre outras. A escolha do método analítico é função do soluto impregnado.

As análises também têm por objetivo avaliar a liberação controlada do material impregnado. As amostras, antes de serem analisadas pelas técnicas expostas acima, passam por um período de exposição a um meio específico para que se determine a quantidade de produto que foi liberada para tal meio durante aquele período. Estes resultados servem para que os parâmetros de processo possam ser otimizados (Duarte et al., 2007; Braga et al., 2008; Lima et al., 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentos foi proveniente do Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPCN Pró-Mata) da PUCRS, localizado em São Francisco de Paula, RS. Foram selecionadas inicialmente 06 espécies do gênero *Baccharis*: *Baccharis microdonta*, *B. megapotamica*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*. Após os resultados obtidos foi selecionada uma espécie para dar continuidade aos estudos, a *B. vulneraria*, e uma outra espécie, a *B. uncinella*, foi adicionada devido a maior abundância na natureza. Para os experimentos de extração são utilizadas as partes aéreas das plantas. Após a coleta o material seguiu para o Laboratório de Operações Unitárias da PUCRS (LOPE), onde todos os experimentos foram realizados.

Após a chegada do material, este é seco em estufa (Tecnal) e moído em moinho de facas (Skymesen) para a posterior realização da extração por fluido supercrítico dos compostos não voláteis presentes no material vegetal.

4.2. Extração por fluido supercrítico

O procedimento de extração dos compostos não voláteis por fluido supercrítico, ou extração supercrítica, é realizado utilizando CO₂ como solvente em duas diferentes condições de pressão e uma de temperatura. A definição das condições de pressão e temperatura utilizadas é baseada em trabalhos anteriores realizados no LOPE (Cassel et al., 2010; Barros et al., 2011; Barroso et al., 2011).

As extrações foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica do LOPE e está representada na Figura 4.1 (Cassel et al, 2007, Bedinot et al, 2011). O fluxograma dos equipamentos é mostrado na Figura 4.2. O material vegetal é previamente seco e moído. São adicionados 100 g de cada planta no vaso de extração. A primeira condição de pressão e temperatura é de 150 bar e 60°C, respectivamente, e a segunda a 200 bar e 60°C. Algumas extrações foram conduzidas utilizando etanol 96% (Merck) como cossolvente a fim de aumentar a extração de compostos mais polares, como os polifenóis. O CO₂ possui capacidade limitada em dissolver compostos polares a altas pressões e o uso do cossolvente é justificado pelo aumento do poder de solvência e solubilidade do processo de extração supercrítica (Cassel et al., 2008; Piantino et al., 2008; Braida et al., 2008; Domingues et al., 2012; Almeida et al., 2013).

Nem todas as espécies puderam ser extraídas nas condições com e sem cossolvente. Este fato ocorreu devido a pouca massa de planta disponível. Tais espécies (*B. microdonta*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*) não são abundantes no local de coleta e mesmo que fosse realizado uma coleta posterior, os valores não poderiam ser comparados com os iniciais devido as alterações que as condições do tempo e estações do ano causam no metabolismo vegetal (Sartor et al., 2013).

O processo de extração se inicia com CO₂ (99,9% de pureza – AirProducts) líquido sendo pressurizado até condições de pressão acima do ponto crítico em uma bomba de alta pressão (Maximator® – G35). Um trocador de calor instalado entre a bomba e o cilindro alimentador do solvente garante que este permaneça na fase líquida até chegar à bomba. A vazão de solvente é de 700 g/h e é mensurada por um medidor de vazão (Siemens® Sitrans FC mass flow 6000). Após a pressurização, o CO₂ passa por um pré-aquecedor, onde atinge a condição supercrítica de temperatura. O fluido, já no estado supercrítico, chega ao vaso de extração, onde percola o leito de plantas levando consigo os compostos extraídos. O vaso de extração possui uma jaqueta de aquecimento para garantir a temperatura constante durante a extração. Saindo do vaso de extração, o solvente supercrítico mais os compostos extraídos passam por uma válvula de expansão (Hoke–Micromite® 1600), onde o CO₂ é liberado no estado gasoso e o extrato é recolhido

em um frasco coletor. A válvula de expansão conta com um sistema de aquecimento e controle de temperatura para que não ocorra o congelamento do CO₂ devido ao efeito Joule-Thomson. Nas extrações com cossolvente, é utilizado etanol 96% (Merck) em uma proporção de 10% em massa em relação à vazão do CO₂. O cossolvente é alimentado no sistema por uma bomba de alta pressão (ISCO 260-D) em um vaso de mistura antes do pré-aquecedor, onde ocorre a homogeneização com o CO₂.



Figure 4.1. Unidade piloto de extração por fluido supercrítico (Bedinot et al, 2011).

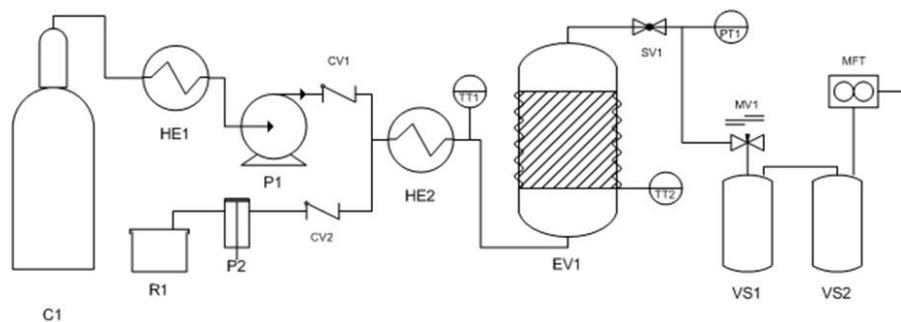


Figura 4.2. Diagrama esquemáticos dos equipamentos do processo de extração com fluido supercrítico: C – cilindro de CO₂, HE – Trocador de calor, CV – Válvula de retenção, P1 – Bomba de alta pressão de CO₂, P2 – Bomba de cossolvente, R – Reservatório de co-solvente, EV1 – Vaso de extração, TT – Controladores de temperatura, PT – Controlador de pressão, VS – Vaso de separação, MFT – Medidor de vazão, MV- Válvula micrométrica, SV – Válvula de bloqueio (Brun, 2012)

Na Tabela 4.1 são mostrados os experimentos de extração realizados, onde se enumera os mesmos de 01 a 15 como forma de facilitar o tratamento dos dados.

Tabela 4.1. Identificação numérica dos extratos obtidos e suas respectivas condições de extração. Todas as extrações foram realizadas a 60°C variando apenas a pressão.

Número de identificação	Espécie de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente
1	<i>B. microdonta</i>	150	CO ₂
2	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂
3	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol
4	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂
5	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol
6	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂
7	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol
8	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂
9	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂
10	<i>B. usteri</i>	150	CO ₂
11	<i>B. usteri</i>	200	CO ₂
12	<i>B. trimera</i>	150	CO ₂
13	<i>B. trimera</i>	200	CO ₂
14	<i>B. tridentata</i>	150	CO ₂
15	<i>B. tridentata</i>	200	CO ₂

4.3. Separação dos compostos por cromatografia em coluna

A separação por cromatografia em coluna é considerada um método e preparativo que tem por objetivo isolar compostos majoritários e/ou diminuir a quantidade de compostos para posteriores análises, separando o extrato em diversas frações. O princípio de separação da técnica está fundamentado no fenômeno da adsorção, que pode ser definido como um processo no qual uma substância (gás, líquido ou sólido) fica retida na superfície de um sólido (Collins et al., 2007; Skoog et al., 2008).

A cromatografia em coluna é composta por uma coluna de vidro com a extremidade superior aberta e uma torneira na extremidade inferior para controle de vazão das frações a serem recolhidas. Esta coluna é recheada com um adsorvente (fase estacionária), sendo a sílica gel o mais utilizado. A amostra é colocada na extremidade superior da coluna com a ajuda do solvente (fase móvel) que será um dos responsáveis pela separação dos compostos, conforme mostrado na Figura 4.3.

A eluição do interior da coluna ocorrerá em ordem de polaridade das substâncias. Utilizando adsorventes polares, como a sílica gel, compostos polares terão mais afinidade e ficarão retidos por mais tempo na coluna. Sendo assim, a polaridade da fase móvel na separação se torna fundamental na eluição das moléculas. O objetivo é remover ou dessorver seletivamente os componentes da mistura retidos do adsorvente (Skoog et al., 2008).

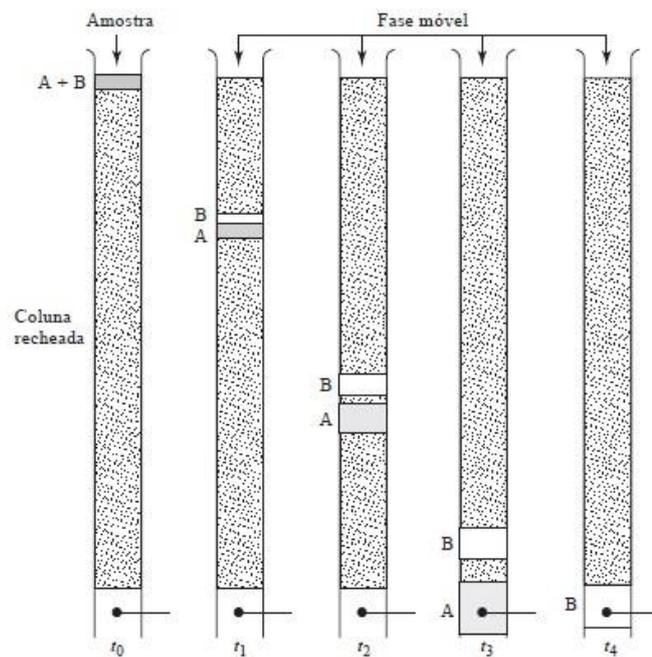


Figura 4.3. Esquema de funcionamento do fracionamento de amostras em cromatografia em coluna. A amostra é inserida na coluna recheada normalmente com sílica gel. Solventes puros ou misturas vão sendo adicionados a fim de separar os diversos compostos da amostra de acordo com a polaridade destes (Skoog et al., 2008).

A escolha da fase móvel deve ser feita de acordo com a série eluotrópica referente ao adsorvente que está sendo utilizado, seguindo a ordem crescente de polaridade. Quando um solvente puro não consegue separar determinados compostos de uma mistura, pode-se utilizar uma mistura dos solventes obedecendo a ordem crescente de polaridade. A eluição dos compostos se dará em etapas com modificação gradual da polaridade da fase móvel. Os compostos separados, ou frações, são recolhidos seguindo um volume padrão. Se apresentarem coloração podem ser recolhidos seguindo sua eluição (Collins et al., 2007).

As frações retiradas da coluna contêm, além dos compostos separados, os solventes empregados na sua eluição. Estes solventes devem ser evaporados para a concentração das substâncias.

A cromatografia em coluna foi realizada em colunas de 30 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro, utilizando como adsorvente sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) marca Merck. Todos os experimentos foram padronizados com uma altura de sílica dentro da coluna de 17 cm. Os solventes utilizados para a eluição dos compostos, em ordem crescente de polaridade são: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, todos da marca Merck. Para que o aumento de polaridade seja gradual, são utilizadas misturas dos solventes em diferentes proporções, todos no sentido de aumentar a polaridade do sistema.

A sequência dos eluentes é mostrada na Tabela 4.2, assim como a mistura entre eles e as diferentes proporções. Como forma de padronizar os experimentos, a fim de que todos os extratos enfrentassem as mesmas condições, a quantidade de cada eluente e/ou misturas destes nas determinadas proporções foi determinado como sendo 03 vezes o volume de adsorvente na coluna. Com uma altura de 17 cm de sílica e um diâmetro de 2,5 cm, o volume útil da coluna é, aproximadamente, 83,5 cm³. Então, o volume para cada eluente e/ou misturas destes é 250 ml. O volume determinado para o recolhimento de cada fração é de 100 ml. A torneira foi aberta quando o primeiro eluente foi adicionado à coluna e a partir desse momento começou-se a medição dos 100 ml e assim segue até a adição do último eluente.

Após a retirada de cada fração, o solvente é eliminado da amostra com o auxílio de um rotavapor (Tecnal) e a amostra seca é guardada em frascos de vidro até sua posterior utilização.

O fracionamento realizado no *Instituto de Produtos Naturais (IPNA) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC)* — nas Ilhas Canárias/Espanha seguiu uma metodologia diferente. Os extratos de *B. uncinella* a 150 e 200 bar foram misturados a fim de se obter uma massa maior de amostra inicial, totalizando 14 g. Realizou-se um fracionamento primário por polaridades, utilizando-se uma coluna de 30 cm de altura útil e 06 cm de diâmetro com o uso de

vácuo para auxiliar na eluição. A fase estacionária foi a mesma utilizada nos fracionamentos preliminares, sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) marca Merck, com altura do leito de 20 cm. Os solventes utilizados como fase móvel são descritos na Tabela 4.3, como padronização estipulou-se uma quantidade de 04 vezes o volume da coluna para cada eluente.

Tabela 4.2. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas na cromatografia em coluna.

Solvente	Proporção de mistura (% em volume)
Hexano	100
Hexano : Diclorometano	80:20 / 60:40 / 40:60 / 20:80
Diclorometano	100
Diclorometano : Acetato de etila	50:50 / 30:70 / 10:90
Acetato de etila	100
Acetato de etila : Metanol	50:50 / 30:70 / 10:90
Metanol	100

Tabela 4.3. Relação das fases móveis e suas respectivas proporções utilizadas no fracionamento por cromatografia em coluna nos experimentos realizados no IPNA na Espanha.

Solvente	Proporção de mistura (% em volume)
Diclorometano	100
Diclorometano : Metanol	99 : 1
Diclorometano : Metanol	97 : 3
Diclorometano : Metanol	95 : 5
Diclorometano : Metanol	90: 10
Metanol	100

Nota-se que este novo fracionamento foi realizado em uma faixa de polaridade mais alta, utilizando diclorometano e metanol como eluentes. Este procedimento foi adotado devido aos resultados anteriores, que mostram que as frações mais polares do extrato apresentam maior aplicabilidade as atividades propostas.

4.4. Análise dos compostos

4.4.1. Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste na separação de compostos de uma mistura através da migração sobre uma camada de adsorvente, chamada de fase estacionária. O adsorvente mais utilizado é a sílica gel. Esta migração se dá por capilaridade com ajuda de um solvente, chamado fase móvel (Collins et al., 2007; Skoog et al., 2008).

A natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel devem ser consideradas, pois estas têm grande importância na separação dos compostos. Durante a separação existe uma “competição” entre as moléculas da fase móvel e da amostra pela superfície do adsorvente. O poder de eluição está diretamente relacionado com a série eluotrópica, na qual eles estão ordenados, segundo suas polaridades. Quando uma fase móvel pura não separa satisfatoriamente os compostos da amostra, podem-se usar misturas de solventes modificando gradualmente a polaridade para que uma melhor separação ocorra (Collins et al., 2007). A Figura 4.4 mostra um esquema básico da CCD.

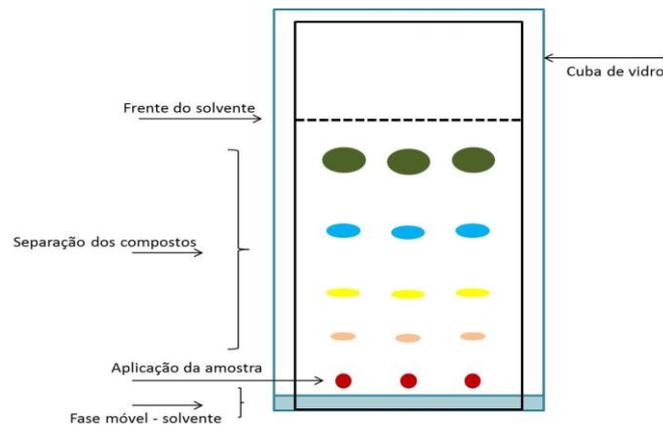


Figura 4.4. Esquema de desenvolvimento da CCD. A amostra é aplicada na base inferior da placa cromatográfica e inserida na cuba de vidro contendo a fase móvel. Durante o desenvolvimento, os compostos da amostra vão sendo separados. Quando a frente do solvente atingir o topo da placa, retira-se da cuba e deixa-se evaporar o solvente.

Todos os extratos obtidos e suas respectivas frações, obtidas por cromatografia em coluna, foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD). A análise por CCD foi realizada em placas de sílica gel Alugram® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) de 20 cm x 20 cm, usando como fase móvel diclorometano PA (Merck). A amostra foi aplicada a 01 centímetro da borda inferior com o auxílio de tubos capilares. Após a aplicação, as placas foram colocadas dentro de uma cuba de vidro fechada, onde permaneceram tempo suficiente até que a fase móvel atingisse a borda superior.

As placas são visualizadas em lanterna de luz UV (Boiton) com comprimento de onda de 264 e 365 nm. Após a visualização na luz, são reveladas com vanilina sulfúrica e anisaldeído sulfúrico. A vanilina sulfúrica é preparada com 01 g de vanilina em 100 mL de etanol com 04 mL de ácido clorídrico e 05 mL de ácido sulfúrico. Para o anisaldeído sulfúrico utiliza-se 0,5 mL de anisaldeído, 05 mL de ácido sulfúrico, 10 mL de ácido acético glacial completando com metanol para um volume de 100 mL. Um revelador específico para atividade antioxidante também foi utilizado e consiste em uma solução de DPPH a 0,2% em metanol (Vila, 2006). Todos os reagentes utilizados são da marca Merck.

4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Todos os 15 extratos obtidos por extração supercrítica foram analisados por CLAE. Devido às altas pressões em que os extratos foram obtidos, a cromatografia líquida é indicada para que se possa observar a presença de um composto majoritário, podendo também ser uma análise quantitativa. As análises que foram realizadas neste estudo foram apenas qualitativas para que se pudesse avaliar o perfil cromatográfico dos extratos. As frações obtidas na cromatografia em coluna também foram analisadas por CLAE. O objetivo neste caso foi avaliar a eficiência na separação do método de fracionamento.

As análises de cromatografia líquida foram realizadas em um sistema CLAE Agilent, modelo 1200 Series com detector UV. O método de análise foi baseado na literatura (Kumazawa et al, 2003), utilizando como fase móvel água Milli-Q (Millipore) (A) e acetonitrila (Merck) (B), ambos com 2% de ácido glacial acético (Merck), com

um gradiente de 20-80% de B em 90 minutos com um fluxo de 1,0 mL/min. A coluna utilizada foi uma C18 (4,6 x 250 mm x 5 μ m). O comprimento de onda utilizado no detector é $\lambda = 345$ nm.

4.5. Análise de atividade antioxidante

A análise da atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis* foi realizada através do método de captura do radical livre DPPH, proposto por Brand-Williams em 1995 (Brand-Williams et al., 1995; Rufino et al., 2007). Este método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por compostos antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm de comprimento de onda.

Foram preparadas 03 soluções de amostra e etanol (99,5% - Merck) com concentrações de 20 mg/mL, 10 mg/mL e 05 mg/mL e uma solução de DPPH (Sigma®) a 60 μ M, também em etanol. Uma alíquota de 0,1 mL de cada concentração de amostra foi colocada em cubetas de vidro juntamente com 03 mL da solução de DPPH. O branco foi realizado substituindo a alíquota de amostra pelo mesmo volume de etanol. A quantificação foi realizada através de uma curva de calibração (Figura 4.5) do DPPH, com concentrações variando de 10 μ M a 50 μ M sendo o primeiro ponto "0" e o último ponto a concentração da solução preparada inicialmente, 60 μ M. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro Biospectro SP-220, no comprimento de onda de 515 nm e seguiram até que não houvesse mais variação no valor da absorbância, em torno de 60 min.

Os resultados foram expressos em uma concentração chamada CE_{50} (concentração eficiente) que significa a concentração de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%. Os valores são dados em g de extrato por g de DPPH. Quanto menor for este valor, maior será o consumo de DPPH e conseqüentemente maior será sua atividade antioxidante (Souza et al., 2007). Um cálculo em percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SR) também é apresentado, que indica o quanto de DPPH foi consumido percentualmente. O cálculo é apresentado abaixo (Duarte-Almeida et al., 2006):

$$\%DPPHconsumido = \left[\left(\frac{abs\ controle - abs\ amostra}{abs\ controle} \right) \right] \times 100\%$$

Onde “abs controle” se refere a absorvância lida para o branco, que é a solução de DPPH com a alíquota de amostra substituída por etanol, e “abs amostra” é a absorvância lida para cada amostra.

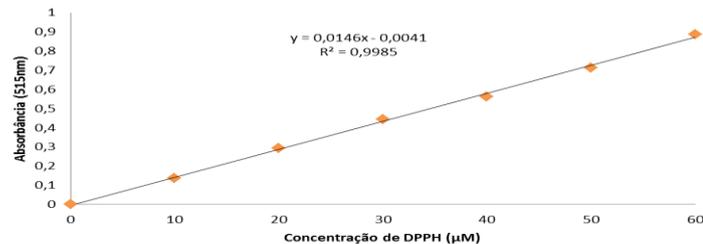


Figura 4.5. Curva padrão de DPPH

A atividade antioxidante do fio também foi avaliada pelo método DPPH, porém adaptado para o tipo de amostra. Foi definido como padrão para análise um comprimento de 03 cm de fio que foi imerso em 04 mL da solução de DPPH preparada como descrito acima. Após o tempo de reação de 1 h, as amostras foram lidas conforme o método descrito anteriormente. O branco para a análise dos fios foi preparado com o mesmo volume de solução de DPPH e um fio não impregnado de mesmo comprimento do utilizado nas amostras foi colocado em imersão. Para o fio, apenas o cálculo em percentual foi apresentado.

4.6. Determinação de compostos fenólicos totais

O método escolhido para a análise da concentração de compostos fenólicos totais foi o método de Follin-Ciocalteu (Follin e Ciocalteu, 1927), tendo como padrão o ácido gálico. Uma massa de 20 mg de cada extrato foi diluída em 10 mL de etanol 99,5% (Merck). Essa amostra foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com etanol. Foi adicionado 0,5 mL desta solução em um tubo de fundo cônico, 0,5 mL de uma solução de etanol 10%, 01mL do reagente Folin-Ciocalteu (Polipur) 1N e então o tubo foi agitado. Adicionou-se 01 mL de uma solução de carbonato de sódio 17% e agitou-se novamente. O tubo foi completado com água destilada até o volume final de 10 mL e novamente agitado.

O teste em branco foi realizado da mesma forma, porém no lugar da amostra adicionou-se 0,5 mL da solução de etanol 10%. Os tubos de ensaio permanecem em repouso em local protegido da luz por 90 min. A quantificação foi realizada comparando as leituras em comprimento de onda de 725 nm das amostras com uma curva de ácido gálico (Figura 4.6) com concentrações variando de 0 de 0,07 mg/mL.

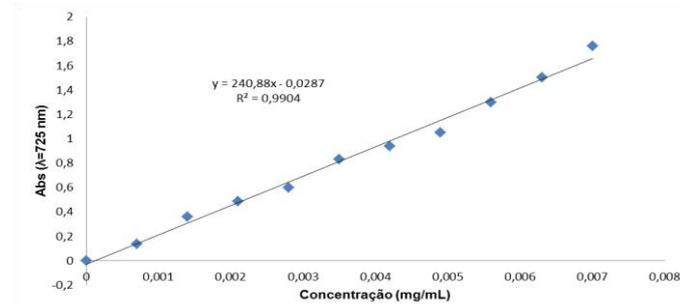


Figura 4.6. Curva padrão de ácido gálico

4.7. Determinação de flavonoides totais

Existem muitos métodos de determinação de flavonoides (Mouco, et al. 2013). O método escolhido foi o de reação com AlCl_3 (Funari e Ferro, 2006) devido a disponibilidade de materiais e facilidade de execução. O padrão de referência empregado foi a quercetina dihidratada (HWI).

Uma curva padrão de quercetina (Figura 4.7) foi preparada, utilizando alíquotas de 02 a 06 mL de uma solução a 50 $\mu\text{g/mL}$ em etanol, que foram passadas a balões volumétricos de 25 mL contendo 01 mL de uma solução de AlCl_3 (Merck) a 2,5% em água. O volume do balão foi completado com etanol (Merck). As amostras foram preparadas com 02 mL de uma solução a 20 mg/mL, 01 mL da solução de AlCl_3 no balão de 25 mL, elevando o volume com etanol. Para o ensaio em branco foi utilizado o mesmo procedimento, porém sem a amostra. Após 30 minutos de reação, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) a $\lambda = 425$ nm.

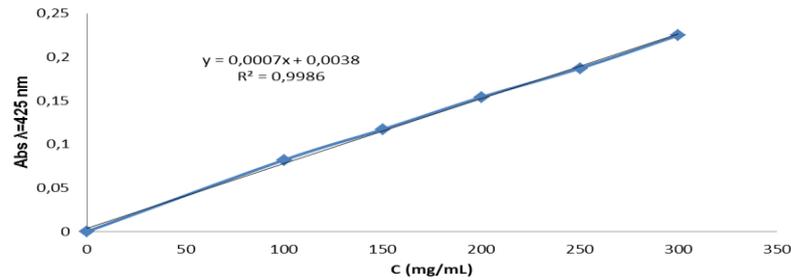


Figura 4.7. Curva padrão de quercetina

4.8. Atividade antimicrobiana – Bioautografia e Concentração Inibitória Mínima

A atividade antimicrobiana foi testada utilizando dois métodos, a bioautografia indireta e a concentração inibitória mínima. A bioautografia indireta é um método qualitativo de avaliação da atividade antimicrobiana, em que se utiliza uma cromatografia em camada delgada (CCD) da amostra a ser testada sob um meio de cultura inoculado com os microorganismos escolhidos. Já a concentração inibitória mínima (CIM) trata-se de um método quantitativo e determina a quantidade mínima de amostra necessária para a inibição do crescimento do microorganismo. Consiste na diluição seriada da amostra frente a uma concentração constante de microorganismo (Falcão et al., 2012). A escolha dos microorganismos foi baseada em estudos que mostram aqueles que são responsáveis pelo maior número de infecções na pele e de ferimentos (Henry-Stanley et al., 2010).

Para o método de bioautografia indireta, os extratos foram diluídos em diclorometano P.A. e aplicados (1,5 µL) em placas de CCD de sílica gel GF254. Em seguida, os compostos foram separados através da técnica de CCD, utilizando como eluente o diclorometano. Após a efetiva eliminação do solvente por evaporação, foram aplicados 1,5 µL da amostra em um ponto abaixo da primeira aplicação para observar a presença ou não de atividade antimicrobiana do extrato total sem estar separado pela eluição. O inóculo foi feito através de uma suspensão de microorganismos ajustada a $1,0 \times 10^4$ UFC/mL e adicionada em ágar Mueller-Hinton. Os microorganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterococcus faecalis* (ATC 29212). Por fim, as

placas de CCD já eluídas foram submersas no meio de cultura inoculado com os microrganismos e incubadas por 24 horas a 37°C. Após o tempo de crescimento dos microrganismos, foi adicionado sal de tetrazólio INT (p-iodonitrotetrazolium violet) para visualização dos halos de inibição (Valgas et al., 2007; Pereira, 2010). As zonas sem coloração avermelhada são as faixas de inibição de crescimento microbiano (Falcão et al., 2012).

A CIM foi determinada utilizando a metodologia de diluição em microplaca (microdiluição). Em cada poço da microplaca foram adicionados 100µL do inóculo de microrganismo com concentração final de $1,0 \times 10^4$ UFC/mL em caldo Mueller-Hinton e então foram adicionados 100 µL do extrato solubilizado em Tween 20 a 10% em água nas concentrações finais de 01, 03, 06, 12 e 24mg/mL. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37°C e após o tempo de crescimento foi possível visualizar se houve crescimento dos microrganismos nos poços. Os poços que não apresentam crescimento visualmente foram semeados em ágar Mueller-Hinton, para confirmação da inibição. A CIM é a menor concentração de amostra que inibe o crescimento do microrganismo teste (Pereira, 2010).

Como controle positivo, foi utilizado ampicilina na concentração de 0,06 mg/mL para *E. coli* e 0,01 mg/mL para *S. aureus* e *E. faecalis*, para ambos os testes. Como controle negativo, placas cromatográficas sem amostra eluídas com diclorometado foram utilizadas para o método de bioautografia indireta e, para o método de CIM, foi utilizado Tween 20 a 10% em água.

4.9. Impregnação supercrítica (IS)

O sistema de impregnação supercrítica (IS) consiste em uma bomba de CO₂ de alta pressão (ISCO 260-D), uma célula de impregnação de aço inox (Waters) de alta pressão, uma resistência (Resistec) que controla a temperatura do ar no entorno da célula, uma placa de agitação magnética (Fisatom) e um transdutor de pressão (Smar). O esquema da montagem é mostrado na Figura 4.8 e uma foto do equipamento é mostrada na Figura 4.9.

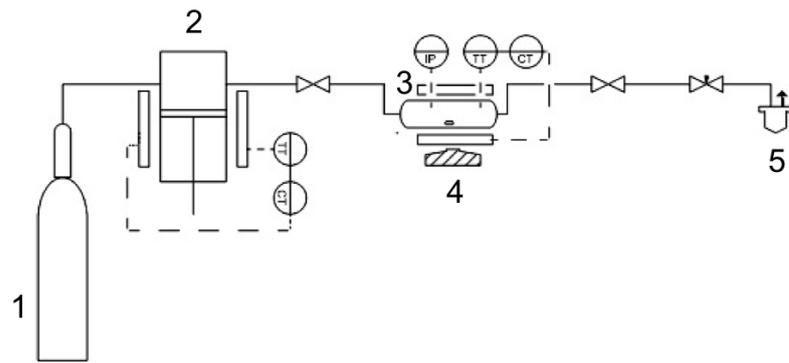


Figura 4.8. - 1: cilindro de CO₂; 2: bomba termostática; 3: Célula de impregnação; 4: Agitador magnético; 5: Vaso de expansão; TT: Transmissor de temperatura; CT: Controlador de temperatura; IP: indicador de pressão.



Figura 4.9. Equipamento de Impregnação Supercrítica

A escolha da matriz onde ocorrerá a impregnação dos extratos se deu com base na literatura (Lee et al., 2013). Fios de sutura de PLGA – poli(ácido láctico-co-glicólico) medindo 45 cm da marca Johnson&Johnson foram utilizados para os testes de impregnação. Dentro da célula, foi colocada uma espécie de “estante” com uma tela de aço inox (Figura 4.10). Na parte de baixo da estante foi colocado um recipiente com o extrato (20 mg) diluído em 01 mL de etanol (Merck). A massa de extrato a ser colocado foi definida com base na massa utilizada nas análises espectrofotométricas (atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e flavonoides totais). Na parte de cima da estante foi colocado o fio de sutura enrolado de forma que ficasse dentro do limite da estante. Este sistema foi inserido dentro da célula para a realização dos experimentos de impregnação, onde permaneceu em contato com o CO₂ no estado supercrítico durante 1h30min a 200 bar e 40°C.

Decorrido este período, efetuou-se uma despressurização lenta do sistema com uma taxa de 10 bar/min. O fio impregnado foi guardado em tubos de reação (Eppendorf) até posteriores análises. Para efeitos comparativos, também foi realizada a impregnação a 150 bar nas mesmas condições citadas acima.

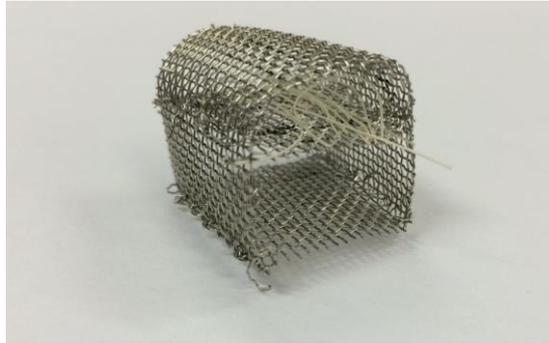


Figura 4.10. Suporte em aço inox para extrato e fios de sutura para o experimento de impregnação supercrítica.

4.10. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os fios impregnados foram analisados por microscopia eletrônica de varredura para que fosse possível observar como se dá a impregnação na amostra. As análises foram feitas no Centro de Microscopia da PUCRS utilizando um equipamento Philips XL30, a partir de amostras depositadas em *stubs* coberto por fita dupla face de carbono com superfície metalizada com ouro.

Foram utilizados aumentos de 200, 400 e 800X. Aumentos maiores não foram possíveis devido à característica da amostra que “queimava” devido à alta tensão do feixe de elétrons incidente.

4.11. Quantificação do material impregnado

Para a quantificação do material impregnado, foi construída uma curva de calibração com o auxílio do espectrofotômetro Biospectro SP-220. Uma solução na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ do extrato a ser impregnado foi preparada utilizando como solvente o tampão PBS (*phosphate buffered saline* – tampão fosfato salino). Esta solução foi diluída sucessivamente até atingir a concentração mínima de 0,5

$\mu\text{g/mL}$ (10 $\mu\text{g/mL}$, 05 $\mu\text{g/mL}$, 02 $\mu\text{g/mL}$, 01 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Cada concentração foi lida a absorvância em um comprimento de onda de 345 nm. Este comprimento foi selecionado com base no método utilizado na CLAE, que usa um detector UV com o mesmo de comprimento de onda.

O tampão PBS é utilizado para análises em que se tem a necessidade de simular as condições de fluidos corporais. É uma solução salina, contendo cloreto de sódio, fosfato de sódio e, em algumas formulações, cloreto de potássio e fosfato de potássio. A concentração salina do PBS se iguala a do corpo humano e mantém um pH constante quando adicionado a diferentes meios. Para a preparação do tampão, uma ampola do pó foi reconstituída em água destilada até chegar ao pH 7,2 / $\pm 0,1$. O pH foi medido durante todo o processo com o medidor de pH Nova Técnica. A curva construída, juntamente com a equação de ajuste, é apresentada na Figura 4.11.

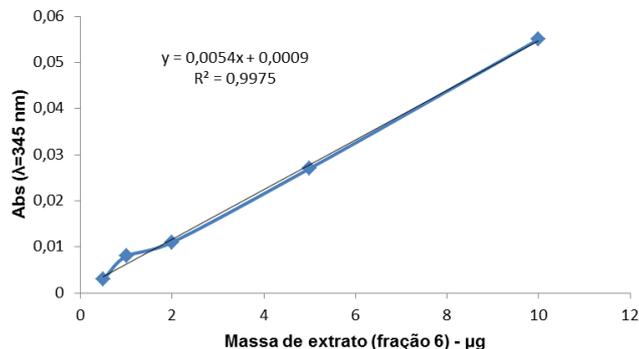


Figura 4.11. Curva de calibração da Fração 06 utilizada nas impregnações para quantificação do material impregnado.

Para a análise dos fios, um comprimento padrão de 03 cm foi estipulado. O comprimento total do fio na embalagem é de 45 cm. Cada fragmento de 03 cm de fio foi imerso em 04 mL de tampão PBS e deixado em repouso por 05 minutos. Análises de liberação prolongada também foram realizadas com leituras após 07 e 15 dias de imersão. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores apresentados são as médias destas medidas. Os frascos contendo as amostras foram acondicionados em estufa a 36°C para simular a temperatura do corpo humano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados foram separados em três partes. A primeira parte corresponde aos resultados obtidos na primeira etapa dos estudos, em que foram obtidos e analisados extratos de seis espécies de *Baccharis*. Na segunda parte estão os resultados da segunda etapa do trabalho, em que uma espécie foi selecionada com base nos resultados da primeira etapa e uma segunda espécie, mais abundante na natureza, foi adicionada para que mais análises fossem feitas e apenas uma espécie pudesse ser selecionada para os ensaios de impregnação. Na terceira parte dos resultados, aparecem os resultados da impregnação com a espécie selecionada com base nos resultados da segunda etapa.

5.1. Resultados da primeira etapa: estudo inicial de 06 espécies do gênero *Baccharis*

Os primeiros resultados obtidos foram relativos à extração dos compostos não voláteis de 06 espécies de *Baccharis*. Na Tabela 5.1 é mostrada a massa obtida de cada extrato, identificados numericamente conforme descrito na seção 4.2.

Os maiores rendimentos obtidos foram para as extrações identificadas pelos números 5, 1, 8 e 3, respectivamente. Pode-se observar que estes extratos tem em comum a condição de pressão da extração de 150 bar. Este fato pode estar relacionado ao peso molecular e polaridade dos compostos presentes nos extratos (Scopel et al., 2014), sendo nestas plantas mais abundantes. Porém não é uma tendência do gênero vegetal, já que em alguns extratos o rendimento a 200 bar foi maior (extratos 13 e 15).

Tabela 5.1. Massa dos extratos obtidos por extração supercrítica de 06 espécies de *Baccharis* em diferentes condições de pressão na temperatura de 60°C. A identificação dos extratos é a mesma mostrada na Tabela 4.1. A massa de planta utilizada em todas as extrações foi de 100 g.

Número de identificação	Espécies de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	Extrato (g de extrato)
1	<i>B. microdonta</i>	150	CO ₂	1,675
2	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂	0,740
3	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	1,221
4	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂	0,540
5	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	2,785
6	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂	0,364
7	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	0,152
8	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	1,629
9	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	0,971
10	<i>B. usteri</i>	150	CO ₂	0,222
11	<i>B. usteri</i>	200	CO ₂	0,009
12	<i>B. trimera</i>	150	CO ₂	0,105
13	<i>B. trimera</i>	200	CO ₂	0,355
14	<i>B. tridentata</i>	150	CO ₂	0,479
15	<i>B. tridentata</i>	200	CO ₂	0,651

5.1.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Todos os extratos foram analisados por CCD. Um grande número de compostos pode ser observado, como mostrado na Figura 5.1. Os compostos foram observados a luz UV a $\lambda = 245$ e $\lambda = 365$ nm e a placa foi revelada com vanilina sulfúrica.

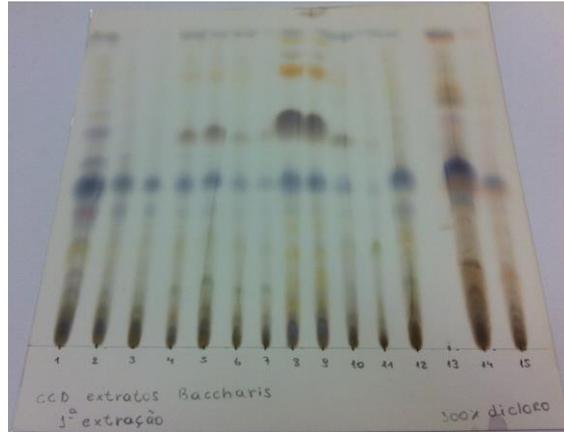


Figura 5.1. Análise em CCD dos extratos de acordo com identificação da Tabela 4.1. Cada cor apresenta um composto ou um grupo de compostos com características cromatográficas similares.

5.1.2. Cromatografia em coluna

Dos 15 extratos obtidos, apenas 05 foram fracionados por cromatografia em coluna devido à pequena quantidade em massa dos demais extratos. A identificação dos extratos e a quantidade de frações obtidas em cada experimento estão representadas na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Extratos fracionados por cromatografia em coluna e os respectivos números de frações obtidas em cada experimento.

Número de identificação	Espécies de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	Número de frações obtidas
3	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂ + cossolvente	18
5	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂ + cossolvente	17
7	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂ + cossolvente	17
13	<i>B. trimera</i>	200	CO ₂	17
15	<i>B. tridentata</i>	200	CO ₂	17

5.1.3. Análises CLAE

Todos os extratos obtidos na extração supercrítica foram analisados por CLAE. Vale salientar que em um primeiro momento tais análises têm por objetivo avaliar e comparar o perfil cromatográfico dos extratos identificando, por exemplo,

picos coincidentes em mais de uma espécie, compostos majoritários ou algum comportamento específico de alguma espécie ou condição de extração.

As análises por CLAE dos extratos resultaram em um grande número de picos (compostos). Alguns destes picos coincidem em alguns extratos, que são listados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Tempos de retenção dos picos que apareceram em mais de um extrato e suas respectivas identificações. O “ * ” que aparece ao lado de algumas plantas, refere-se a um percentual em área menor que 0,5% dos picos do cromatograma.

TR (min)	Plantas
8 – 10	6, 7, 5, 8*, 11, 10, 1, 2, 3, 4, 9*
22 – 23	14, 6, 7, 5, 1, 2, 3, 4, 13
50 - 51	6, 7, 5, 8, 10, 4, 13
68 – 69	6, 7, 5, 8, 10, 2, 4, 13

Poucos extratos apresentaram compostos majoritários, com mais de 17% em área. Tais extratos são mostrados na Tabela 5.4, juntamente com o tempo de retenção dos compostos e os respectivos % em área. Os cromatogramas dos extratos 5, 8 e 10 com a representação dos picos majoritários são mostrados nas Figuras 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente.

Tabela 5.4. Picos majoritários obtidos nos extratos identificados e seu respectivo tempo de retenção e % em área. TR é o tempo, em minutos, em que o pico aparece no cromatograma. % Área é o percentual relativo de cada pico no cromatograma.

Identificação do extrato	Espécies de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	TR (min)	% Área
5	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂ + cosolvente	53,01	22,24
8	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	50,75 / 68,86	17,05 / 35,40
10	<i>B. usteri</i>	150	CO ₂	68,79	17,30

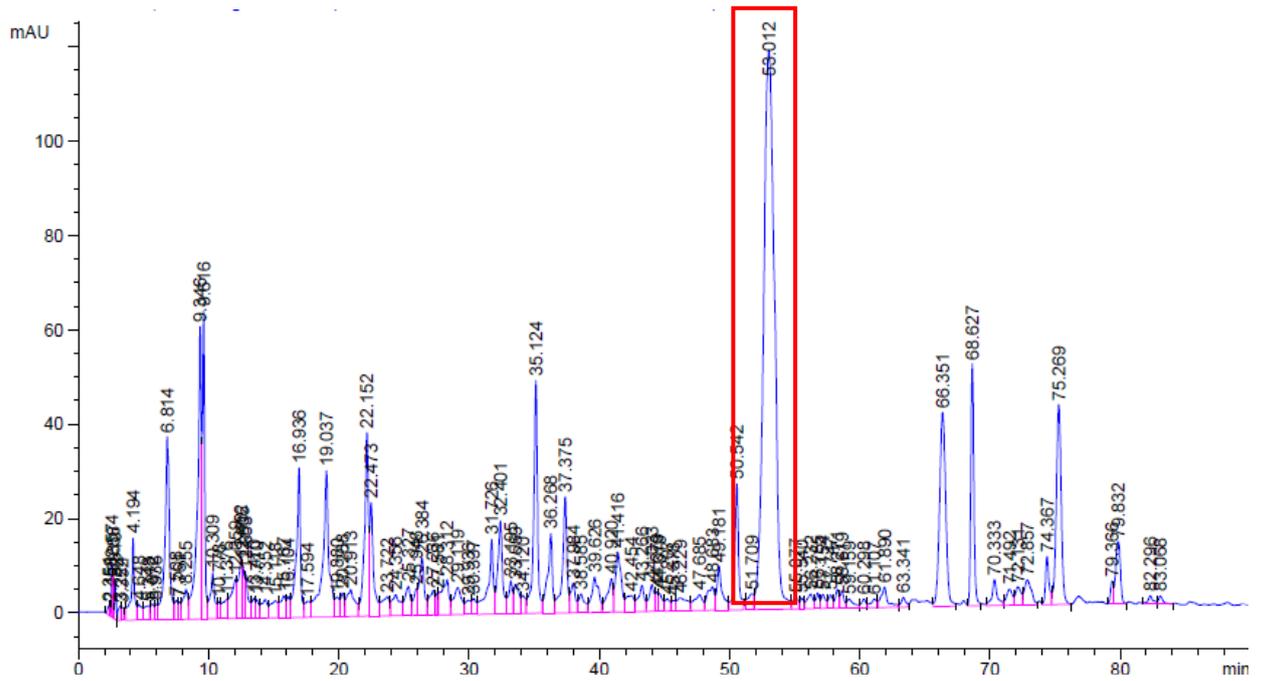


Figura 5.2. Cromatograma do extrato 5 (*B. megapotamica* 150 - CO₂ + cossolvente) mostrando o pico majoritário com 22,24% em área no tempo 53,01 min.

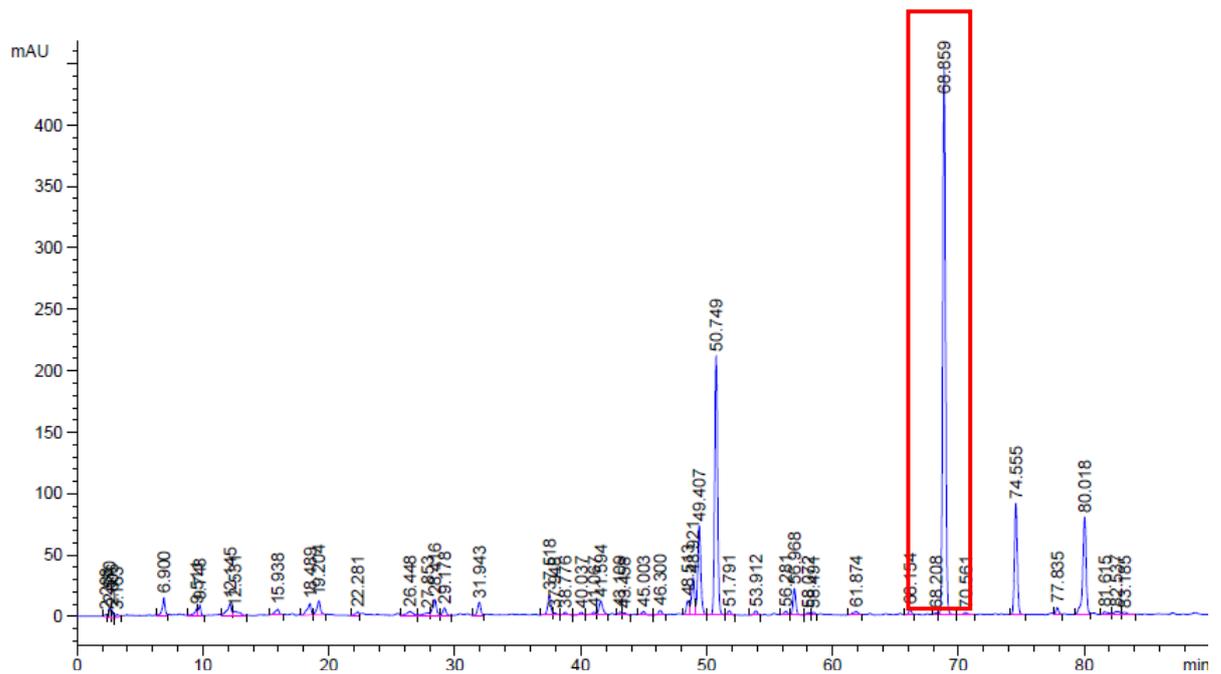


Figura 5.3. Cromatograma do extrato 8 (*B. vulneraria* 150 - CO₂) mostrando o pico majoritário com 17,30% em área no tempo 68,79 min.

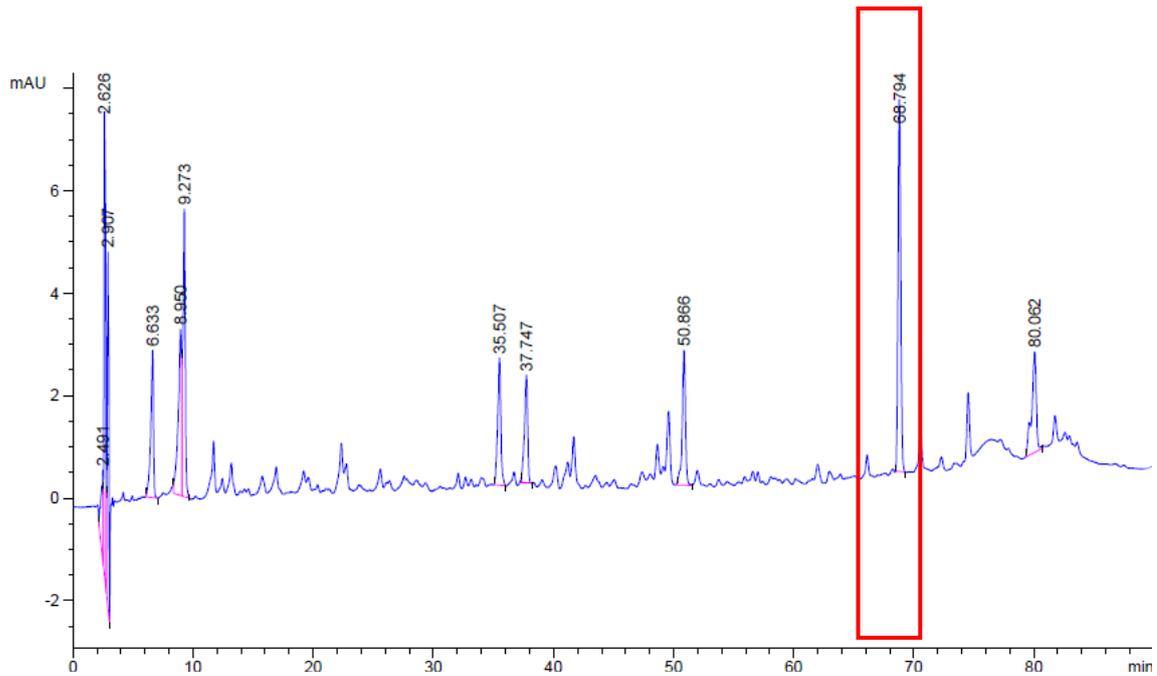


Figura 5.4. Cromatograma do extrato 10 (*B. usteri* 150 - CO₂) mostrando os picos majoritários com 17,05% e 35,40% em área nos tempos 50,75 min e 68,86 min, respectivamente.

5.1.4. Análise antioxidante

Nem todos os extratos puderam ser testados devido à massa insuficiente disponível para análise. Os valores da atividade antioxidante dos extratos testados são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Valores da atividade antioxidante dos extratos analisados, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH. EC₅₀ Indica a quantidade de extrato necessário para decair a absorvância pela metade de uma g de DPPH em solução.

Número de identificação	Espécie de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	CE ₅₀ (g extrato/g DPPH)
5	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂ + cossolvente	53,82
1	<i>B. microdonta</i>	150	CO ₂	202,40
2	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂	99,31
3	<i>B. microdonta</i>	200	CO ₂ + cossolvente	64,96
4	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂	105,70
9	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	90,25
13	<i>B. trimera</i>	200	CO ₂	34,70
15	<i>B. tridentata</i>	200	CO ₂	82,83

Pode-se observar que os extratos obtidos a 200 bar, com ou sem cossolvente, foram os que menores valores de EC₅₀ apresentaram. Sabe-se que pressões mais altas e o uso do cossolvente aumentam o rendimento de compostos mais polares, dentre eles os compostos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros (Cassel et al., 2008). Os compostos fenólicos por sua vez, apresentam elevada ação antioxidante devido à estrutura de sua molécula (Simões et al., 2008).

5.1.5. Análise de compostos fenólicos totais

Assim como na análise de atividade antioxidante, nem todos os extratos foram testados devido à massa insuficiente. A Tabela 5.6 mostra os extratos que foram avaliados juntamente com os resultados, que são dados em percentual em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras.

Tabela 5.6. Identificação dos extratos avaliados o % de compostos fenólicos totais. Os resultados são dados em % em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas.

Número de identificação	Espécies de Baccharis	Pressão (bar)	Solvente	% de compostos fenólicos totais
4	<i>B. megapotamica</i>	150	CO ₂	1,697
6	<i>B. megapotamica</i>	200	CO ₂	1,541
8	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	2,060
9	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	4,551
12	<i>B. trimeria</i>	150	CO ₂	1,749
14	<i>B. tridentata</i>	150	CO ₂	1,801
15	<i>B. tridentata</i>	200	CO ₂	2,372

Pode-se observar que os extratos com maior % percentual de compostos fenólicos foram aqueles que apresentaram menores valores de EC₅₀ (naqueles que foram utilizados para ambas as análises, extratos 4, 9 e 15). Como dito anteriormente, os compostos fenólicos, devido sua estrutura, possuem uma reconhecida atividade antioxidante, o que explica o fato de quanto maior a quantidade destes compostos presentes no extrato, maior será sua atividade antioxidante e, conseqüentemente, menor o valor do EC₅₀.

5.1.6. Atividade antimicrobiana

Todos os extratos apresentados na Tabela 4.1 foram testados em relação a sua atividade antimicrobiana utilizando primeiramente o método de bioautografia indireta, conforme metodologia descrita no item 4.8. As análises realizadas não apresentaram resultados positivos para nenhuma das amostras avaliadas, ou seja, nenhum dos extratos apresentou atividade antimicrobiana para os microrganismos testados. As análises de concentração inibitória mínima não foram realizadas devido ao método qualitativo, a bioautografia, não ter apresentado resultado positivo.

5.2. Resultados da segunda parte: seleção da *B. vulneraria* e inclusão da *B. uncinella* para a continuação dos estudos

De acordo com os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, descritos acima, a espécie *B. vulneraria* foi selecionada para dar continuidade aos estudos por ter apresentado melhores resultados nas análises realizadas com relação à atividade antioxidante, concentração de compostos fenólicos totais e flavonoides. Também foi incluída para dar continuidade aos experimentos uma espécie com atividades biológicas conhecidas, a *B. uncinella*. Esta espécie não tinha sido cogitada inicialmente para trabalhar-se por haver um grande número de trabalhos na literatura com diversos propósitos (Montanha et al., 2004; Zalewski et al., 2011; Florão et al., 2012; Vanni et al., 2012). Esta espécie foi inserida no trabalho por se tratar de uma planta de crescimento espontâneo e de grande disponibilidade na natureza. Mesmo utilizando uma planta com atividades conhecidas, o caráter inovador ainda sim será mantido, pois não há relatos de impregnação supercrítica de fios de sutura utilizando espécies nativas.

Algumas análises não foram repetidas, apenas aquelas que seriam decisivas na escolha do extrato a ser utilizado. As análises realizadas nessa parte do estudo foram: atividade antioxidante, determinação de compostos fenólicos e flavonoides totais e atividade antimicrobiana.

5.2.1. Rendimento

Na Tabela 5.8 são mostrados os rendimentos em massa das novas extrações realizadas de *B. vulneraria* e *B. uncinella* com suas respectivas identificações. Nesta etapa, foi utilizado etanol e água como cossolvente com o intuito de aumentar a seletividade de compostos extraídos.

Tabela 5.8. Rendimento em massa dos extratos obtidos por extração supercrítica das espécies *B. vulneraria* e *B. uncinella*.

Número de identificação	Espécie de Baccharis	Pressão (bar)	Número de identificação	Extrato (g de extrato)
1	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂	1,069
2	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂	0,336
3	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	4,201
4	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	0,597
5	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Água	5,627
6	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Água	3,595
7	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	0,756
8	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	0,514
9	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	1,871
10	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	1,227
11	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Água	2,662
12	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Água	1,906

O comportamento do rendimento nestas extrações se mostrou similar ao apresentado nas extrações da primeira parte do trabalho (item 5.1). Os extratos a 150 bar, independente do uso de cossolvente, apresentaram maior rendimento para ambas as espécies em todas as condições. As possíveis justificativas são uma maior concentração de compostos menos polares nas plantas e ceras que são extraídas a pressões mais baixas.

As extrações com cossolvente (etanol e água) apresentaram resultados maiores em relação à massa de extrato. A adição de cossolvente confere um aumento de polaridade ao sistema e com isso um maior número de compostos são

retirados da matriz vegetal. Este fato justifica o maior rendimento nas extrações com cossolvente.

5.2.2. Cromatografia em Camada Delgada

A fase móvel para eluição das placas foi diclorometano e dois reveladores foram utilizados nesta segunda etapa dos resultados, vanilina sulfúrica e DPPH. O revelador de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um método qualitativo e rápido para verificação da atividade antioxidante. Este reagente é o mesmo utilizado nas análises de atividade antioxidante, para uma análise quantitativa. Outra vantagem desse revelador é identificar os compostos que possuem mais atividade. Assim, quando se identifica um composto com essa característica mais pronunciada, uma cromatografia em coluna pode ser realizada com o propósito de isolá-lo.

Para o revelador de DPPH, uma solução a 0,2% em metanol foi preparada e aplicada sobre a placa após a eluição. O resultado é instantâneo, a placa adquire uma coloração roxa e os compostos com atividade se tornam amarelos. As Figuras 5.5 e 5.6 mostram os resultados da CCD para ambas as espécies, a primeira utilizando vanilina sulfúrica como revelador e a segunda o DPPH.

Quanto à Figura 5.5, pode-se observar que ambas as espécies possuem compostos em comum, bem destacados no centro da placa em coloração azul/roxa. Essas cores são atribuídas a compostos terpênicos. Neste caso, por se tratar de um extrato a alta pressão, acredita-se que seja um composto com maior peso molecular, um diterpeno ou triterpeno por exemplo. Tais compostos já foram relatados na literatura para *B. uncinella* (Grecco et al., 2010).

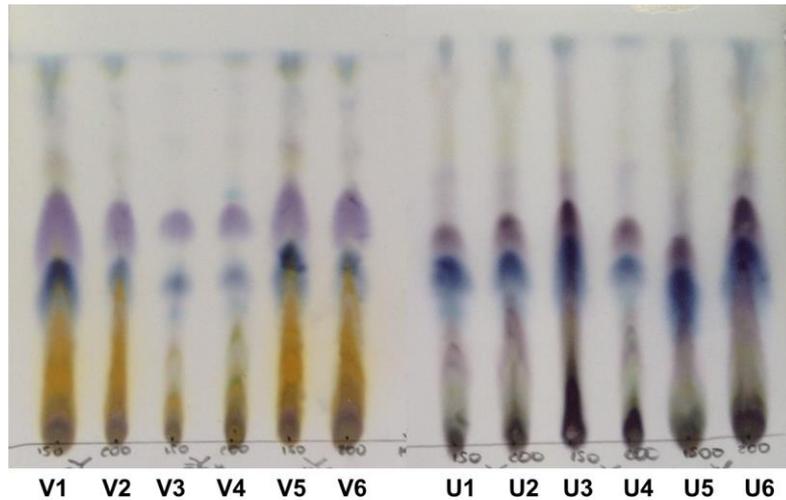


Figura 5.5. CCD de *B. vulneraria* e *B. uncinella* reveladas com vanilina sulfúrica. Identificação: V1 - CO₂ 150 bar; V2 - CO₂ 200 bar; V3 - CO₂+Etanol 150 bar; V4 - CO₂+Etanol 200 bar; V5 - CO₂+H₂O 150 bar; V6 - CO₂+H₂O 200 bar. U1 - CO₂ 150 bar; U2 - CO₂ 200 bar; U3 - CO₂+Etanol 150 bar; U4 - CO₂+Etanol 200 bar; U5 - CO₂+H₂O 150 bar; U6 - CO₂+H₂O 200 bar.

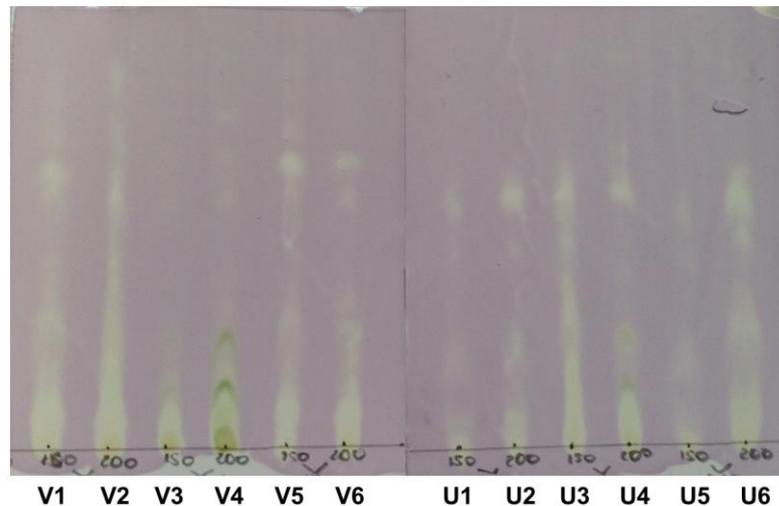


Figura 5.6. CCD de *B. vulneraria* e *B. uncinella* reveladas com DPPH. Identificação: V1 - CO₂ 150 bar; V2 - CO₂ 200 bar; V3 - CO₂+Etanol 150 bar; V4 - CO₂+Etanol 200 bar; V5 - CO₂+H₂O 150 bar; V6 - CO₂+H₂O 200 bar. U1 - CO₂ 150 bar; U2 - CO₂ 200 bar; U3 - CO₂+Etanol 150 bar; U4 - CO₂+Etanol 200 bar; U5 - CO₂+H₂O 150 bar; U6 - CO₂+H₂O 200 bar.

Analisando a CCD da *B. vulneraria* com vanilina sulfúrica, observa-se uma grande quantidade de compostos com coloração amarelada na metade de baixo da placa, também observada na *B. uncinella*, porém sem tanto destaque. Tal coloração pode ser um indicativo de flavonoides.

Quanto a CCD revelada com DPPH, observa-se que grande parte dos compostos que apresentam atividade antioxidante encontram-se na parte de baixo da placa, principalmente sobre a linha de partida da análise. São compostos que, devido a sua polaridade, não foram eluídos com o solvente utilizado (diclorometano). Comparando com as placas reveladas com vanilina sulfúrica, é provável que essa atividade seja devido à presença de flavonoides ou outros tipos de compostos fenólicos mais polares.

5.2.3. Análise Atividade Antioxidante

Na Tabela 5.9 são mostrados os resultados das análises de atividade antioxidante para todos os extratos.

Tabela 5.9. Valores da atividade antioxidante dos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*, expressos em g de extrato por g de solução de DPPH. EC₅₀ Indica a quantidade de extrato necessário para decair a absorbância pela metade de uma g de DPPH em solução.

Número de identificação	Espécie de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	CE ₅₀ (g extrato/g DPPH)
1	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂	172,340
2	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂	177,620
3	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	185,430
4	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	185,285
5	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Água	185,285
6	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Água	184,300
7	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	182,010
8	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	152,185
9	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	112,350
10	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	71,985
11	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Água	143,945
12	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Água	115,540

Os resultados para a espécie *B. uncinella* não apresentaram variações significativas para todas as condições de extração, mantendo um CE₅₀ em torno de

185 g extrato/g DPPH. Os extratos de *B. vulneraria* apresentaram um comportamento diferente, com grande variação entre as diferentes condições de extração. Em ordem decrescente de CE₅₀, as extrações sem cossolvente tem menos atividade antioxidante, seguidas das extrações com água e etanol. A condição com etanol a 200 bar apresentou menor valor de CE₅₀, lembrando que quanto menor este valor maior a atividade antioxidante do extrato.

5.2.4. Análise de compostos fenólicos totais

O percentual de compostos fenólicos para ambas as espécies em todas as condições de extração são mostradas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Avaliação do % de compostos fenólicos totais nos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*. Os resultados são dados em % em massa de compostos fenólicos totais presentes nas amostras analisadas.

Número de identificação	Espécies de Baccharis	Pressão (bar)	Solvente	% de compostos fenólicos totais
1	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂	3,669
2	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂	2,562
3	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	2,346
4	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	3,037
5	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Água	2,570
6	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Água	2,960
7	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	2,233
8	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	2,320
9	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	3,963
10	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	3,997
11	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Água	3,357
12	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Água	2,804

Ambas as espécies, em todas as condições de extração, apresentaram valores próximos de compostos fenólicos totais. Sabe-se que os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante reconhecida devido sua estrutura (Vila, 2006), isto indicaria uma relação do valor de CE₅₀ e a análise dos fenóis. Porém, a única relação que se observa é na *B. vulneraria* que segue a mesma ordem da

atividade antioxidante, a extração com etanol apresenta um número maior de compostos fenólicos, porém com valores muito próximos das demais.

Como os valores de CE_{50} são altos e próximos para a maioria dos extratos, é esperado que o total de compostos fenólicos também apresente valores próximos. O extrato de *B. vulneraria* 200 bar com etanol foi o único que se destacou em relação à atividade antioxidante, porém o percentual de fenólicos é um valor próximo aos demais. Deste fato pode-se intuir que a ação antioxidante deste extrato não está relacionada unicamente aos compostos fenólicos, já que não só estes compostos apresentam tal propriedade. Outra associação que se pode fazer é em relação ao tipo de composto fenólico que representa esse valor. Existe uma série de classificações de acordo com a estrutura do composto fenólico. Uma delas são os flavonoides, grupo com mais de 4.200 compostos caracterizado por uma estrutura com 15 carbonos em seu núcleo fundamental, com duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. Os flavonoides são uma das classes mais importantes dentro dos compostos fenólicos devido à suas propriedades e são divididas em subclasses dependendo de sua estrutura (Simões et al., 2007). Algumas dessas subclasses são mostradas na Figura 5.6.

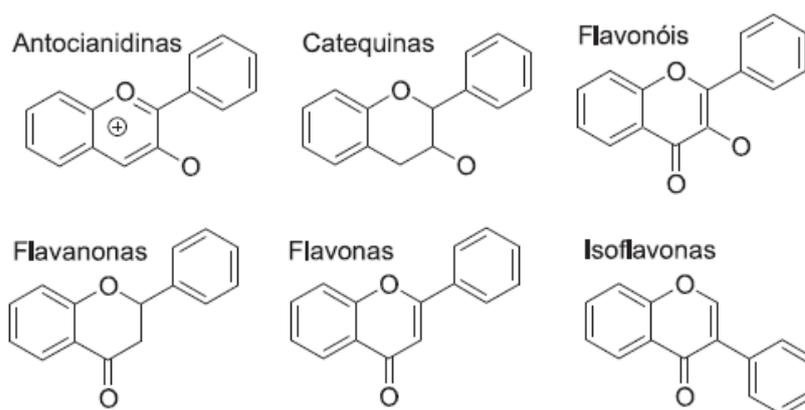


Figura 5.7. Estrutura química dos principais tipos de flavonoides (Março e Poppi, 2008)

5.2.5. Determinação de flavonoides totais

O percentual de flavonoides presentes nos extratos é mostrado na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Avaliação do % de flavonoides nos extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*. Os resultados são dados em % em massa de flavonoides presentes nas amostras analisadas, tendo com referência a concentração de quercetina dihidratada.

Número de identificação	Espécies de <i>Baccharis</i>	Pressão (bar)	Solvente	% de flavonóides
1	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂	0,251
2	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂	0,209
3	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	0,323
4	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	0,587
5	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Água	0,132
6	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Água	0,178
7	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂	0,068
8	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂	0,128
9	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol	0,325
10	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol	0,906
11	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Água	0,032
12	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Água	0,282

Na tabela 5.11 se pode observar que o percentual de flavonoides varia muito de acordo com a condição de extração, principalmente na *B. vulneraria* que se observa uma grande variação entre os extratos. O extrato com etanol a 200 bar apresentou uma quantidade muito maior que os demais. Este fato pode explicar a maior atividade antioxidante com uma concentração de compostos fenólicos menor, já que os flavonoides, dentre os compostos fenólicos, são os que apresentam maior atividade antioxidante devido sua estrutura (Vila, 2006). Este fato indica uma seletividade da extração supercrítica nestas condições para flavonoides presentes nesta espécie.

5.2.6. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana é apresentada na Tabela 5.12 através dos valores da concentração inibitória mínima de cada extrato.

Tabela 5.12. Concentração inibitória mínima de *B. uncinella* e *B. vulneraria* nas diferentes condições de extração. Microrganismos testados: EC – *Escherichia coli*; EF – *Enterococcus fecallis*; AS – *Staphylococcus aureus*.

Número de identificação	Espécies de Baccharis	Pressão (bar)	Solvente	Microrganismo		
				EC	EF	SA
1	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂			
2	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂			
3	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol			
4	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol			
5	<i>B. uncinella</i>	150	CO ₂ + 10% Água			
6	<i>B. uncinella</i>	200	CO ₂ + 10% Água	24mg		
7	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂			
8	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂			
9	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Etanol		12mg	24mg
10	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Etanol		3mg	12mg
11	<i>B. vulneraria</i>	150	CO ₂ + 10% Água			
12	<i>B. vulneraria</i>	200	CO ₂ + 10% Água			

Observa-se que poucos extratos apresentaram atividade inibitória aos microrganismos testados. Além disso, o valor mínimo de extrato para inibição é muito alto, com exceção do extrato a 200 bar com etanol da *B. vulneraria*. Este valor elevado inviabiliza a utilização de tais extratos como agentes antimicrobianos, pois seria necessária uma quantidade muito grande de material para inibir o crescimento dos microrganismos. O extrato da *B. vulneraria* que apresentou um valor razoavelmente baixo inibiu apenas um microrganismo, que também foge ao objetivo proposto do trabalho.

5.3. Resultados da terceira parte: Definição da espécie *B. uncinella* para dar continuidade aos ensaios de impregnação supercrítica

Com os resultados obtidos na segunda parte dos estudos, verificou-se a possibilidade de utilizar o potencial antioxidante dos extratos para conferir a atividade benéfica a matriz polimérica utilizada para impregnação. Na CCD revelada com DPPH para ambas às espécies, *B. vulneraria* e *B. uncinella*, observou-se a

possibilidade de que quando separados os compostos pudessem apresentar uma atividade antioxidante mais expressiva do que os extratos brutos. A terceira parte dos estudos foi focada na investigação desta possibilidade. O fracionamento dos extratos foi realizado e as frações com maiores atividades antioxidantes foram identificadas. Após esta etapa, a impregnação da fração com melhor resultado foi realizada e as análises de quantificação do material impregnado e avaliação da atividade antioxidante após a impregnação foram conduzidas.

Um dos objetivos iniciais do trabalho era selecionar apenas uma espécie para dar prosseguimento aos testes de impregnação. Analisando os resultados da segunda parte, observa-se que o extrato de *B. vulneraria* a 200 bar utilizando etanol como cossolvente apresentou melhores resultados de atividade antioxidante e concentração de flavonoides em relação aos demais. Apesar dos melhores resultados apresentados por este extrato, ainda assim optou-se por utilizar a *B. uncinella* para dar continuidade aos estudos de impregnação.

Dois fatos embasaram a escolha desta espécie, primeiramente devido a maior disponibilidade de material vegetal por ser uma espécie de crescimento espontâneo e com maior abundância na região sul do Brasil. A *B. vulneraria*, além da menor disponibilidade, não apresentou resultado visualmente diferente em relação à *B. uncinella* na CCD revelada com DPPH que mostrou qualitativamente a atividade antioxidante do extrato fracionado (Figura 5.6). Então, como o fracionamento necessitava de uma maior quantidade de extrato, devido ao tamanho da coluna, e o objetivo foi separar frações com maiores atividades antioxidantes, optou-se pelo uso da *B. uncinella*.

A escolha da condição de extração também foi baseada na CCD da *B. uncinella* revelado com DPPH (Figura 5.6), que mostra um resultado qualitativo mais expressivo nos extratos obtidos com etanol como cossolvente em ambas as pressões. A condição de extração escolhida foi a que utiliza etanol como cossolvente nas duas pressões, 150 e 200 bar. Os extratos de ambas as pressões foram misturados após a extração, isso com o objetivo de aumentar a massa de material para dar prosseguimento aos experimentos de fracionamento e impregnação. Optou-se por realizar as extrações nas duas pressões e depois

misturá-los e não realizar apenas uma extração a uma pressão com maior massa de planta. Isto se deve ao fato de que cada pressão é seletiva nos compostos extraídos, o que foi extraído a 150 bar pode não ser extraído com 200 bar e vice-versa. Esta afirmativa pode ser observada também na CCD revelada com DPPH destes extratos (Figura 5.6).

A escolha pela atividade antioxidante como característica benéfica a ser conferida à matriz polimérica foi embasada em estudos que relacionam atividade antioxidante com propriedades cicatrizantes (Altiok et al., 2010; Singh et al., 2006; Gopinath et al., 2004; Reddy et al., 2008; Gomathi et al., 2003; Steenkamp et al., 2004; Florim, 2013). Como a matriz polimérica escolhida foram fios de sutura, espera-se que os extratos ou frações quando impregnadas, confirmem a este uma ação aceleradora no processo de cicatrização do ferimento ou incisão onde for aplicado. Esta ação já foi demonstrada em estudos com a colagem de células tronco ao longo do fio e apresentou êxito na sua aplicação (Volpe, 2013).

5.3.1. Fracionamento

Conforme escrito anteriormente, os fracionamentos foram realizados na Espanha, no *Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC) – Instituto de Produtos Naturais (IPNA)* – nas Ilhas Canárias. A metodologia utilizada foi baseada nos resultados da CCD realizada previamente para os extratos de *B. uncinella* a 150 e 200 bar extraídas com etanol como solvente. Observou-se que as frações com maior atividade antioxidante eram as frações que ficavam mais retidas na sílica, ou seja, as frações mais polares. Utilizou-se então eluentes com maior polaridade a fim de separar tais frações. A Figura 5.8 mostra o processo de fracionamento em diversas etapas.

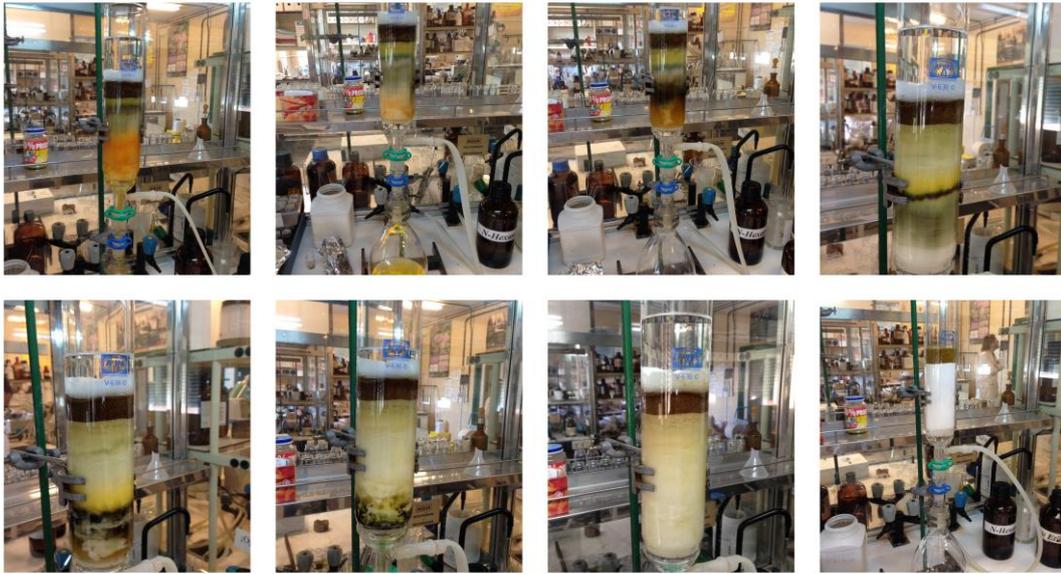


Figura 5.8. Fracionamento em coluna do extrato bruto de *B. uncinella*.

Neste fracionamento, chamado como fracionamento primário, obteve-se 06 frações. A Figura 5.9 mostra a CCD as frações obtidas comparadas com o extrato bruto, reveladas com vanilina e DPPH.

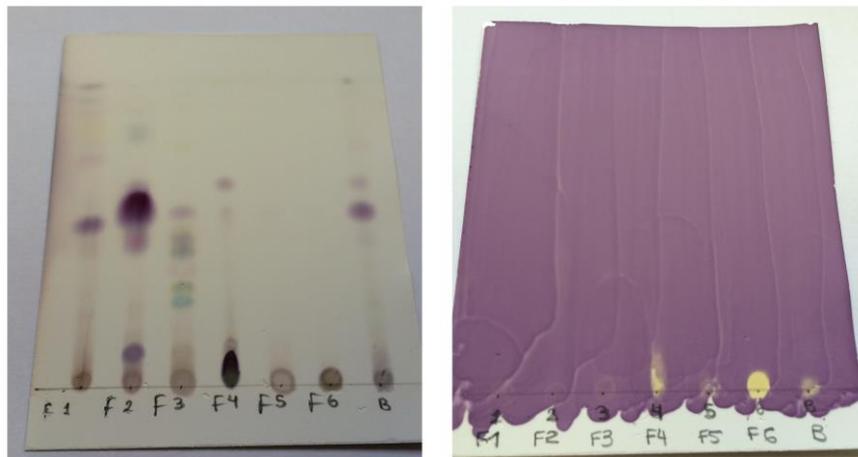


Figura 5.9. CCD comparativa entre o extrato bruto de *B. uncinella* e as frações obtidas no fracionamento primário revelados com vanilina sulfúrica e DPPH. As identificações F1 a F6 referem-se as seis frações obtidas no fracionamento primário, a identificação B refere-se ao extrato bruto.

5.3.2. Atividade antioxidante das frações

Todas as frações obtidas foram testadas para atividade antioxidante conforme metodologia utilizada anteriormente. A Tabela 5.13 mostra os resultados e o comparativo com o extrato bruto, juntamente com o resultado da atividade antioxidante da quercetina que foi utilizada como padrão de referência.

Tabela 5.13. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH para o extrato bruto e suas respectivas frações.

Extrato	% Atividade antioxidante
Bruto	86,4
F1	9,52
F2	5,56
F3	12,11
F4	5,95
F5	19,84
F6	90,48
Quercetina	87,88

Na Tabela 5.13 pode-se observar que a Fração 06 apresenta maior atividade antioxidante em relação as demais frações. Este valor é maior ao valor encontrado para a quercetina, uma referência de padrão de antioxidantes. A quercetina pertence à classe dos flavonoides e é o composto mais abundante desta classe na natureza, cerca de 95% dos flavonoides ingeridos na dieta dos seres humanos (Behling et al., 2004; Rice-Evans et al., 1997). Devido a este resultado, a Fração 06 foi escolhida para dar continuidade aos ensaios de impregnação supercrítica.

5.3.3. Impregnação supercrítica – análises de quantificação de material impregnado

Tendo a Fração 06 sido escolhida para a impregnação, os experimentos de extração supercrítica foram realizados seguindo a metodologia expressa no item 4.10, utilizando CO₂ no estado supercrítico como solvente. A escolha das condições de impregnação baseou-se nas condições pressão de extração do extrato bruto, ou

seja, 150 e 200 bar. Tais condições foram escolhidas porque nestas pressões sabe-se que os extratos obtidos são solúveis no CO₂, já que foram extraídos nestas condições. A única modificação foi com relação à temperatura, de 40 °C na impregnação e 60 °C nas extrações. Essa modificação se deve a limitação do equipamento de impregnação, que possui um limite no sensor de pressão que não pode ultrapassar 40 °C.

As amostras que passaram pelo processo de impregnação foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura, no Centro de Microscopia da PUCRS. A Figura 5.10 mostra as imagens do fio antes e após a impregnação.

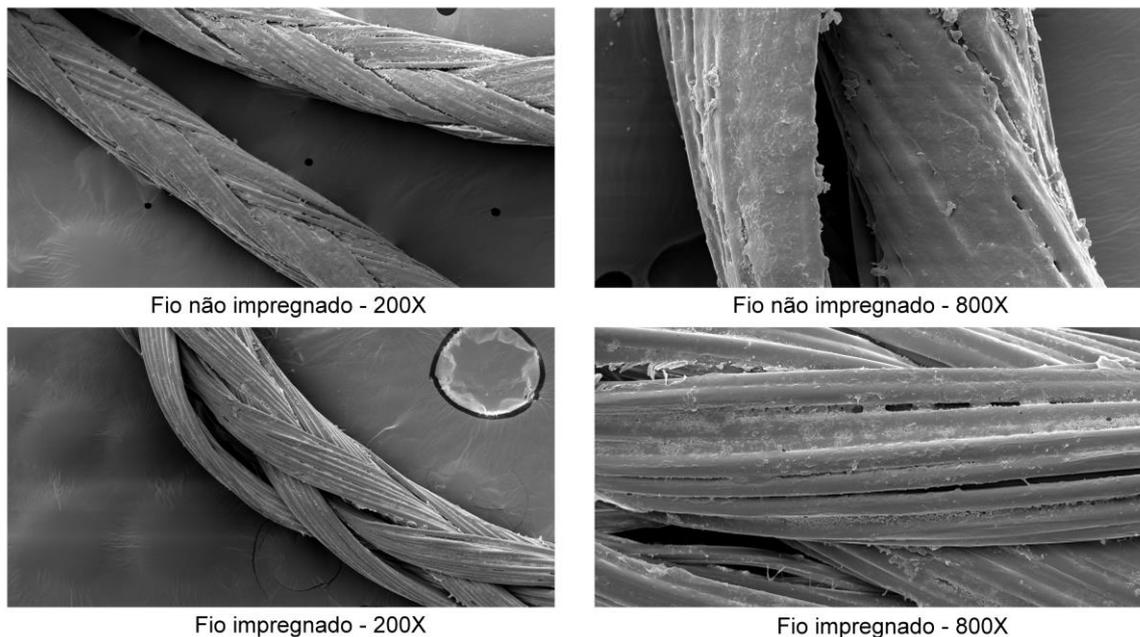


Figura 5.10. Imagens do fio antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.

Nas imagens acima se pode observar que o fio antes de ser impregnado apresenta crostas de algum material no qual o impregnado não apresenta. Este material é o estearato de cálcio, uma proteção colocada no fio para auxiliar no deslizamento durante o procedimento de sutura. Essa informação consta na recomendação de uso do fio. Realizou-se um procedimento de remoção do estearato com um solvente orgânico, a acetona (Merck). Este procedimento foi realizado para deixar o fio ao natural para o processo de impregnação, buscando

alguma alteração nas imagens após a impregnação. Na Figura 5.11 é mostrado o fio tratado previamente com acetona e após a impregnação.

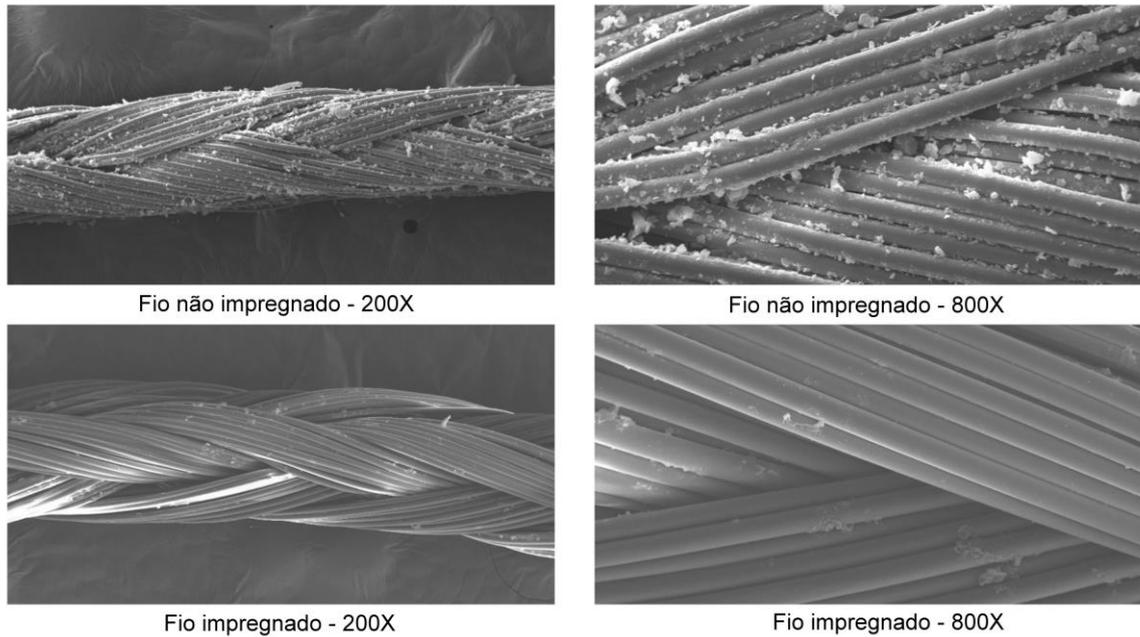


Figura 5.11. Imagens do fio tratado com acetona, antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.

As imagens geradas na Figura 5.11 permitem observar que a acetona remove o estearato de cálcio. No fio com pré-tratamento, antes da impregnação, os depósitos de estearato aparecem em menor quantidade quando comparado com o fio sem pré-tratamento, e após o procedimento de impregnação tal tendência também é verificada.

Como foi observado, após o processo de impregnação, com o fio pré-tratado ou não, as imagens parecem estar mais límpidas, dando a impressão de que o processo com CO_2 supercrítico solubiliza o estearato de cálcio juntamente com o material impregnado. Em função destes resultados, procedeu-se um pré-tratamento somente com CO_2 antes da impregnação, na tentativa de extrair o estearato do fio e poder visualizar somente a amostra impregnada. Na Figura 5.12 são apresentados os resultados deste último pré-tratamento.

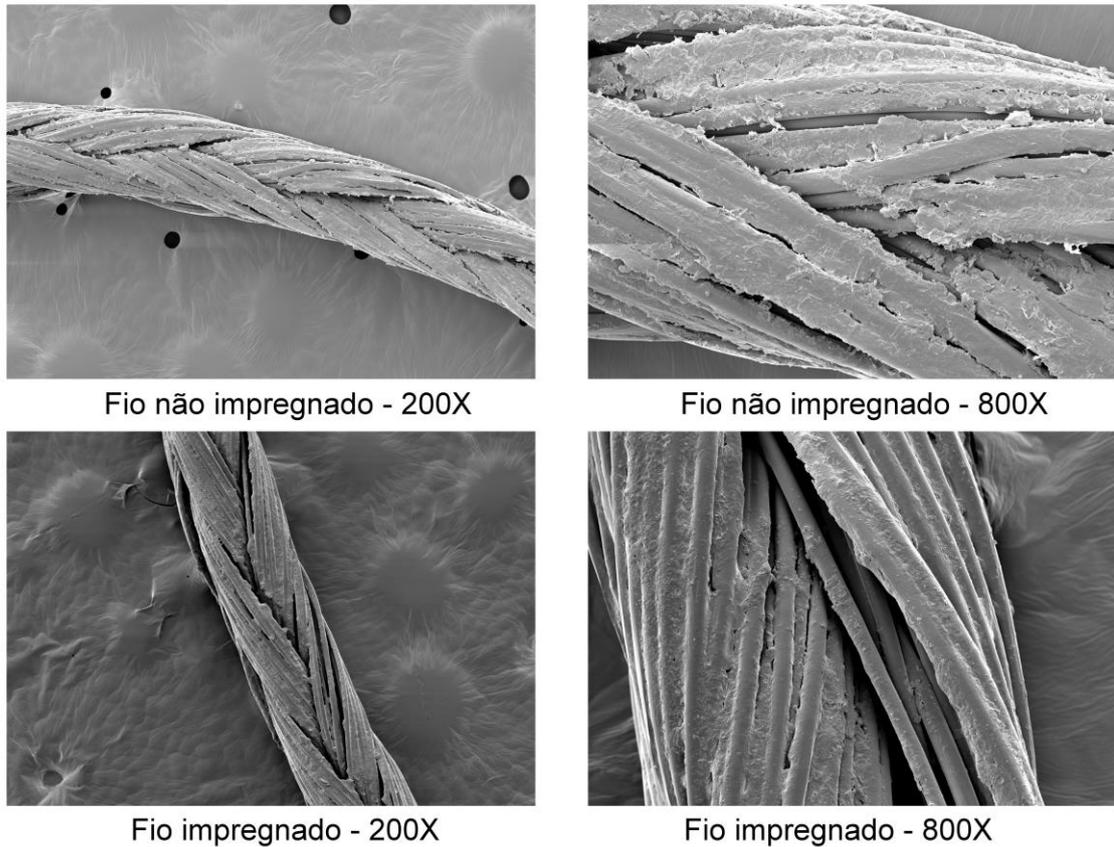


Figura 5.12. Imagens do fio tratado com CO₂, antes e após o processo de impregnação a 200 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.

É possível observar que os resultados não são diferentes dos obtidos para a impregnação sem o pré-tratamento. Ao mesmo tempo se observa uma diferença em relação aos resultados obtidos quando se utilizou acetona no pré-tratamento, pois neste caso o fio de sutura, antes e após a impregnação, apresenta uma aparência mais límpida. O fato de remover o depósito de estearato cálcio não é indicado, pois o mesmo tem função definida no uso do fio de sutura e os pré-tratamentos só foram utilizados com o intuito de elucidar como se dá a impregnação da amostra no fio.

Em função dos resultados das microscopias dos fios de sutura impregnados com a Fração 06 a 200 bar, onde é demonstrada a influência do uso de acetona no pré-tratamento no processo, assim como a pouca influência de pré-tratamento com CO₂, definiu-se realizar a impregnação a 150 bar somente para fios de sutura sem pré-tratamento (Figura 5.13), já que a remoção do estearato de cálcio não é indicada. Esta nova condição foi utilizada para que houvesse uma comparação entre

diferentes condições de impregnação, porém ainda dentro das condições definidas pelo processo de extração.

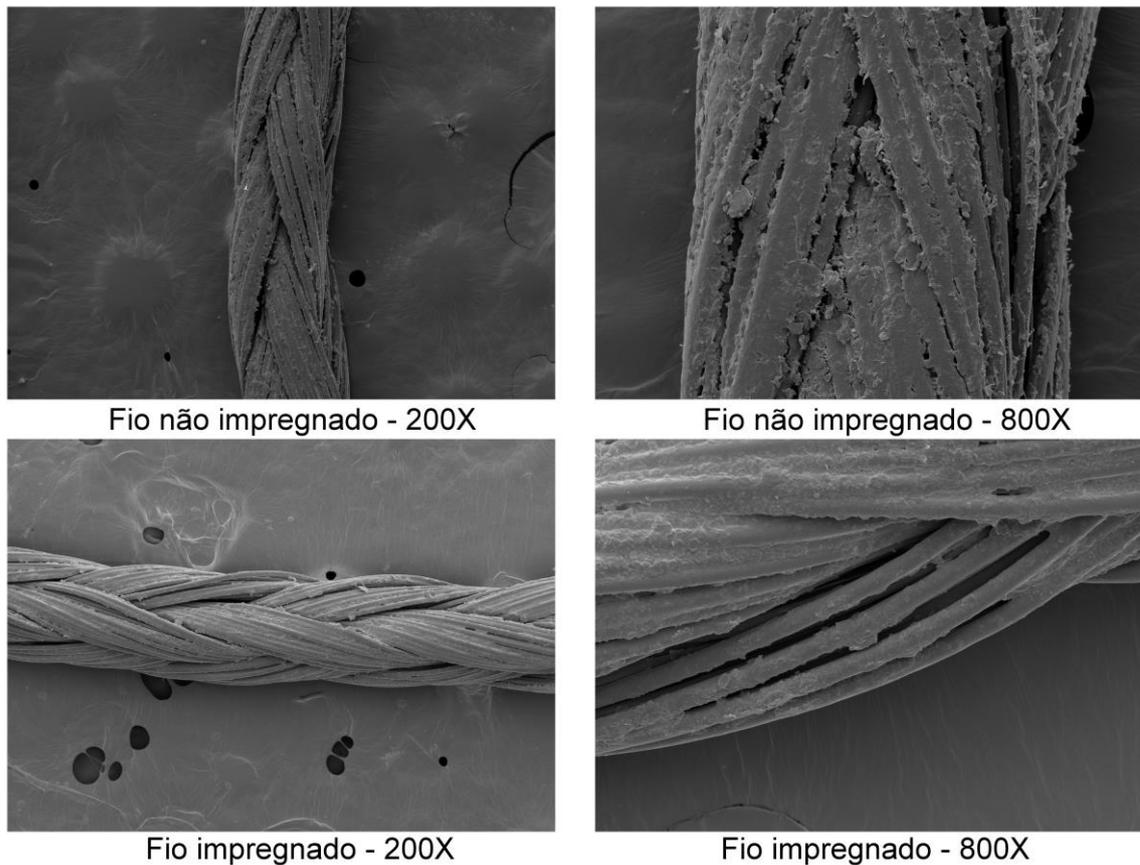


Figura 5.13. Imagens do fio sem pré-tratamento antes e após o processo de impregnação a 150 bar. O aumento utilizado nas imagens é de 200 e 800X.

Nas imagens do fio impregnado a 150 bar não se observa diferença em relação àquelas dos fios impregnados a 200 bar. A característica mais límpida do fio, com uma cobertura mais uniforme, foi mantida após a impregnação. Através das imagens não se pode observar uma diferença em relação às duas pressões de impregnação, as análises qualitativas de material impregnado é que podem mostrar alguma diferença.

Outra observação importante de ser feita é quanto ao aumento máximo das imagens. Em todas as tentativas de se obter aumentos maiores que 800X houve um início de degradação da amostra, como se estivessem queimando. Este pode ser um fator limitante quanto às dimensões do material impregnado, já que a escala

para aumentos de 800X é de 6,8 cm que equivalem a 200 μm , ou seja, não está em escala nanométrica. Este pode ser um dos fatores pelos quais não se tenha observado nas imagens o material impregnado. Tal afirmativa só poderá ser feita após trabalhos mais aprofundados nesta questão.

5.3.4. Análise de liberação do material impregnado - quantificação

As análises de quantificação do material foram conduzidas conforme apresentado no item 4.11. Uma curva de calibração (Figura 4.11 do item 4.11) da Fração 06 do extrato bruto de *B. uncinella* a 150 e 200 bar, utilizada nas impregnações, foi construída com auxílio do espectrofotômetro, utilizando o tampão PBS como solvente. A escolha desta metodologia foi baseada na característica da amostra, que apresenta coloração intensa, sendo facilmente detectada pelo espectrofotômetro. A escolha do comprimento de onda está relacionada com o método de análise por CLAE dos extratos obtidos na primeira parte do trabalho, que utiliza um detector UV com comprimento de onda de 345 nm. Esta curva de calibração relaciona a concentração de amostra com a absorbância lida no espectrofotômetro para cada concentração.

Para melhor avaliar o processo de impregnação, nesta etapa de quantificação e liberação do material impregnado, foram analisados os fios impregnados a 150 e 200 bar para que uma comparação entre uma melhor condição de impregnação pudesse ser observada. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os valores médios são apresentados na Tabela 5.14. O tempo de imersão do fio impregnado para leitura da absorbância definido de duas formas, primeiramente leu-se após uma imersão rápida de 05 minutos. Os mesmos fios foram deixados em imersão por 07 e 15 dias acondicionados em estufa a 36 °C, simulando a temperatura do corpo humano.

Tabela 5.14. Quantificação do material impregnado da Fração 06 para as condições de impregnação a 150 e 200 bar a 40 °C. Os resultados são apresentados em massa de material impregnado em fragmentos de 03 cm de fio em imersão por 05 min, 07 e 15 dias em PBS, juntamente com os respectivos desvios padrão.

Condição de impregnação	Tempo de imersão antes da leitura	Massa de amostra impregnada (μg) / \pm desvio padrão
150 bar	05 minutos	2,44 / $\pm 0,32$
	07 dias	2,44 / $\pm 0,27$
	15 dias	2,56 / $\pm 1,03$
200 bar	05 minutos	1,19 / $\pm 0,18$
	07 dias	2,81 / $\pm 1,30$
	15 dias	2,99 / $\pm 0,79$

Analisando os resultados da Tabela 5.14, observa-se que o fio impregnado a 150 bar apresenta um valor de massa impregnada um pouco maior em relação a impregnação a 200 bar, considerando a imersão por 05 minutos. Este fato pode estar associado a maior solubilidade dos compostos da Fração 06 no CO₂ supercrítico a esta pressão. Já nas análises com tempo de imersão de 07 e 15 dias, os valores a 150 bar não variam muito em relação à imersão de 05 minutos, o que não acontece com a pressão de 200 bar, que tem um aumento de 39,7% em 15 dias em relação à imersão de 05 minutos. O fato de a massa impregnada aumentar não necessariamente pode estar associado à liberação prolongada da amostra impregnada, mas sim a degradação do fio no PBS, já que se trata de um fio de sutura bioabsorvível. A degradação do fio em PBS se dá completamente em 08 semanas, mas em 02 semanas este processo já se inicia (Lee et al., 2013).

A análise de quantificação de material impregnado no fio pré-tratado com acetona é mostrada na Tabela 5.15.

A impregnação do fio pré-tratado com acetona só foi realizada a 200 bar. O valor encontrado de 1,41 μg não difere muito daquele encontrado para esta pressão sem pré-tratamento, de 1,19 μg . Este resultado é um indicativo de que a impregnação se dá essencialmente no fio, e não na cobertura de estearato de cálcio.

Tabela 5.15. Quantificação do material impregnado da Fração 06 para as condições de impregnação a 200 bar a 40 °C para o fio pré-tratado com acetona. Os resultados são apresentados em massa de material impregnado em fragmentos de 3 cm de fio em imersão por 05 min em PBS, juntamente com o respectivo desvio padrão.

Pré-tratamento	Condição de impregnação	Tempo de imersão antes da leitura	Massa de amostra impregnada (μg) / \pm desvio padrão
Acetona	200 bar	05 minutos	1,41 / $\pm 0,39$

5.3.5. Atividade antioxidante do fio impregnado

Para avaliar a atividade antioxidante do fio, o método de captura do radical livre DPPH foi utilizado, assim como para os extratos e frações obtidos. A diferença, é que os resultados foram avaliados em percentual de sequestro do radical livre DPPH, e não em concentração eficiente, como no caso dos extratos. Isso ocorre porque no fio, não interessa o quanto de material é necessário para consumir metade da concentração inicial de DPPH na solução, mas o quanto desse radical foi consumido. Novamente os fios impregnados a 150 bar e 200 bar a 40 °C foram avaliados. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os valores médios são apresentados na Tabela 5.16.

Assim como nas análises de quantificação do material impregnado, a atividade antioxidante do fio impregnado a 150 bar foi maior em relação ao fio de 200 bar. Um possível motivo para esta condição ter apresentado melhores resultados é que os compostos impregnados da Fração 06 podem ser mais sensíveis à variação da pressão durante o processo de expansão e precipitam em maior quantidade na condição de 150 bar. Para 200 bar, uma parte do extrato pode se manter solúvel durante a etapa de expansão (diminuição da pressão) e uma parte pode ser removida junto com o CO₂ e eliminado do vaso de impregnação.

Tabela 5.16. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SR) para os fragmentos de fio de sutura impregnados a 150 e 200 bar a 40 °C com leituras realizadas em diferentes tempos de imersão do fio na solução de DPPH. Os desvios padrão também são apresentados. O “-” indicado no desvio padrão de algumas análises significa que a leitura não teve desvio por tratar-se de uma medida única. As demais análises foram realizadas em triplicata.

Condição de impregnação	Tempo de imersão	%SR em fragmentos de 3 cm de fio (μg) / \pm desvio padrão
150 bar	05 minutos	16,05 / \pm 0,78
	07 dias	21,84 / -
	15 dias	29,77 / -
200 bar	05 minutos	11,15 / \pm 0,79
	07 dias	34,49 / -
	15 dias	39,89 / -

As leituras realizadas em 07 dias e 15 dias mostram que o percentual de sequestro dos radicais livres continua aumentando, ou seja, a atividade antioxidante se mantém ativa durante este período. O DPPH é um reagente muito sensível e instável, e por isso o fato de ter ficado tantos dias parado pode ter feito com que o consumo do radical continuasse. Porém, o valor em percentual vem de uma equação que corrige este consumo natural com a leitura de um controle sem amostra. Então, mesmo que o consumo natural estivesse agindo, este efeito é compensado no cálculo, o que indica que o material impregnado mantém sua atividade antioxidante. Estando a atividade antioxidante relacionada com propriedades cicatrizantes, isso significa dizer que o fio de sutura manteria sua característica pelo tempo necessário ao período de cicatrização. Análises com mais tempo de imersão do fio na solução de DPPH necessitam ser realizadas para determinar qual o período de atividade do material impregnado.

A análise de atividade antioxidante do fio de sutura pré-tratado com acetona e impregnado a 200 bar é mostrado na Tabela 5.17. As leituras foram feitas apenas para 05 minutos de imersão. Para 07 e 15 dias não foram realizadas devido o pré-tratamento não ser algo vantajoso para a utilização do fio, visto que retira sua proteção natural. As análises para o fio com pré-tratamento do foram realizada

spara mostrar que a impregnação se dá preferencialmente no fio e não na cobertura de estearato de cálcio, conforme dito anteriormente.

Tabela 5.17. Valores em percentual de sequestro do radical livre DPPH (%SR) para os fragmentos de fio de sutura pré-tratados com acetona e impregnados a 200 bar e 40 °C com leituras realizadas em diferentes tempos de imersão do fio na solução de DPPH. O desvio padrão também é apresentado. As análises foram realizadas em triplicata.

Pré-tratamento	Condição de impregnação	Tempo de imersão	%SR em fragmentos de 03 cm de fio (μg) / \pm desvio padrão
Acetona	200 bar	05 minutos	8,97 / $\pm 0,52$

O valor da atividade antioxidante para o fio de sutura com pré-tratamento em acetona e impregnado a 200 bar mostra um valor um pouco abaixo daquele encontrado para o fio impregnado nesta mesma pressão sem pré-tratamento. Esse resultado pode ter sofrido alguma interferência durante a análise, por que não está de acordo com o resultado encontrado para a quantificação do material impregnado nos fios com as mesmas condições. Outra hipótese é a impregnação não homogênea do material no fio, ou seja, em alguns fragmentos pode ter mais material impregnado do que em outros. Este fato justificaria os desvios padrão um pouco altos encontrados em algumas análises tanto na quantificação de material impregnado quando na análise de atividade antioxidante.

5.4 Considerações finais

Este trabalho foi conduzido em três distintas etapas, com o objetivo de selecionar uma espécie do gênero *Baccharis* e impregnar seu extrato em uma matriz polimérica com o intuito de conferir a esta matriz uma característica benéfica ao seu uso. O início se deu com o estudo de 06 espécies deste gênero (*Baccharis microdonta*, *B. megapotamica*, *B. vulneraria*, *B. usteri*, *B. trimera*, *B. tridentata*), onde foram retirados dados de rendimento de extrato obtido por extração supercrítica, perfis cromatográficos e atividades biológicas. Estes resultados serviram de base para a seleção da espécie que apresentasse melhores resultados em relação à atividade biológica.

Fruto dos resultados da primeira parte do trabalho selecionou-se a *B. vulneraria* por ter apresentado resultados quanto às atividades biológicas superiores às demais espécies estudadas, principalmente no que se refere ao potencial antioxidante. As análises para a segunda etapa do trabalho foram conduzidas com *B. vulneraria* e com *B. uncinella*. Esta última espécie não havia sido cogitada inicialmente para se trabalhar devido ao grande número de publicações sobre a mesma, porém por se tratar de uma espécie com grande disponibilidade na região sul do Brasil, optou-se por incluí-la no estudo.

Os resultados da segunda etapa do trabalho demonstraram que a espécie *B. vulneraria* foi mais sensível quanto ao uso do cossolvente na extração do que quando comparada a *B. uncinella*. Tal característica é verificada através dos resultados das atividades biológicas, principalmente da atividade antioxidante, que mostra que a extração utilizando etanol a 10% como cossolvente, 60°C e 200 bar foi mais seletiva a determinados compostos que apresentam um potencial antioxidante elevado. A CE₅₀ deste extrato foi significativamente maior do que todos os demais encontrados para os outros extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*, no valor de 71,98 g de extrato por g de DPPH.

Mesmo com resultados positivos em relação à atividade antioxidante, optou-se por não utilizar *B. vulneraria* para a terceira etapa de estudos. A espécie selecionada foi *B. uncinella* em função da disponibilidade da mesma, pois foi exigida uma quantidade significativa de extrato para as etapas de fracionamento. Além disso, as análises de CCD reveladas com DPPH para os extratos de *B. uncinella* extraídos a 150 bar e 200 bar a 60°C com etanol como cossolvente apresentaram um potencial antioxidante elevado de algumas frações. Estes resultados foram responsáveis pela definição da propriedade atividade antioxidante como característica benéfica a ser incorporada à matriz polimérica. Estudos relacionam a atividade antioxidante com propriedades cicatrizantes (Gomathi et al., 2003; Gopinath et al., 2004; Steenkamp et al., 2004; Singh et al., 2006; Reddy et al., 2008; Altioek et al., 2010; Florim, 2013), o que justifica a utilização de tal propriedade aplicada aos fios de sutura. Isto implica em um material que acelera o processo de cicatrização no local onde fosse aplicado.

A terceira etapa deste trabalho iniciou com o fracionamento dos extratos de *B. uncinella* a 150 e 200 bar com cossolvente etanol a 10%, com o objetivo de separar as frações que demonstraram uma atividade antioxidante forte na CCD revelada com DPPH destes extratos. Obtiveram-se 06 frações, dentre as quais a última apresentou um resultado de ação antioxidante superior à quercetina, um flavonoide com alto poder antioxidante. Com base neste resultado, esta fração foi escolhida para dar continuidade aos estudos e ensaios de impregnação.

Os ensaios de impregnação foram realizados em duas diferentes pressões, 150 bar e 200 bar, para que pudesse ser identificada a melhor condição de impregnação. A escolha das condições para impregnação foi baseada nas condições utilizadas na extração, visto que nestas pressões sabe-se que os extratos são solúveis no CO₂ supercrítico. A metodologia de quantificação e liberação do material impregnado, assim como a verificação da atividade antioxidante no fio após a impregnação, teve que ser desenvolvida e adaptada para o tipo e quantidade de material que se estava trabalhando. Análises de imagem com o microscópio de varredura eletrônica também foram realizadas, porém os resultados não foram conclusivos. As imagens antes e após a impregnação não mostraram com clareza de que forma e como acontece a impregnação. Uma possível causa de não se conseguir visualizar o material impregnado é devido ao aumento máximo que pode ser utilizado nas imagens, de 800X, devido a limitações da amostra. Este aumento permite enxergar dimensões em uma escala de 200 µm, e se a impregnação ocorrer em escalas menores que essa o material não poderá ser visualizado.

A hipótese de que a deposição do material impregnado se dá em escalas muito pequenas foi corroborada nos resultados de quantificação e liberação da amostra impregnada, assim como nos ensaios de atividade antioxidante. Para a pressão de impregnação de 150 bar, obteve-se um resultado de material impregnado de 2,44 µg para cada 03 cm de fio e um percentual de sequestro do radical DPPH de 16,05%. Para a pressão de 200 bar, os valores foram 1,19 µg de material impregnado para 03 cm de fio e um percentual antioxidante de 11,15%. Observa-se que os valores foram um pouco maiores para a pressão de 150 bar, o que pode ser justificado pelo fato de que os compostos presentes na Fração 06 são mais solúveis no CO₂ a esta pressão e também podem ser mais sensíveis à

variação da pressão durante o processo de expansão e precipitarem em maior quantidade na condição de 150 bar. Para 200 bar, uma parte do extrato pode ter se mantido solúvel durante a etapa de expansão (diminuição da pressão) e uma parte pode ter sido removida junto com o CO₂ e eliminado da célula de impregnação.

6. CONCLUSÕES

Avaliando todas as etapas deste trabalho e os respectivos resultados, pode-se concluir que o estudo sistemático com plantas nativas, com 07 diferentes espécies do gênero *Baccharis*, passando pela avaliação das propriedades dos extratos e frações, pela seleção de espécies com atividades biológicas, por novas etapas de extração e de fracionamento com novos ensaios de avaliação de atividade biológica culminando na seleção de um extrato e aplicação do mesmo na forma de um produto é um caminho indicado para a busca de aplicação o desenvolvimento da cadeia produtiva vinculada aos produtos naturais. Especificamente para este trabalho, foi possível concluir que uma fração do extrato supercrítico de *B. uncinella* apresenta um forte potencial antioxidante que justifique a incorporação do mesmo em fios de sutura, potencializando a cicatrização no local onde for aplicado. O uso dos fios de sutura impregnados com compostos que agreguem características benéficas ao seu uso se mostra viável, como mostrado em alguns estudos. O uso de agentes que potencializem a cicatrização já foi demonstrado com células tronco (Volpe, 2013), mas não foi relatado aplicação de extratos naturais de espécies nativas, enfatizando o caráter inovador e sustentável deste trabalho.

Do estudo inicial das 06 espécies de *Baccharis*, observou-se um potencial antioxidante de alguns extratos e a relação desta propriedade com as condições de extração. Os extratos obtidos utilizando etanol a 10% como cossolvente apresentaram melhores resultados quanto a rendimento e atividade antioxidante. Pode-se concluir que o uso desse cossolvente auxilia na seletividade da extração de compostos com tal propriedade.

Com base nos estudos iniciais, *B. vulneraria* foi escolhida para dar continuidade aos estudos e foi incluída a *B. uncinella* no trabalho. Nesta etapa, os

resultados de rendimentos de massa de extrato obtidos também foram melhores nas condições utilizando cossolvente, tanto etanol como água. A pressão de 150 bar foi a melhor condição de pressão independentemente do uso ou não de cossolvente. Isso se deve as características de solubilidade dos compostos presentes dos extratos obtidos nesta pressão. Nas análises de atividades biológicas, os extratos obtidos utilizando etanol como cossolvente apresentaram melhores resultados em relação à concentração de compostos fenólicos e flavonoides, o que indica uma seletividade desta condição de extração para estas classes de compostos, já demonstrada nos resultados iniciais. Para a ação antioxidante, apenas um extrato, de *B. vulneraria* a 200 bar com etanol apresentou valores significativamente diferentes aos encontrados para os demais extratos, indicando um potencial de utilização. Quanto à atividade antimicrobiana, nenhum extrato demonstrou ser um agente antimicrobiano em potencial.

Com base nos resultados das cromatografias em camada delgada, observa-se uma grande quantidade de compostos fenólicos para grande parte das espécies estudadas, indicados pelo uso dos reveladores. Especificamente para os extratos de *B. vulneraria* e *B. uncinella*, observa-se uma grande quantidade de compostos com atividade antioxidante forte quando eluídos, indicados pelo uso do revelador específico de DPPH. Optou-se por realizar os experimentos de fracionamento com o extrato de *B. uncinella* a 150 bar e 200 bar, devido a maior disponibilidade de matéria prima e com base nos resultados obtidos anteriormente nestas condições de extração. O fracionamento deste extrato bruto resultou na separação da Fração 06, com atividade antioxidante superior a quercetina, um composto reconhecido por seu potencial antioxidante e muito comum na natureza. Esta fração foi selecionada para os testes de impregnação supercrítica na matriz polimérica, fios de sutura de PLGA, e a ação antioxidante forte da fração permitiu a aplicação no fio com o intuito de conferir propriedades cicatrizantes ao seu uso.

Dos experimentos de impregnação supercrítica, observou-se nas análises de quantificação que a incorporação da amostra ocorre, porém nas análises de imagem não se pode observar como se dá a impregnação. A atividade antioxidante da Fração 06 se mantém no fio após a impregnação e a condição de impregnação a 150 bar se mostrou superior em relação à quantidade de material impregnado e

atividade antioxidante, em torno de 50% mais massa de amostra impregnada e 30% mais atividade antioxidante do que a condição de impregnação a 200 bar.

7. PROPOSTA DE AÇÕES FUTURAS

Como continuidade aos trabalhos iniciados neste trabalho, sugere-se algumas análises mais específicas com relação à composição dos compostos majoritários da Fração 06 do extrato de *B. uncinella*, utilizando CLAE/EM ou RMN. Esta ação serve para elucidar qual a classe dos compostos presentes nesta fração e até a purificação de um composto majoritário.

Para que os estudos com a *B. vulneraria* possam ser aprofundados, já que esta espécie que apresentou resultados satisfatórios em relação a atividade antioxidante, sugere-se buscar regiões com maior disponibilidade desta planta e empregar a metodologia completa utilizada para a *B. uncinella* para comparar os resultados obtidos entre as duas espécies. Além disso, o emprego de diferentes técnicas de extração para a *B. uncinella* que permitam obter extratos voláteis e extratos não voláteis, potencializando a obtenção de extratos e frações com diferentes atividades biológicas a partir da mesma matéria prima, seria uma sequencia a este estudo que investigaria todas as possibilidades e características associadas a esta planta.

Com relação aos resultados da impregnação, sugere-se a utilização de outras técnicas microscópicas para avaliar a dimensão do extrato impregnado, assim como avaliar se este é impregnado superficialmente ou distribuído uniformemente na massa do fio de sutura.

Por último, a investigação *in vitro* e *in vivo* do potencial cicatrizante da Fração 06, assim como o teste de aplicação e viabilidade do uso do fio de sutura impregnado com este extrato é de fundamental importância para a continuidade e concretização do que foi apresentado neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R.N., NETO, R.G., BARROS, F.M.C., CASSEL, E., VON POSER, G.L., VARGAS, R.M.F. Supercritical extraction of *Hypericum caprifoliatum* using carbon dioxide and ethanol + water as co-solvent. **Chemical Engineering and processing: Process Intensification**, v. 70, p. 95-102, 2013.

ALTIOK, D., ALTIOK, E., TIHMINLIOGLU, F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, p. 2227-2236, 2010.

BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., RIECK, L., MARQUES, M.C.A. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 93-98, 2003.

BEDINOT, C., VARGAS, R.M.F., CASSEL, E. Multi-Purpose Pilot Unit for Supercritical Fluid Extraction. In: **13th European Meeting on Supercritical Fluids**, 2011, The Hague. Anais of the 13th European Meeting on Supercritical Fluids. The Hague: Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. v. 1.

BARROS, F.M.C., SILVA, F.C., NUNES, J.M., VARGAS, R.M.F., CASSEL, E., von POSER, G.L. Supercritical extractions of phloaroglucinol and benzophenone derivatives from *Hypericum carinatum*: Quantification and mathematical modeling. **Journal Separation Science**, v. 34, p. 3107-3113, 2011.

BARROSO, M.S.T., VILLANUEVA, G., LUCAS, A.M., PEREZ, G.P., VARGAS, R.M.F., BRUM, G.W., CASSEL, E. Supercritical fluid extraction of volatiles and non-

volatiles compounds from *Schinus molle* L. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 2, p. 305-312, 2011.

BEHLING, E.B., SENDÃO, M.C., FRANCESCATO, H.D.C., ANTUNES, L.M.G, BIANCHI, M.L.P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 03, p.285-292, 2004.

BOLLER, S., SOLDI, C., MARQUES, M.C.A., SANTOS, E.P., CABRINI, D.A., PIZZOLATTI, M.G., ZAMPRONIO, A.R., OTUKI, M.F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 262-286, 2010.

BORELLA J.C., DUARTE D.P., NOVARETTI A.A.G., MENEZES JR. A., FRANÇA, S.C., RUFATO, C.B., SANTO, P.A.S., VENEZIANI, R.C.S., LOPES, N.P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. **Revista Brasileira Farmacognosia** v.16, n. 4, p. 557-561, 2006.

BRAGA, M.E.M., PATO, M.T.V., SILVA, H.S.R.C., FERREIRA, E.I., GIL, M.H., DUARTE, C.M.M., SOUSA, H.C. Supercritical solvent impregnation of ophthalmic drugs on chitosan derivates. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 44, p. 245-257, 2008.

BRAIDA, I., MATTEA, M., CARDARELLI, D. Extraction adsorption-desorption process under supercritical condition as a method to concentrate antioxidants from natural sources. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 45, p. 195-199, 2008.

BRAND-WILIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BUDEL, J.M., DUARTE, M.R., SANTOS, C.A.M., FARAGO, P.V., MATZENBACHER, N.I. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*,

Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 268-271, 2005.

BRUNETON, Jean. **Farmacognosia Fitoquímica: Plantas Medicinales**. 2º ed. Zaragoza: Acribia, 2001. 1099 p.

BRUM, G.W. **Processo de produção de erva-mate descafeinada e de micro/nanopartículas de cafeína usando dióxido de carbono supercrítico**. Porto Alegre. 2012. 118p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil

CASSEL, E.; Vargas, R.M.F; BEDINOT, C. Unidad Piloto de Extracción Supercrítica Automatizada. In: **Aplicaciones Industriales de los Taninos Vegetales: Productos y Procesos**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil, 2007, p. 95-102.

CASSEL, E, VARGAS, R.M.F., BRUN, G.W., Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais In: **Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos**. 2º ed. Porto Alegre : EDIPUCRS, 2008, p. 213-228.

CASSEL, E., VARGAS, R.M.F., BRUN, G.W., ALMEIDA, D.E., COGOI, L., FERRARO, G., FILIP, R. Supercritical fluid extraction os alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Journal of Food Engineering**, v. 100, p. 656-661, 2010.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1º ed. São Paulo: editora da UNICAMP, 2007. 456p.

CORTESI, A., ALESSI, P., KIKIC, I., KIRCHMAYER, S., VECCHIONE, F. Supercritical fluids chromatography for impregnation optimization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 19, p. 61-68, 2000.

COSTA¹, V.P., BRAGA, M.E.M., DUARTE, C.M.M., LORENZO, C.A., CONCHEIRO, A., GIL, M.H., SOUSA, H.C. Anti-glaucoma drug-loaded contact lenses prepared

using supercritical solvent impregnation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 53, p. 165-173, 2010.

COSTA², V.P., BRAGA, M.E.M., GUERRA, J.P., DUARTE, A.R.C., DUARTE, C.M.M., LEITE, E.O.B., GIL, M.H., SOUSA, H.C. Development of therapeutic contact lenses using a supercritical solvent impregnation method. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 52, p. 306–316, 2010.

DOMINGUES, R.M.A., MELO, M.M.R., NETO, C.P., SILVESTRE, A.J.D., SILVA, C.M. Measurement and modeling of supercritical fluid extraction curves of *Eucalyptus globulus* Barks: Influence of the operating conditions upon yields and extract composition. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 176-185, 2012.

DUARTE, A.R.C., SIMPLICIO, A.L., GONZÁLEZ, A.V., PATERNAULT, P.S., COIMBRA, P., GIL, M.H., SOUSA, H.C., DUARTE, C.M.M. Supercritical fluid impregnation of a biocompatible polymer for ophthalmic drug delivery. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, p. 373-377, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

FALCÃO, M.A., FIANCO, A.L.B., LUCAS, A.M., PEREIRA, M.A., TORRES, F.C., VARGAS, R.M.F., CASSEL, E. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of lemongrass essential oil. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 405-412, 2012.

FERESIN, G.E., TAPIA, A., GIMENEZ, A., RAVELO, A.G., ZACCHINO, S., SORTINO, M., SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Constituents of the Argentinian medicinal plant *Baccharis grisebachii* and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 73-80, 2003.

FLORÃO, A., BUDEL, J.M., DUARTE, M.R., MARCONDES, A., RODRIGUES, R.A.F., RODRIGUES, M.V.N., SANTOS, C.A.M., WEFFORT-SANTOS, A.M. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 561-570, 2012.

FLORIM, J.C. **Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos**. São Paulo, 2013. 36p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Brasil.

FOLIN, O., CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 73, p.424-427, 1927.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 01, p. 171-178, 2006.

GOMATHI, K., GOPINATH, D., RAFIUDDIN AHMED, M., JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. **Biomaterials**, v. 24, p. 2767-2772, 2003.

GOPINATH, D., AHMED, M.R., GOMATHI, K., CHITRA, K., SEHGAL, P.K., JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films. **Biomaterials**, v. 25, p. 1911-1917, 2004.

GRECCO, S.S., GIMENES, L., FERREIRA, M.J.P., ROMOFF, P., FAVERO, O.A., ZALEWSKI, C.A., LAGO, J.H.G. Triterpenoids and Phenolic Derivates from *Baccharis unicnella* C.DC. (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1234-1237, 2010.

HENRY-STANLEY, M.J., HESS, D.J., BARNES, A.M.T., DUNNY, G.M., WELLS, C.L. Bacterial contamination of surgical suture resembles a biofilm. **Surgical Infections**, v. 11, n. 5, p. 433-439, 2010.

JANUÁRIO, A.H., SANTOS, S.L., MARCUSSI, S., MAZZI, M.V., PIETRO, R.C.L.R., SATO, D.N., ELLENA, J., SAMPAIO, S.V., FRANÇA, S.C., SOARES, A.M. Neoclerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 150, p. 434-438, 2005.

KUMAZAWA S., YONEDA S., SHIBATA M., KANAEDA I., HAMASAKA J., NAKAYAMA T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian Propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 6, p. 740-742, 2003.

LEE, H.S., PARK, S.H., LEE, J.H., JEONG, B.Y., AHN, S.K., CHOI, Y.M., CHOI, D.J., CHANG, J.H. Antimicrobial and biodegradable PLGA medical sutures with natural grapefruit seed extracts. **Materials Letters**, v. 95, p. 40-43, 2013.

LIMA, F.A.F., SANTOS, O.A.A., PINHEIRO, N. Impregnação de filmes de compósito de policarbonato (PC) e sílica-sel (Si) com corante fotocromico em fluido supercrítico. **Acta Scientiarum**, v. 32, n. 1, p. 69-74, 2010.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**. 2º ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LUCAS, S., GONZALEZ, E., CALVO, M.P. B., PALENCIA, C., ALONSO E., COCERO, M.J. Supercritical CO₂ impregnation of *Radiata* pine with organic fungicides Effect of operating conditions and two-parameters modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 462–469, 2007.

LUCAS, A.M. **Estudo comparativo de extratos voláteis de Eucaliptos geneticamente modificados e não geneticamente modificados**. Porto Alegre. 2011. 76p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

MARÇO, P.H., POPPI, R.J. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218-1223, 2008.

MONTANHA, J.J., MOELLERKE, P., BORDIGNON, S.A.L., SCHENKEL, E.P., ROEHE, P.M. Antiviral activity of brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 2, p. 183-186, 2004.

MUNICIO, M.D., MONTILLA, A., HERRERO, H., OLANO, A., IBÁÑEZ, E. Supercritical CO₂ impregnation of lactulose on chitosan: A comparison between scaffolds and microspheres form. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 57, p. 73-79, 2011.

NOLDIN, V.F., FILHO, V.C., MONACHE, F.D., BENASSI, J.C., CHRISTMANN, I.L., PEDROSA, R.C., YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* cultivadas no Brasil. **Química Nova**, v. 26, n. 03, p. 331-334, 2003.

OLIVEIRA, S.Q., DAL-PIZZOL, F., GOSMANN, G., GUILLAUME, D., MOREIRA, J.C.F., SCHENKEL, E.P. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidante activity. **Free Radical Research**, v. 37, p. 555-559, 2003.

OLIVEIRA¹, A.C.P., ENDRINGER, D.C., AMORIM, L.A.S., BRANDÃO, M.G.L., COELHO, M.M. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice . **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 465-469, 2005.

OLIVEIRA², S.Q., TRENTIN, V.H., KAPPEL, V.D., BARELLI, C., GOSMANN, G., REGINATTO, F.H. Sreening of antibacterial activity of South brazilian *Baccharis* species. **Phamaceutical Biology**, v. 43, n. 5, p. 434-438, 2005.

OLIVEIRA, S.Q., BARBON, G., GOSMANN, G. Differentiation of South Brazilian Baccharis Species by TLC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 2603-2609, 2006.

PEREIRA, M.A.A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**. Porto Alegre. 2010. 60p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

PIANTINO, C.R., AQUINO, F.W.B., FOLLEGATTI-ROMERO, L.A., CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from Baccharis dracunculifolia. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.

REDDY, B.S.R., REDDY, K.K., NAIDU, V.G.M., MADHUSUDHANA, K., AGWANE, S.B., RAMAKRISHNA, S., DIWAN, P.V. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound-healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 249-256, 2008.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

RICE-EVANS, C.A., MULLER, N.J., PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 02, n. 04, p. 152-159, 1997.

RICHTER, S.G., OTTOB, F., WEIDNERC, E. Impregnation of oil containing fruits. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p. 321– 327, 2012.

RODRIGUES, C.R.F., DIAS, J.H., SEMEDO, J.G., SILVA, J., FERRAZ, A.B.F., PICADA, J.N. Mutagenic and genotoxic effects of Baccharis dracunculifolia (D.C.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 321-324, 2009.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZJIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação

da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico Online. Embrapa.** n. 127, p. 1-4. Junho, 2007. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf. Acesso em: abril, 2011.

SARTOR, T., XAVIER, V.B., FALCÃO, M.A., MONDIN, C.A., DOS SANTOS, M.A., CASSEL, E., ASTARITA, L.V., SANTARÉM, E.R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentate* (VII.) G.M. Barroso. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 355-359, 2013.

SCOPEL, R., FALCÃO, M.A., LUCAS, A.M., ALMEIDA, R.N., GANDOLFI, P.H.K., CASSEL, E., VARGAS, R.M.F. Supercritical fluid extraction from *Syzygium aromaticum* Buds: Phase equilibrium, mathematical modeling, and antimicrobial activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 223-230, 2014.

SIMÕES, C.M.O. ; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6º ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 467-485.

SINGH, M., GOVINDARAJAN, R., NATH, V., RAWAT, A.K.S., MEHROTRA, S. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 67-72, 2006.

SKOOG, D.A., WEST, D.A., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de Química Analítica**. 8º ed. São Paulo : Thomson, 2008. 999 p.

SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R., RUDZINSKI, W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 1-20, 2001.

SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR., G.R., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAUJO, D.S., CAVALVANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAUJO, P.B.M.,

BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

STEENKAMP, V., MATHIVHA, E., GOUWS, M.C., VAN RENSBURG, C.E.J. Studies of antibacterial, antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from South Africa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 353-357, 2004.

VALGAS, C., SOUZA, S.M., SMÂNIA, E.F.A., SMÂNIA JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VARONA, S., RODRÍGUEZ-ROJO, S., MARTÍN, A., COCERO, M.J., DUARTE, C.M.M. Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 313-319, 2011.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 85-94, 2005.

VIDARI, G., FINZI, P.V., ZARZUELO, A., GÁLVEZ, J., ZAFRA, C., CHIRIBOGA, X., BEREBGUER, B., LA CASA, C., DE LA LASTRA, C.A., MOTILVA, A., MARTIN, M.J. Antiulcer and antidiarrhoeic effect os *Baccharis teindalensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n.6, p. 405-411, 2003.

VILA, F.C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar**. São Paulo. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil.

VOLPE, B.B. **Utilização de fios de sutura com células tronco mesenquimais de tecido adiposo aderidas: avaliação da cicatrização e recuperação de fístulas enterocutâneas em ratos**. Campinas. 2013. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Cirurgia). Universidade Estadual de Campinas, Brasil.

