



Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE EXTRATOS DE CASCA DE BANANA
CULTIVAR PRATA ANÃ (*Musa sp.*) E O DESENVOLVIMENTO DE
UM CURATIVO PARA PEQUENAS LESÕES**

Aline Pereira

Orientador: Dr. Marcelo Maraschin

Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

**Florianópolis
2014**

Aline Pereira

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DA ATIVIDADE
CICATRIZANTE DE EXTRATOS DE CASCA DE BANANA
CULTIVAR PRATA ANÃ (*Musa sp.*) E O DESENVOLVIMENTO DE
UM CURATIVO PARA PEQUENAS LESÕES**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Dr. Marcelo Maraschin

Coorientadora: Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Aline

Determinação do perfil químico e da atividade cicatrizante de extratos de casca de banana cultivar prata anã (*Musa sp.*) e o desenvolvimento de um curativo para pequenas lesões / Aline Pereira ; orientador, Marcelo Maraschin ; coorientadora, Ana Carolina de Mattos Zeri. - Florianópolis, SC, 2014.
223 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Casca de banana. 3. *Musa sp.*. 4. Atividade cicatrizante. 5. Fitoquímica. I. Maraschin, Marcelo. II. de Mattos Zeri, Ana Carolina. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

"Determinação do perfil químico e da atividade cicatrizante de extratos de casca de banana cultivar Prata Anã (Musa sp.) e o desenvolvimento de um curativo para pequenas lesões"

por

Aline Pereira

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 23/PPGBT/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) Marcelo Maraschin

Coorientador:



Dr(a) Ana Carolina de Matos Zeri

Banca Examinadora:



Dr(a) Luiz Augusto Martins Peruch

Dr(a) Jose Domingos Fontana



Dr(a) Fernanda Ramlov



Dr(a) Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau

Dr(a) Maria Beatriz Rocha Veleirinho



Prof(a). Dr(a). Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 26 de setembro de 2014

Este trabalho é dedicado à minha família: Papi, Ado e Titio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por me proteger, dar força e coragem para que eu fosse persistente ao realizar mais um sonho.

Aos meus pais, Francisco e Dirce (in *memoriam*), pelo exemplo de vida, caráter, apoio e amor incondicionais. Meus eternos incentivadores.

Aos meus familiares, em especial meu irmão Eduardo Augusto, minha tia Iolanda e meu tio Américo pela compreensão, amor e carinho. E a querida Ivani que também fez parte dessa jornada, aconselhando e apoiando minhas escolhas.

Ao meu Professor Orientador Dr. Marcelo Maraschin, que contribuiu muito mais do que imagina na minha formação profissional e pessoal. Um exemplo a ser seguido pela sua dedicação, postura profissional e generosidade.

À minha coorientadora Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri, à pesquisadora Silvana Aparecida Rocco e ao especialista em desenvolvimento tecnológico Maurício Luis Sforça pela orientação e suporte nas análises de Ressonância Magnética Nuclear efetuadas no Laboratório Nacional de Biociências, em Campinas/SP.

Ao professor Dr. Achim Göpferich por me receber no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Regensburg na Alemanha, e orientar o desenvolvimento do curativo à base de hidrogel. Com certeza esta foi uma oportunidade ímpar de aprendizagem tanto científica quanto cultural. E a todos os colegas alemães que além do apoio no laboratório, me apresentaram várias comidas típicas, festas tradicionais, e as melhores cervejas. Aos vizinhos da Gesslerheim Studentenwohnung meus agradecimentos pelos ótimos momentos que passamos juntos.

À Professora Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira à Dra. Sibebe Recco Rosso pelo auxílio na obtenção dos extratos derivados de extração supercrítica desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos desta Universidade.

Às Professoras Dra. Rozangela Curi Pedrosa e Dra. Vera Lúcia Tramonte por gentilmente cederem o espaço do biotério setorial dos respectivos Laboratórios de Bioquímica Experimental (LABIOEX) e de Nutrição Experimental, desta Universidade.

Às minhas amigas Ana Luisa Nunes, Carolina Neis Machado, Mariana Neis Machado, Susane Lopes, Rarietty Marques Vieira, Susana Medeiros Vieira, Carolina Morgado, Andréia Diane Freitas, Mirian

Kayser, Mariza Moras, Paula Terra Bandeira, Mirani Massaneiro Melo, Angela Juliani Melo, Fernanda Melo, Fernanda Kokomicz, pelos momentos de descontração, conselhos, e, principalmente, por essa amizade que eu prezo tanto. (Adoro vocês!)

Aos Caneleiros, amigos da corrida e da vida! Parceria de treinos, aventuras e superação. (Amo muito tudo isso!)

Aos colegas do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal Amélia Somensi Zeggio, Ana Claudia Veloso de Souza, Diego Adílio Silva, Eduardo da Costa Nunes, Virgílio Uarrota, Maíra Tomazzoli, Fernanda Ramlov, Fernanda Kokomicz, Simone Kobe, Beatriz Veleirinho, Rodolfo Moresco, Susane Lopes, Eva Regina de Oliveira Rodrigues, Manuel de Prá, Rafael Brandalise, Raissa Podestá que além de compartilhar a rotina laboratorial, se tornaram grandes amigos e contribuíram com meu doutoramento discutindo ideias, apresentando diferentes perspectivas, acrescentando sugestões e críticas. (Essenciais e para a vida toda!)

À Universidade Federal de Santa Catarina, à Secretaria Integrada e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, demais discentes, funcionários técnico e administrativos, em especial à Maria Luisa Peixoto (técnica do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal) pela aprendizagem e suporte técnico.

Ao Departamento de Inovação Tecnológica desta Universidade pelos andamentos quanto ao depósito das patentes geradas a partir desta pesquisa.

À CAPES pela concessão das Bolsas (Doutoramento e PDSE) para realização deste trabalho e ao Governo Brasileiro pelo financiamento desta pesquisa científica (CHAMADA PÚBLICA FAPESC Nº 04/2012 – UNIVERSAL - Desenvolvimento e estudo da atividade cicatrizante de biomembranas a base de ágar de macroalgas marinhas contendo extrato aquoso de casca de banana *Musa spp* (cv. Prata Anã)).

*“(...) onde, afinal, é o melhor lugar do mundo?
Meu palpite: dentro de um abraço.”*
(Martha Medeiros – Feliz por Nada)

RESUMO

A banana (*Musa* sp.) apresenta uma ampla dispersão edafoclimática em seus cultivos como fonte de alimento e renda à população, sendo considerada uma fruta com propriedades nutraceuticas. A casca da banana, por sua vez, é conhecida pelo seu uso na medicina popular, dada à capacidade de promover a cicatrização de lesões, i.e. queimaduras, e prevenir e curar doenças como a depressão. A casca de banana é um resíduo subexplorado da indústria de alimentos, sendo considerada fonte de compostos bioativos com potencial aplicação em cuidados de saúde, i.e. regeneração tecidual e na produção de cosméticos. Este estudo objetivou fornecer conhecimentos sobre a casca de *Musa* sp., cultivar Prata Anã, com foco em suas propriedades fitoquímicas e potencial atividade biológica, i.e., a regeneração de tecido epitelial. A ênfase foi dada àquela biomassa por ser conhecida na medicina tradicional brasileira como cicatrizante, além de ser uma fonte de compostos fenólicos, carotenóides e catecolaminas. Além disso, o presente estudo objetivou desenvolver um produto fitoterápico formulado a partir de hidrogel associado ao extrato de cascas de banana, com aplicação clínica em processo de cicatrização de lesões cutâneas, e.g., pequenos cortes, arranhões, ou traumas na superfície da pele. Amostras de casca de banana orgânica (*Musa* sp., cultivar Prata Anã) foram analisadas por técnicas espectrofotométricas, cromatográficas e de ressonância magnética nuclear quanto ao seu perfil de metabólitos secundários. Adicionalmente, oito extratos da biomassa foram avaliados quanto ao seu potencial de cicatrização em modelo de lesão por excisão de tecido epitelial em camundongos isogênicos Balb/C. O extrato bruto aquoso demonstrou um potencial cicatrizante superior e foi incorporado ao hidrogel à base álcool polivinílico (PVA). A composição química das cascas de banana e seu potencial biológico à saúde humana foram descritos, com ênfase nos processos de cicatrização e regeneração tissular. Desenvolveu-se um hidrogel associado aos compostos fenólicos daquela matriz complexa e suas propriedades foram determinadas. A associação de compostos fenólicos de cascas de banana orgânica ao hidrogel de PVA consiste em formulação farmacêutica promissora à saúde humana no processo de regeneração tecidual cutânea.

Palavras-chave: *Musa* spp; banana; casca de banana; compostos bioativos; fitoquímica; cicatrização; polímero sintético; hidrogel; álcool polivinílico (PVA).

ABSTRACT

Bananas (*Musa* spp) have been cultivated throughout the world as source of food and income for people. Banana is assumed to be a fruit with nutraceutical properties, mainly the pulp which is worldwide consumed. Banana peel is also known by its folk and traditional use to promote wound healing mainly from burns and to help overcome or prevent a substantial number of illnesses such as depression. Banana peel is an under-explored waste from food industry and could be considered source of bioactive compounds with potential application on health care and cosmetic products, for instance. This study provides knowledge about *Musa* sp. fruit peel focusing on their phytochemical properties and biological activities, e.g. wound healing potential. Emphasis was given to the peel, which is known in Brazilian traditional medicine as healing agent, besides being a source of phenolic compounds, carotenoids, and catecholamines. Furthermore, this study aimed to develop a phytomedicine, i.e. polyvinyl alcohol (PVA) hydrogel associated to banana peel extract with clinical application in wound healing process (small cuts, injury caused by shaving or wearing the skin surface, e.g). The organic banana peel (*Musa* sp., cv. Prata Anã) as an interesting complex matrix source of high-value compounds from secondary metabolism was evaluated by spectrophotometric, chromatographic, and nuclear magnetic resonance techniques. Eight peel extracts were obtained and their wound healing potential was evaluated in an excision wound model in Balb/C isogenic mice. The best extract, i.e. the aqueous crude extract, was incorporated into PVA hydrogel and the formulation physico-chemically characterized. Important information from chemical composition of banana's peel, as well as their potential as sources of useful compounds for human health have been described, particularly in healing process and tissue regeneration promoted by phenolic compounds from that biomass. The proposed phytomedicine, i.e., PVA hydrogel associated to phenolic compounds from banana peel, were obtained, as well as the treatment of *in vivo* wounds was successfully performed. The phytomedicine developed is a promising pharmaceutical formulation, rich in bioactive compounds beneficial to the human cutaneous tissue regeneration.

Keywords: *Musa* spp; banana; banana peel; bioactive compounds; phytochemistry; wound healing; synthetic polymer; hydrogel; polyvinyl alcohol (PVA).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas mostrando a geração de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e peróxido de hidrogênio. (Adaptado de GRIENDLING; FITZGERALD, 2003). 36
- Figura 2.** Estrutura química da galocatequina, flavonóide presente na casca de algumas espécies da família Musaceae (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002). 43
- Figura 3.** Vias de síntese dos principais metabólitos secundários de plantas relacionadas as vias de síntese do metabolismo primário do carbono (TAIZ; ZEIGER, 2009). 45
- Figura 4.** Detalhes da estrutura química de carotenos importantes à saúde humana (GOODMAN; HUANG, 1965). 48
- Figura 5.** Detalhes da estrutura química das xantofilas de interesse à saúde humana (GOODMAN; HUANG, 1965). 48
- Figura 6.** Via biossintética dos carotenoides em plantas (PSY: fitoeno sintase; PDS: fitoeno desaturase; ZDS: ζ-caroteno desaturase; LCYB: licopeno β-ciclase; LCYE: licopeno ε-ciclase; CHYB: β-anelhidroxilase; CHYE: ε-anelhidroxilase; ZEP: zeaxantina epoxidase; VDE: violaxantina de-epoxidase; CRTISO: carotenoide isomerase; NSY: neoxantina sintase) (HAMERSKI; RESENDE; SILVA, 2013). 49
- Figura 7.** Uma molécula de β-caroteno pode ser clivada simetricamente por uma enzima intestinal gerando duas moléculas de all-*trans*-retinal. Esta é a etapa principal na síntese de vitamina A, i. e., a clivagem oxidativa da pro-vitamina A carotenoide por β, β-caroteno 15, 15'-monooxigenase (CHICHILI et al., 2005). 50
- Figura 8.** Estrutura química geral de compostos fenólicos. R1, R2, R3, R4 e R5: anel benzênico, hidroxil, metil, metoxil, grupos amino e/ou mono e polissacarídeos (HARBONER, 1999). 51
- Figura 9.** Vias biossintéticas de compostos fenólicos em vegetais superiores. Adaptado de Taiz e Zeiger (2009). 52
- Figura 10.** Via do ácido chiquímico para biossintese de compostos fenólicos e alguns alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2009). 53
- Figura 11.** Rota biossintética de catecolaminas em vegetais superiores (Adaptado de SZOPA et al., 2001). 55
- Figura 12.** Fases do processo de cicatrização de uma lesão (CLARK, 1993; RICHES, 1996). 60
- Figura 13.** Detalhes do cacho, frutos e do aparato foliar da bananeira (*Musa sp.*, cv. Prata Anã) cultivada na estação experimental da EPAGRI (Urussanga, Santa Catarina). 77

Figura 14. Localização da área de plantio das bananas (<i>Musa</i> sp., cultivar Prata Anã). Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), município de Urussanga (Latitude 28°31'22" Sul; Longitude 49°19'3" Oeste), Santa Catarina....	78
Figura 15. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200$ nm-1000 nm) do extrato aquoso de cascas de bananas secas à 45 °C (n=3). Setas indicativas dos valores máximos de absorbâncias.	86
Figura 16. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200$ nm-1000 nm) do extrato metanólico acidificado (HCl 1 %) de cascas de bananas secas à 45 °C (n=3). Setas indicativas dos valores máximos de absorbâncias.....	86
Figura 17. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200$ nm-800 nm) do extrato hexano: acetona (v/v – diluição 3x) de cascas de bananas secas à 45 °C (n=3). Setas indicativas dos compostos identificados.....	87
Figura 18. Conteúdo médio de compostos fenólicos totais em extrato bruto aquoso (EBA) de cascas de bananas secas à 45 °C, para o período amostral de Julho-2010 a Fevereiro-2013, determinado por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$	88
Figura 19. Conteúdo médio de compostos fenólicos totais em extrato metanólico acidificado (HCl 1%) de cascas de bananas secas à 45 °C, para o período amostral de Julho-2010 a Fevereiro-2013, determinado por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$	89
Figura 20. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (FR-CLAE-UV-Vis, 280nm) presentes no extrato metanólico acidificado e no extrato bruto aquoso da amostra de cascas de banana orgânica seca à 45 °C.....	92
Figura 21. Conteúdo médio de carotenoides totais (ug/g casca seca) em extrato hexano: acetona (1: 1,v/v) de cascas de bananas secas à 45 °C, das amostras de Julho de 2010 a Fevereiro de 2013, por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$	98
Figura 22. Perfil cromatográfico de carotenoides (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) no extrato hexano: acetona (1: 1, v/v) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.....	99
Figura 23. Curva padrão de dopamina, cuja equação corresponde a $y = 17446.x$ ($r^2 = 0,99$).	104
Figura 24. Estrutura química de L-dopa (A) e dopamina (B) em suas formas protonadas.	106
Figura 25. Curva-padrão de L-dopa, cuja equação da reta corresponde à $y = 5930,2b.x$ ($r^2 = 0,9816$).	106

- Figura 26.** Curva-padrão de dopamina e sua correspondente equação de reta $y = 4085,2 \cdot x$ ($r^2 = 0,9469$). 107
- Figura 27.** Conteúdo médio de dopamina (mg/casca seca) em extrato acidificado (HCl 0,1M) de amostras de cascas de bananas secas à 45 °C, coletadas no período de Janeiro-2012 a Dezembro-2012, por FR-CLAE-UV-Vis. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$ 108
- Figura 28.** Estrutura geral de catecolaminas. L-dopa: R1 = COOH e R2 = H; dopamina: R1 = R2 = H; norepinefrina: R1 = H e R2 = OH; e epinefrina: R1 = H, R2 = OH, e CH₃ substituindo um dos hidrogênios do grupamento amino. 109
- Figura 29.** Conteúdo médio de L-dopa (mg/g cascas secas) em extrato acidificado (HCl 0,1M) de cascas de bananas secas à 45 °C, coletadas no período de Janeiro-2012 a Dezembro-2012, por FR-CLAE-UV-Vis. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$ 110
- Figura 30.** Perfil cromatográfico típico de catecolaminas (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm) em extrato aquoso acidificado (HCl 0,1M) da amostra de cascas de bananas, seca à 45 °C. 111
- Figura 31.** Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹H do extrato aquoso bruto (EBA) de cascas de bananas secas à 45 °C (Inova Varian, 500 MHz, δ ppm, TSP). 114
- Figura 32.** Esquema do leito da lesão durante o processo de cicatrização de tecido epitelial (a) minutos antes da camada de células epidermais (azul) ser rompida e o tecido conectivo (cor de rosa) ser danificado. Vasos sanguíneos (vermelho); (b) horas após a lesão: a resposta angiogênica já foi acionada e as células da bordas da epiderme começam a migrar uma em direção a outra; (c) Quando a epiderme cicatriza, os brotamentos dos vasos sofrem apoptose, há contração do tecido conectivo, restando a cicatriz dérmica. Os leucócitos são ativados e migram ao leito da lesão (a) e seu pico de atividade é observado no estágio (b). Geralmente a inflamação é resolvida no estágio (c). Adaptado de Martin e Leibovich (2005). 131
- Figura 33.** Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas (FERREIRA et al. 1999). 136
- Figura 34.** Diagrama esquemático do equipamento de ESC (LATESC-UFSC) utilizado nos experimentos, onde E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; P1: Manômetro de controle do cilindro cilindro de CO₂ com 99,9 % de pureza; P2: Manômetro de controle da bomba; P3:

Manômetro de controle do extrator; TI: Controladores de temperatura (ZETZL; BRUNNER; MEIRELESS, 2003).....	138
Figura 35. Perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) presentes em ESC II e ESC III da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.	153
Figura 36. Perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) presentes em ESC IV e ESC V da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.	154
Figura 37. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm) presentes em ESC IV e ESC V da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.	155
Figura 38. Porcentagem de redução da área de lesão tissular cutânea de camundongos tratados com extratos de casca de banana, ESC II, ESC III, EU e EAB, comparativamente aos grupos controles. As medidas da variável em estudo foram coletadas em intervalos regulares (3 dias), durante 15 dias, em modelo experimental de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média ± erro padrão da média (n=6/dia/grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo. A diferença estatística foi simbolizada por α, β , onde α : em relação ao CN, β : em relação ao CP, considerando $p < 0,05$	157
Figura 39. Fotografias da lesão observada aos 6 dias do período cicatricial. Tratamento: aplicação tópica de ESC II (à esquerda) e de ESC III (à direita). Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. .	159
Figura 40. Imagens da lesão tissular cutânea de camundongos aos 15 dias do período cicatricial, consoante aos tratamentos tópicos de A. EAB; B. EU; C. ESC II e D. ESC III. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo.....	161
Figura 41. Conteúdo de hidroxiprolina ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}$ de tecido ⁻¹) de amostras de tecidos cutâneos tratados com extratos de casca de banana ESC II, ESC III, EU e EBA, em relação aos grupos controles positivo e negativo. As amostras foram coletadas periodicamente, i.e, a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento, em modelo experimental de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa a média ± desvio padrão (n=6/dia/grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo. A diferença estatística foi simbolizada por α, β , onde α : em relação ao CN, β : em relação ao CP, considerando $p < 0,05$	163
Figura 42. Estrutura química do álcool polivinílico (LOZINSKY et al., 1999).	178
Figura 43. Hidrogel do polímero álcool polivinílico (PVA): a) solução de PVA; b) hidrogel de PVA após o primeiro ciclo de congelamento/descongelamento; c) hidrogel de PVA após n ciclos de	

congelamento/descongelamento. Os pontos em destaque, denominadas zonas microcristalinas, compreendem as ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio (LOZINSKY et al., 1999).....	179
Figura 44. Rede polimérica de PVA na forma de hidrogel. Destaque para os pontos de cristanização caracterizados por ligações de pontes de hidrogênio entre as unidades poliméricas.	179
Figura 45. Estrutura química das catequinas: epicatequina R1 = R2 = H; galocatequina R1 = H; R2 = OH; R3 = H.....	181
Figura 46. Equipamento Instron® (à esquerda) para teste de tração das amostras de hidrogéis em estudo. Detalhe do esquema de fixação do hidrogel no equipamento e dimensões da amostra (à direita).	185
Figura 47. Taxa de absorção de água dos hidrogéis de PVA imersos em solução que mimetiza o fluido do leite da lesão a temperatura de 37 °C. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as concentrações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05.	191
Figura 48. Taxa de degradação dos hidrogéis de PVA imersos em solução mimetizante do fluido do leite da lesão, a 37 °C. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as concentrações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05.....	192
Figura 49. Taxa de absorção dos hidrogéis de PVA 10% contendo EBA, imersos em tampão fosfato (PBS) ou em solução que mimetiza o fluido do leite da lesão (SL), à 37 °C. Variações de congelamento: congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C), congelamento lento e posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05. ...	193
Figura 50. Taxa de degradação dos hidrogéis de PVA 10% contendo EBA imersos em tampão fosfato (PBS) e em solução que mimetiza o fluido do leite da lesão (SL) à 37 °C. Variações de congelamento: congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C); congelamento lento e posterior liofilização do hidrogel (L; T= -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05. ...	194
Figura 51. Biocompatibilidade dos hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C); congelamento rápido (CR; T = -80 °C); congelamento lento e, posterior, liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). Ensaio realizado via contato indireto com tempo de exposição de 7h e 24h do meio de cultivo nos respectivos hidrogéis. Onde, α: PVA 7h vs. 24h; *: PVA 24h vs. controle positivo.	195
Figura 52. Propriedades mecânicas de um polímero em função das variáveis tensão de tração e deformação.....	197

Figura 53. Resistência à tração (N/mm ²) dos hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C) e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05.....	198
Figura 54. Porcentagem de alongação dos hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C) e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando p<0,05.....	199
Figura 55. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') consoante à varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % sem EBA, preparado por congelamento rápido (CR; T = -80 °C).	200
Figura 56. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') conforme a varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento rápido (CR; T = -80 °C).....	201
Figura 57. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') consoante à varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % sem EBA, preparado por congelamento lento (CL; T = -20 °C).....	201
Figura 58. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento lento (CL; T = -20 °C).	202
Figura 59. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % não adicionado de EBA, preparado por congelamento lento, seguido de liofilização do hidrogel.	202
Figura 60. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s ⁻¹) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento lento, seguido de liofilização.....	203
Figura 61. Percentual de liberação de compostos fenólicos totais do EBA ao longo de um período de 48 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento (-20 °C), congelamento rápido (-80 °C) e congelamento lento seguido de liofilização do hidrogel. O ensaio foi realizado em solução que mimetiza o fluido do leite da lesão, à 37 °C.	205
Figura 62. Percentual de liberação de compostos fenólicos do EBA ao longo de 72 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por	

congelamento lento ($T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de liofilização. O ensaio utilizou uma solução que mimetiza o fluido do leite da lesão, à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Legenda: L + EBA: hidrogel de PVA adicionado de EBA incorporado previamente à polimerização; L + imersão EBA: hidrogel de PVA com EBA incorporado por imersão após a polimerização. 208

Figura 63. Percentual de liberação de compostos fenólicos do EBA ao longo de 2 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento ($T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de imersão em solução do EBA (2 mg/mL). O ensaio realizado utilizou solução que mimetiza o fluido do leite da lesão, à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 209

Figura 64. Porcentagem de redução da lesão mensurada a cada 3 dias durante 12 dias de tratamento com curativos liofilizados de PVA 10% contendo EBA, comparativamente aos grupos controles positivo e negativo. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média \pm erro padrão da média ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN 1= controle negativo: animais sem tratamento; CN 2: hidrogel liofilizado de PVA 10%; CP = controle positivo: curativo DuoDERME®; PVA 10% + EBA: curativo liofilizado de PVA 10% contendo EBA. A diferença estatística foi simbolizada por α , β , onde α' : em relação ao CN 1, α'' : em relação ao CN 2 e β : em relação ao CP, considerando $p < 0,05$ 213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Métodos de secagem de cascas de bananas e solventes extratores - Ensaio piloto à determinação do conteúdo de fenólicos totais (mg/g de casca de banana) por espectrofotometria UV-visível.....	83
Tabela 2. Valores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm), no extrato metanólico acidificado (HCl 1 %) de amostras de cascas de bananas secas à 45 °C.	93
Tabela 3. Valores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm), no extrato bruto aquoso (EBA) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.	94
Tabela 4. Valores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm), no extrato organosolvente (hexano: acetona, 1:1, v/v) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.	99
Tabela 5. Teores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) de α -caroteno, trans- β -caroteno e cis- β -caroteno (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm), conteúdo médio de carotenoides totais e EAR (Equivalente de Atividade de Retinol - $\mu\text{g/g}$ de casca seca) em extrato organosolvente (hexano: acetona, 1:1, v/v) de cascas de bananas seca à 45 °C.	101
Tabela 6. Conteúdo de dopamina de amostras de cascas de banana in natura em três estágios de maturação, cascas secas à 45 °C e cascas liofilizadas.....	105
Tabela 7. Conteúdo (mg/g casca de banana seca) de L-dopa e dopamina em amostras de cascas de bananas secas à 45 °C, nos tempos de sonicação de 0 min e 60 min.....	107
Tabela 8. Deslocamentos químicos (ppm) atribuídos a compostos identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H -RMN do extrato aquoso bruto de cascas de bananas, secas à 45 °C.....	115
Tabela 9. Período de epitelização (dias) à conclusão do processo cicatricial determinado via modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com extrato de casca de banana (n=6, por grupo de tratamento).	149
Tabela 10. Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca) de extratos aquosos de casca de banana (março/2011) conforme o tempo de exposição da biomassa ao ultrassom, à 25 °C, utilizando espectrofotometria UV-visível.	151
Tabela 11. Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca) de extratos aquosos de casca de banana (março/2011), consoante ao	

tempo de exposição da biomassa à radiação microondas, utilizando espectrofotometria UV-visível.	152
Tabela 12. Perfil químico de compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca) de extratos de casca de banana (EBA, EU e EM – amostra de março/2011), utilizando FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm.	152
Tabela 13. Composição química padronizada do extrato bruto aquoso de casca de banana seca à 45 °C (EBA – amostra de março/2011).	165
Tabela 14. Valores de pH dos hidrogéis de PVA.	189
Tabela 15. Valores dos módulos de armazenamento (G') dos hidrogéis de PVA 10 % puros e adicionados de EBA, à 25 °C e 37 °C, preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C) e congelamento lento seguido de liofilização (L; T = -20 °C).....	204
Tabela 16. Conteúdo de compostos fenólicos totais do EBA (mg/mL) utilizado como solução de imersão dos hidrogéis de PVA 10 %.....	207
Tabela 17. Período de epitelização à conclusão do processo cicatricial determinado via modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com hidrogéis liofilizados de PVA 10 % e curativo DuoDERM® (n=6/grupo de tratamento).	212

SUMÁRIO

Metodologia de condução desta pesquisa:	29
Introdução	32
1. A banana.....	39
1.1. Aspectos relacionados à classificação botânica	40
2. Importância das cascas de banana.....	41
3. Estudo do metabolismo vegetal	45
3.1. Carotenoides	47
3.2. Compostos fenólicos.....	51
3.3. Catecolaminas	54
4. A cicatrização de lesões cutâneas.....	57
4.1. Breve histórico da cicatrização	57
4.2. Aspectos gerais da cicatrização.....	58
5. Contextualização da hipótese do estudo	61
6. Objetivos	62
6.1. Objetivo geral.....	62
6.2. Objetivos específicos	62
7. Referências bibliográficas.....	63
Capítulo 1: Análise fitoquímica da casca de banana.....	74
1. Introdução	74
2. Material e métodos.....	77
2.1. Pré-processamento do material vegetal.....	77
2.2. Estabelecimento do protocolo de secagem e extração	78
2.2.1. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível	78
2.3. Determinação do perfil químico de extratos de casca de banana.....	79
2.3.1. Espectrofotometria de varredura UV-visível.....	79
2.3.2. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível	79
2.3.3. Perfil cromatográfico (FR-CLAE-UV-Vis) de compostos fenólicos	79
2.3.4. Extração e quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-visível	80
2.3.5. Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (RF-CLAE-UV-Vis).....	80
2.3.6. Estabelecimento de protocolo de extração e quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	81
2.3.7. Determinação do perfil espectral de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (1H-RMN) dos extratos de casca de banana.....	82
3. Resultados e discussão.....	83

3.1. Estabelecimento do protocolo de secagem e extração	83
3.2. Determinação do perfil químico de extratos de casca de banana.....	85
3.2.1. Espectrofotometria de varredura UV-visível.....	85
3.2.2. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível	87
3.2.3. Análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	91
3.2.4. Quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-visível.....	97
3.2.5. Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	98
3.2.6. Estabelecimento de protocolo de extração e quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	103
3.2.7. Perfil espectral de ¹ H-RMN dos extratos de casca de banana.....	114
4. Conclusão.....	117
5. Referências bibliográficas.....	118
Capítulo 2: Potencial cicatrizante de extratos supercrítico e convencional de casca de banana e perfis de composição química.....	130
1. Introdução	130
1.1. Cicatrização de lesões.....	130
1.2. Estudo fitoquímico: aspectos relacionados à extração de compostos bioativos.....	132
2. Material e métodos.....	137
2.1. Pré-processamento do material vegetal.....	137
2.2. Procedimentos de extração.....	137
2.2.1. Extração supercrítica (ESC).....	137
2.2.1.1. ESC com CO ₂	138
2.2.1.2. ESC com CO ₂ e co-solvente	139
2.2.2. Extração utilizando métodos convencionais	139
2.2.2.1. Extração assistida por ultrassom	139
2.2.2.2. Extração assistida por micro-ondas.....	140
2.2.2.3. Extrato bruto aquoso	140
2.3. Monitoramento do perfil químico de extratos de casca de banana por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, acoplada a espectrofotometria UV-Vis (FR –CLAE-UV-Vis)	140
2.3.1. Compostos fenólicos.....	140
2.3.2. Carotenoides	141
2.4. Padronização do extrato bruto aquoso	141
2.4.1. Quantificação de taninos.....	142
2.4.2. Antibiógrama.....	142
2.5. Estratégia experimental.....	143

2.6. Estudo da atividade cicatrizante dos extratos derivados de extração supercrítica e de extração por métodos convencionais	144
2.6.1. Animais e tratamento	144
2.6.2. Parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato vegetal.....	146
2.6.2.1. Morfometria da lesão	146
2.6.2.2. Conteúdo de hidroxiprolina	147
2.7. Análise estatística.....	147
3. Resultados e discussão.....	147
3.1. Período de epitelização e perfis de composição química dos extratos de casca de banana.....	148
3.2. Porcentagem de redução da lesão	156
3.3. Conteúdo de hidroxiprolina	161
3.4. Padronização do extrato bruto aquoso	165
3.4.1. Antibiograma.....	166
4. Conclusão.....	166
5. Referências bibliográficas.....	167
Capítulo 3: Hidrogel	176
1. Introdução	176
2. Material e métodos.....	181
2.1. Preparo dos hidrogéis.....	181
2.2. Características organolépticas.....	182
2.3. Determinação do pH	182
2.4. Ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel e degradação.....	183
2.5. Ensaio in vitro de biocompatibilidade do hidrogel	183
2.6. Teste de resistência à tração	184
2.7. Caracterização reológica.....	185
2.8. Liberação de EBA pelo hidrogel.....	186
2.9. Ensaio in vivo do potencial cicatrizante dos hidrogéis de PVA contendo extrato aquoso de casca de banana	186
2.9.1. Animais e tratamento	186
2.9.2. Morfometria da lesão	187
3. Resultados e discussão.....	188
3.1. Preparo dos hidrogéis.....	188
3.2. Características organolépticas.....	188
3.3. Determinação do pH	189
3.4. Ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel e degradação.....	190
3.5. Ensaio in vitro de biocompatibilidade do hidrogel	194
3.6. Teste de resistência à tração	196
3.7. Caracterização reológica	199
3.8. Liberação de EBA pelo hidrogel.....	205

3.9. Ensaio in vivo do potencial cicatrizante dos hidrogéis de PVA adicionados de EBA.....	210
3.9.1. Morfometria da lesão x potencial cicatrizante do EBA	211
4. Conclusão.....	214
5. Referências bibliográficas.....	215

Determinação do perfil químico e da atividade cicatrizante de extratos de casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa sp.*) e o desenvolvimento de um curativo para pequenas lesões

Sendo a metodologia considerada a base que define os fundamentos à realização de estudos científicos, o texto que segue objetiva enquadrar a presente pesquisa de acordo com a sua classificação, além de descrever a análise e o direcionamento do seu desenvolvimento, assim como os principais temas e a apresentação das etapas deste trabalho.

Metodologia de condução desta pesquisa:

• Classificação quanto à natureza da pesquisa

Quanto à natureza, uma pesquisa pode ser classificada como básica ou aplicada. A primeira consiste no desenvolvimento de pesquisa sem uma finalidade prática imediata, enquanto a segunda consiste na aplicação dos resultados da pesquisa em problemas existentes (SILVA; MENEZES, 2005). Este estudo consiste em uma pesquisa aplicada, pois objetiva gerar conhecimentos à utilização prática de compostos presentes na casca de banana, uma matriz vegetal complexa, no processo de cicatrização de lesões cutâneas.

• Classificação quanto à abordagem do problema

Quanto à forma de abordagem do problema, uma pesquisa pode ser classificada em quantitativa ou qualitativa (SILVA; MENEZES, 2005). Este estudo possui características da abordagem quantitativa, pois considera um conjunto de variáveis quantificáveis, i.e. que traduzem em números as informações para classificá-las e analisá-las através de técnicas estatísticas. O perfil de composição química e a quantificação de metabólitos secundários presente nas cascas de banana, bem como a determinação de parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante do extrato vegetal de interesse são os elementos mais importantes desta pesquisa.

• **Classificação quanto aos objetivos da pesquisa**

Considerando os objetivos, uma pesquisa pode ser classificada em exploratória, descritiva ou explicativa (SILVA; MENEZES, 2005). Este estudo é uma pesquisa explicativa, pois visa identificar fatores determinantes ou contributivos para acelerar o processo de cicatrização de lesões cutâneas, quando empregado o extrato de casca de banana como tratamento. Além disso, requer o uso de métodos experimentais científicos e a análise estatística à obtenção e interpretação dos resultados.

• **Classificação quanto ao tempo da pesquisa**

Segundo Jung (2003), uma pesquisa pode ser classificada quanto ao tempo de coleta de dados para a realização dos experimentos de duas formas, sendo esta transversal ou longitudinal. Na primeira, o pesquisador coleta os dados num único momento no tempo, obtendo um recorte instantâneo do fenômeno investigado, enquanto na segunda o pesquisador coleta os dados em dois ou mais momentos, havendo um acompanhamento ao longo do tempo do fenômeno em estudo. Portanto, o presente trabalho refere-se a uma pesquisa longitudinal, em que tanto o perfil de metabólitos secundários de casca de banana, quanto os eventos envolvidos no processo de cicatrização são analisados no decorrer de um determinado intervalo de tempo. O perfil metabólico da matriz vegetal foi observado durante o período de Julho de 2010 a Fevereiro de 2013, enquanto que o processo cicatricial foi avaliado durante 15 dias, em intervalos de tempo de 3 dias.

• **Classificação quanto ao método científico utilizado**

Um método científico consiste de um conjunto de etapas que, quando executadas de forma sistemática, facilitam a obtenção de conhecimentos sobre fenômenos físicos, químicos e biológicos; ou o desenvolvimento de novos produtos ou processos. Compõe-se de etapas dispostas de forma sistemática, obedecendo a uma forma sequencial que garante elevado grau de confiabilidade e, conseqüentemente, a aceitação dos princípios descobertos e propostos pelo autor (JUNG, 2003).

Na tentativa de solucionar o problema abordado neste estudo, e considerando que não há conhecimentos completos e/ou suficientes sobre a utilização de compostos derivados do metabolismo secundário

vegetal de cascas de banana (*Musa* sp., cultivar Prata Anã) aplicados em processo cicatricial de lesões cutâneas, criou-se uma hipótese concernente ao tema, visando a geração de novos conhecimentos.

O desenvolvimento deste estudo ocorreu através da abordagem etnodirigida à investigação e ao estudo das atividades biológicas de extratos de casca de banana na cicatrização de lesões, tendo como ponto de partida a hipótese de que os extratos de casca de banana da cultivar Prata Anã (*Musa* sp.) apresentam ação cicatrizante, consoante ao seu perfil de composição química. Assume-se que conhecendo a composição química dos extratos de casca de banana, será possível relacioná-la a sua ação terapêutica, i.e., capaz de promover a regeneração tecidual. Em seguida, foi testada a hipótese, passando por generalizações empíricas até a formação de conceitos e o arranjo de proposições sobre o tema em estudo. A hipótese desta pesquisa está diretamente relacionada com registros da medicina popular brasileira, bem como direciona argumentos e proposições para ações e pesquisas futuras.

As principais formas para aquisição de conhecimentos, tendo-se por princípio o método científico, são a observação e a experimentação dos fenômenos. Todas essas características classificam o método deste estudo em observação e experimentação em laboratório (JUNG, 2003). De acordo com Popper (1998), um sistema pode ser reconhecido como científico se este for passível de comprovação pela experiência. Portanto, o presente estudo pode ser classificado ainda como um método científico hipotético-dedutivo (ENSSLIN; VIANNA, 2008).

• Procedimentos para elaboração do estudo

O planejamento e a execução de uma pesquisa fazem parte de um processo sistematizado que compreende várias etapas, e.g., escolha do tema, revisão da literatura, formulação da hipótese, definição dos objetivos, análises experimentais e obtenção e discussão dos resultados (SILVA; MENEZES, 2005).

Introdução

Inúmeras estratégias podem ser consideradas à investigação e ao estudo das atividades biológicas das plantas medicinais. Além das abordagens randômica, etiológica e quimiotaxonômica, a etnodirigida, que abrange tanto as investigações etnofarmacológica quanto a etnobotânica, tem sido reconhecida mundialmente pelos pesquisadores como a principal estratégia de seleção de espécies medicinais (MACIEL et al., 2002).

A abordagem etnodirigida consiste na seleção de espécies consoante à indicação de grupos populacionais específicos em determinados contextos de uso, enfatizando a busca pelo conhecimento construído localmente a respeito de seus recursos naturais e a aplicação que fazem deles em seus sistemas de saúde e doença (MACIEL et al., 2002). Assim, o conceito da abordagem etnodirigida engloba a etnobotânica e a etnofarmacologia. Por definição, a etnobotânica se ocupa da interrelação direta entre pessoas e plantas (ALBUQUERQUE, 2005), incluindo todas as formas de percepção e apropriação dos recursos vegetais. A etnofarmacologia consiste em combinar informações adquiridas junto a comunidades locais e pessoas experientes que fazem uso isoladamente ou em conjunto da flora medicinal, dos animais, dos fungos ou dos minerais, com estudos químico-farmacológicos realizados em laboratórios especializados. Portanto, tem por objetivo avaliar a eficácia das técnicas tradicionais fazendo uso de um grande número de modelos farmacológicos (ELISABETSKY, 1987; WALLER, 1993).

Desde a Antiguidade, as plantas são fontes de medicamentos para tratamento das enfermidades que acometem a espécie humana. Grandes civilizações, como os antigos Chineses, Indianos e Norte Africanos, deixaram escritos evidenciando a utilização de plantas ao tratamento de uma série de doenças. Quando a Europa entrou na Idade das Trevas, muitas dessas informações teriam sido perdidas se não tivessem sido enviadas para mosteiros que funcionavam como centros para o cultivo de plantas medicinais. Entretanto, foi somente após o século XIX que o homem começou a isolar princípios ativos de plantas medicinais, sendo um marco especial a descoberta do quinino a partir das cascas de *Cinchona lendgeriana*, pelos cientistas franceses Caventou e Pelletier (PHILLIPSON, 2001).

Na medicina popular brasileira, cascas de banana são utilizadas para promover a cicatrização de lesões, quando aplicada por via tópica a face interna destas, principalmente aquelas derivadas de queimaduras

(BALBACH, 1945). Como na parte interna da casca de banana há substâncias com propriedades antissépticas, estas podem ser aplicadas diretamente às lesões para também reduzir a dor e/ou o inchaço (INIBAP, 2006).

Diante deste cenário, surgiu a ideia de investigar as atividades cicatrizante e antitumoral de *Musa* spp, a partir da realização de um levantamento etnofarmacológico prévio como o ponto de partida. Com base nestes conhecimentos, desenvolveu-se a dissertação de mestrado intitulada “Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* sp.)” (PEREIRA, 2010). O objetivo deste estudo foi avaliar os extratos provenientes da casca de banana (*Musa* sp.) (EBAQ: extrato bruto aquoso; EBHE: extrato bruto hidroetanólico; ESC: extrato derivado de extração supercrítica utilizando CO₂ como solvente) no processo de cicatrização de lesões, considerando seu potencial antioxidante, e quanto a sua atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*. A hipótese deste estudo baseou-se na relação existente entre a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de cascas de banana consoante ao seu potencial cicatrizante e possível potencial antitumoral.

Para a avaliação da atividade cicatrizante de um extrato foi utilizado o modelo de excisão tecidual e considerados os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato, o que compreende a morfometria da lesão, o conteúdo de hidroxiprolina, o estudo histológico da lesão e a avaliação do estresse oxidativo *ex vivo*. Foi empregado um modelo experimental animal para avaliar a atividade cicatrizante, através da utilização de camundongos isogênicos Balb/C tratados com os extratos (EBAQ e EBHE) das cascas de banana. O tratamento com ESC apresentou elevada toxicidade quando aplicado ao modelo experimental para avaliação do potencial cicatrizante do extrato. A avaliação do estresse oxidativo *ex vivo* abordou a análise de marcadores não-enzimáticos, entre eles a peroxidação lipídica, dano em estrutura proteica e nível de glutatona reduzida; e marcadores enzimáticos, entre eles a atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutatona peroxidase e glutatona S-transferase.

Os resultados obtidos no estudo “Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* sp.)” (PEREIRA, 2010) sugeriram que os extratos (EBAQ e EBHE) de casca de banana ora testados impediram o dano oxidativo às estruturas celulares no leito da lesão, durante todo o período experimental. Tal efeito é de suma importância nos primeiros dias do processo cicatricial, por permitir um controle dos níveis de

espécies reativas de oxigênio (EROs) no leito da lesão. Nos dias subsequentes, este controle condicionou o espaço lesionado à proliferação celular necessária, culminando com a conclusão do processo cicatricial de forma rápida e eficaz. Um lapso de tempo de nove dias foi necessário aos animais tratados com os extratos de casca de banana (EBAQ e EBHE 50 mg/kg/dia) à conclusão do processo cicatricial. Os animais pertencentes ao grupo controle positivo e tratados com alantoína (50 mg/kg/dia) apresentaram um período cicatricial de 12 dias. De outra forma, foram necessários 15 dias à cicatrização completa das lesões dos animais do grupo controle negativo, os quais foram tratados apenas com o veículo água, o qual foi utilizado na dissolução dos extratos de casca de banana. Substâncias antioxidantes de baixo peso molecular estão envolvidas diretamente na conversão de EROs a espécies menos reativas ou em sua neutralização. A diminuição das concentrações de EROs devido ao excesso de antioxidantes pode estimular a proliferação de fibroblastos e queratinócitos e, portanto, promover a reepitelização culminando na conclusão do processo cicatricial (VALKO et al., 2007). EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) são produtos do metabolismo celular normal e são conhecidos por agir como mensageiros secundários no controle de várias funções fisiológicas do organismo. Além disso, EROs e ERNs participam em vários mecanismos envolvendo regulação redox das células no intuito de protegê-las contra o estresse oxidativo e manter a homeostase entre as reações de oxirredução. Entretanto, condições de superprodução de EROs devem ser evitadas pelo organismo, pois a reatividade dessas moléculas causa danos através da oxidação de biomoléculas, como proteínas, lipídeos, carboidratos, DNA, o que pode causar uma perturbação da homeostase celular (SIES, 1985).

O desequilíbrio entre a produção de EROs e/ou ERNs e o sistema de defesa antioxidante endógeno é o fator predominante que pode causar uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (SIES, 1985; CROFT, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pelo aumento de espécies pró-oxidantes (EROs) e sem o concomitante aumento das defesas antioxidantes, como pela diminuição das defesas sem o aumento das EROs e, ainda, pelo aumento da concentração de EROs paralelamente à diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1985).

Os principais sistemas de defesas antioxidantes enzimáticas celulares são compostos pelas enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, que constituem a primeira defesa endógena de neutralização dos radicais livres (Fig. 1). Secundariamente, as enzimas

glutathione redutase e a glutathione S-transferase auxiliam na regeneração da glutathione reduzida e na conjugação de metabólitos reativos (Fig. 1). Através delas as células buscam manter baixas as concentrações de $O_2^{\cdot-}$ e de peróxido de hidrogênio, evitando assim a formação do radical hidroxil ($\cdot OH$), que embora tenha um tempo de meia vida curta, i.e., fração de segundos, e em reduzida concentração é extremamente reativo e danoso às células (BOVERIS; CADENAS, 1997).

Os compostos antioxidantes não enzimáticos são quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, retardam ou inibem a oxidação desse substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

A superprodução de EROs decorrente da estimulação excessiva da NAD(P)H oxidase por citocinas, por exemplo, além do desequilíbrio de outros sistemas enzimáticos e não enzimáticos resulta em estresse oxidativo (SIES, 1985; CROFT, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), prejudicando o crescimento celular ordenado ao longo do processo cicatricial. A intervenção no processo cicatricial, realizada a partir do tratamento das lesões, através da aplicação tópica de extratos de casca de banana funcionou como uma fonte exógena de compostos antioxidantes. Possivelmente, estes compostos antioxidantes modularam o ambiente redox, i.e., favoreceram a homeostase no leito da lesão e proporcionaram a condição ideal à conclusão da cicatrização da lesão.

Os estudos de Pereira (2010) concluíram que os extratos de casca de banana (EBAQ e EBHE) são importantes agentes cicatrizantes, por proporcionar total cicatrização da lesão nos animais submetidos ao modelo de excisão, em um período estatisticamente menor de tratamento em relação aos animais dos grupos controles positivo e negativo. Além disso, as potentes atividades cicatrizante e antioxidante dos extratos de casca de banana sugerem que a abordagem etnofarmacológica na seleção do material para estudo pode ser bastante útil, além de agregar valor a um resíduo da indústria de alimentos. Não obstante, foi possível validar parcialmente o uso etnofarmacológico advindo da medicina popular brasileira quanto à aplicação tópica de cascas de banana em lesões na pele (PEREIRA, 2010).

Diante dessas informações, o presente estudo de doutorado foi delineado considerando, primeiramente, a qualidade das cascas de banana a serem utilizadas na obtenção dos extratos. Para tal, estabeleceu-se como referência somente o uso de determinadas cascas de banana, provenientes de cultivo orgânico, cuja denominação da fruta é *Musa* sp., subgrupo Prata, grupo genômico AAB, cultivar Prata Anã. Isso ocorreu devido à elevada toxicidade observada para o extrato

derivado de extração supercrítica, quando aplicado ao modelo de excisão tecidual em camundongo. Acredita-se que a condição de extração supercrítica utilizando como solvente o gás carbônico, uma substância de característica apolar, favoreceu a concentração de compostos tóxicos apolares, possivelmente de agrotóxicos (fungicida) utilizados ao longo do cultivo de bananas. E a escolha de uma determinada cultivar se deu no intuito de facilitar a padronização do conteúdo dos extratos obtidos a partir deste material vegetal.

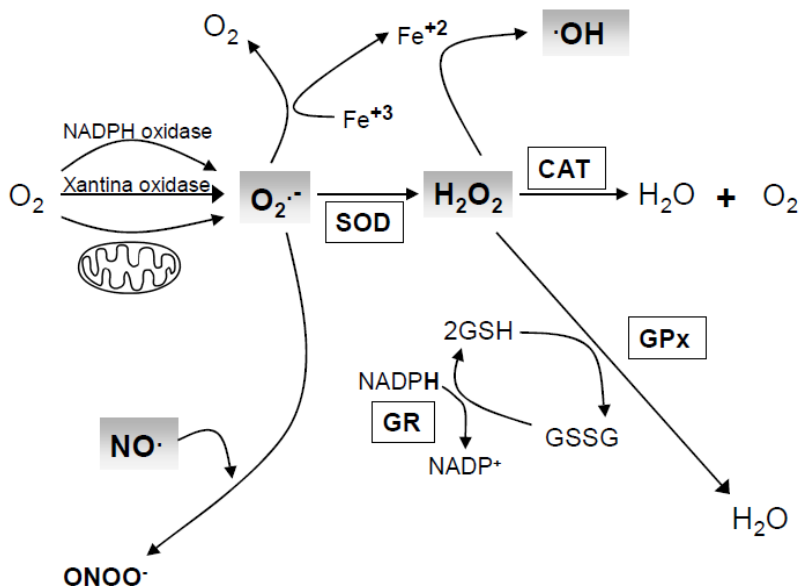


Figura 1. Esquema das defesas antioxidantes enzimáticas mostrando a geração de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e peróxido de hidrogênio. (Adaptado de GRIENGLING; FITZGERALD, 2003).

A composição fitoquímica das frutas é altamente afetada não só pelos fatores genéticos, como a cultivar, mas também por fatores ambientais, como por exemplo, o clima e o solo do local de cultivo, além do estágio de maturação dos frutos no momento da colheita, as práticas agrícolas, o tempo de colheita, o manuseio pós-colheita, o processamento e as condições de armazenamento, bem como a parte da planta utilizada nos processos de obtenção de compostos de interesse (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). Diante disto, também foi determinado que as bananas da cultivar Prata Anã (*Musa* sp., subgrupo Prata, grupo genômico AAB) seriam colhidas em uma única região, i.e., no

Município de Urussanga, em Santa Catarina, mais precisamente na Estação Experimental da EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina) de Urussanga, e na última semana de cada mês. Estes cuidados foram rigorosamente tomados, principalmente visando minimizar os efeitos de fatores ambientais, os quais estão diretamente relacionados à composição química das cascas das frutas. Além disso, foram observados os critérios relacionados ao manuseio e processamento das frutas. As bananas foram encaminhadas uma vez por mês ao laboratório de pesquisa, onde foram pré-processadas (limpeza e retirada das cascas, sendo descartadas as suas extremidades), no intuito de evitar processos de degradação e garantir a qualidade adequada da biomassa em estudo e, conseqüentemente, das análises fitoquímicas posteriores.

Uma das abordagens deste doutoramento, considerando o estudo prévio de mestrado, foi a fitoquímica das cascas de banana. O objetivo foi verificar a qualidade do conteúdo e a quantidade de compostos biologicamente ativos presente nesta biomassa vegetal, i.e., a realização de um estudo parcial do metaboloma das cascas de banana, ao longo do tempo, a fim de garantir se é possível a obtenção contínua destes compostos derivados do metabolismo secundário da planta.

Concomitantemente, foram obtidos 8 (oito) extratos a partir da biomassa de casca de banana orgânica, os quais foram submetidos a um modelo experimental animal a fim de se avaliar o seu potencial cicatrizante. As condições de obtenção dos extratos de cascas de banana foram estabelecidas na tentativa de isolar determinadas classes de compostos de interesse, as quais se basearam em características químicas, como a polaridade das moléculas presentes na matéria-prima vegetal, assim como o peso molecular destas. De fato, almejou-se o direcionamento à pesquisa da atividade biológica e à determinação dos compostos responsáveis pelo efeito cicatrizante desta matriz vegetal complexa. Além disso, também foi realizada a determinação do perfil de composição química dos 8 (oito) extratos de cascas de banana obtidos. A partir destes resultados, foi selecionado e padronizado o extrato de casca de banana com o potencial cicatrizante mais promissor.

Em seguida, realizou-se um estudo complementar desenvolvido no grupo Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Química e Farmácia da Universidade de Regensburg, na Alemanha, sob a supervisão do professor Dr. Achim Göepferich. Este estudo visou a obtenção de uma matriz na forma de hidrogel constituída pelo polímero álcool polivinílico (PVA), contendo extrato de casca de banana padronizado para fins de aplicação tópica em lesões cutâneas, i.e.,

pequenos cortes ou arranhões. As matrizes poliméricas foram caracterizadas quanto as suas propriedades reológicas, resistência à tensão, poder de inchamento e degradação e biocompatibilidade *in vitro*. Essas matrizes foram estudadas visando determinar o perfil de liberação dos compostos agregados à rede polimérica de PVA. Adicionalmente, as matrizes de PVA foram submetidas a um ensaio utilizando o modelo experimental animal, no Brasil, para determinar o potencial cicatrizante destes curativos contendo extrato padronizado de cascas de banana.

Dessa forma, o presente estudo foi dividido em 4 capítulos. O primeiro capítulo aborda a análise fitoquímica das cascas de banana. O segundo capítulo contém informações do estudo dos extratos obtidos a partir das cascas de banana, bem como a caracterização do perfil químico e do potencial cicatrizante *in vivo* destes. O terceiro capítulo aborda o estudo do metaboloma da lesão. E, por fim, o quarto capítulo descreve o desenvolvimento e o estudo dos curativos a base de hidrogéis de PVA, e.g., suas propriedades físicas, análises *in vitro* e avaliação do efeito cicatricial em modelo experimental animal.

Revisão da literatura

O entendimento do cenário em que este estudo se insere acontece a partir de referências teóricas já publicadas nas áreas da Bioquímica de Plantas Medicinais, a Bioquímica Fisiológica, a Biotecnologia e as Ciências Farmacêuticas.

A fim de se alcançar o conhecimento necessário sobre os referidos assuntos, pesquisas em livros, anais, bases de periódicos e informações sobre projetos de pesquisa relevantes para o trabalho foram realizadas. Estas pesquisas foram guiadas por palavras-chave e nomes de autores de referência nos temas em questão, i.e., metabólitos secundários, compostos antioxidantes, casca de banana, cicatrização de lesões e hidrogéis. Como ponto de partida, estes estudos visaram solidificar o entendimento sobre o cenário da pesquisa e obter a fundamentação teórica para o desenvolvimento do presente estudo.

Ao longo deste estudo, as pesquisas utilizando termos e palavras-chave foram sendo refinadas, através da leitura e entendimento dos materiais retornados, em que a cada nova busca os resultados correspondiam cada vez mais especificamente aos assuntos pesquisados.

As seguintes bases de materiais científicos foram as principais utilizadas no desenvolvimento da pesquisa bibliográfica:

- Portal Periódicos CAPES – <http://www.periodicos.capes.gov.br>
- ScienceDirect – <http://www.sciencedirect.com>
- SpringerLink – <http://www.springerlink.com>
- Google Scholar – <http://scholar.google.com>

1. A banana

As bananas são frutas originárias do sudeste da Ásia e, atualmente, são cultivadas em praticamente todas as regiões tropicais e subtropicais do planeta. Popularmente, e para efeitos comerciais, o termo "banana" refere-se às frutas de polpa macia e doce que podem ser consumidas cruas. Contudo, há cultivares de polpa mais rija e de casca mais firme e verde, geralmente designadas por plátanos, banana-pão ou *plantains*, que são consumidas fritas, cozidas ou assadas (INIBAP, 2002).

Bananas e plátanos estão entre os principais recursos alimentícios no mundo e ocupam o quarto lugar no ranking mundial dos alimentos mais importantes, depois do leite, do arroz e do milho (FAO, 2014).

Economicamente, a banana destaca-se como a segunda fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e

consumo no Brasil. É cultivada por grandes, médios e pequenos produtores, sendo 60% da produção proveniente da agricultura familiar (EMBRAPA, 2014). A bananicultura ocorre em todos os estados brasileiros, sendo o Estado de Santa Catarina o terceiro maior produtor (IBGE, 2014).

A maior parte da produção de bananas do quinto maior produtor mundial, i.e., o Brasil, é consumida *in natura*. Além disto, a industrialização da produção é bastante reduzida (2,5 - 3,0%), sendo que 33% destes produtos são consumidos no mercado interno (EMBRAPA, 2014). O consumo *per capita* anual brasileiro de bananas no período de 2008 – 2009 foi de 7,68 kg, sendo a cultivar banana prata (2,77 kg) a mais consumida, seguida da banana d'água (2,21 kg), banana da terra (0,445 kg) e banana maçã (0,31 kg) (IBGE, 2014).

Bananas e plátanos são plantas perenes que crescem rapidamente e podem ser cultivadas em qualquer período do ano. Em muitos países em desenvolvimento, grande parcela da produção de bananas é consumida pelos próprios produtores, ou comercializada na comunidade local, desempenhando assim um papel importante na segurança alimentar. A banana do subgrupo Cavendish predomina no mercado mundial, correspondendo a 47% do volume total transacionado, enquanto as cultivares do grupo genômico ABB e outras cultivares de plátanos respondem por 24 %, e os plátanos AAB e Gros Michel representam 17% e 12%, respectivamente (FAO, 2014). No mercado brasileiro, as cultivares mais populares incluem as bananas Maçã, Prata (grupo genômico AAB) e Pacovan (SEBRAE, 2008).

1.1. Aspectos relacionados à classificação botânica

Musa spp é um termo que designa várias espécies de um gênero e, portanto, compreende cultivares de bananas e plátanos, os quais estão entre as culturas de frutas mais importantes como fonte de energia na dieta de populações em regiões tropicais úmidas. Banana é um termo que inclui um número de híbridos no gênero *Musa*, da família Musaceae e suas características permitem que seja consumida na forma crua (ROBINSON, 1996; STOVER; SIMMONDS, 1987). Plátanos, geralmente, são frutos maiores, mais amiláceos e derivados de cultivares híbridas triplóides destinadas ao cozimento ou fritura (ROBINSON, 1996).

Os híbridos são originários das cultivares diplóides *Musa acuminata* e *Musa balbisiana*, nativas do sudeste da Ásia. Existem cultivares diplóides, triplóides e tetraplóides, i.e., híbridos que compõe

subespécies derivadas de *i* e da combinação entre os genomas de *M. acuminata* e *M. balbisiana* (ROBINSON, 1996; STOVER; SIMMONDS, 1987). Por convenção, a contribuição do respectivo genoma de cada uma dessas duas cultivares corresponde a letra A e B. Portanto, as cultivares derivadas de *M. acuminata* e *M. balbisiana* podem apresentar combinações genômicas dependendo do número básico de cromossomos, i.e., AA, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB, e ABBB (EL-KHISHIN et al., 2009). As frutas dos grupos genômicos AA e AAA são doces e incluem a maioria das cultivares de importância comercial. Plátanos são híbridos triploides AAB, ABB, e BBB, as quais apresentam elevado conteúdo de amido e são consumidas tipicamente após cozimento ou fritura (INIBAP, 2002; ZHANG et al., 2005).

Geralmente, a produção de bananas é baseada em cultivares triploides. Todavia, o genoma diplóide se tornou importante porque é fonte de genes alelos resistentes e tolerantes tanto ao estresse biótico quanto ao abiótico (JENNY et al., 2003).

2. Importância das cascas de banana

Geralmente depois de consumidas as bananas, suas cascas são utilizadas na alimentação animal, na compostagem ou são simplesmente descartadas (CHARRIER et al., 2004). O descarte dessas cascas pode causar problemas ambientais. Em países como a Costa Rica, é comum a prática do descarte de excesso e rejeitos de bananas nos rios. O alto teor de carboidratos da cultura cria elevada demanda bioquímica de oxigênio nos rios e, portanto, reduz as populações de animais aquáticos provocando um desequilíbrio nesse ecossistema (ZHANG et al., 2005).

Atualmente, existem poucos trabalhos mencionando o aproveitamento desses resíduos. Alguns artigos tratam de diferentes aplicações práticas para a casca de banana, por exemplo a produção de álcool (TEWARI; MARWAHA; RUPAL, 1986), metano (BARDIYA; SOMAYAJI, 1996; GUNASEELAN, 2004), alimentação para gado (ONWUKA; ADETILOYE; AFOLAMI, 1997), ou adsorventes à purificação de água (ANNADURAI; JUANG; LEE, 2004).

Dependendo da tecnologia empregada, os materiais residuários podem ser convertidos em produtos comerciais tanto como matéria-prima para processos secundários, como ingredientes de novos produtos com atividade terapêutica. Esses produtos naturais também podem ser utilizados diretamente como compostos funcionais na nutrição humana e na prevenção e cuidados com a saúde. Dentre as inúmeras fontes,

destacamos a obtenção seletiva de frações de compostos presentes na casca de banana que apresenta classes de compostos ativos relevantes (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). Flavonoides, ácidos graxos, fitoesteróis e carotenoides são alguns compostos de alto valor já identificados em cascas de bananas.

As aplicações potenciais para a casca de banana estão diretamente relacionadas à sua composição química. A casca de banana é rica em fibras (50%, com base na matéria seca), proteínas (7%, com base na matéria seca), aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados, cálcio, potássio, vitaminas A e C (HARDISON et al., 2001; WALL, 2006, EMAGA et al., 2007) e também em compostos antioxidantes. Entre outros compostos, as cascas de banana madura contêm as antocianinas delfinidina e cianidina (SEYMOUR, 1993), catecolaminas (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000), os esteróis e os triterpenos, tais como β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, cicloeucalenol, cicloartenol e 24-metileno cicloartanol. Curiosamente, o palmitato de cicloartanol 24-metileno representa 30% do total de lípidios da casca de banana (KNAPP; NICHOLAS, 1969).

Emaga e colaboradores (2007) estudaram a composição química das cascas de duas variedades de banana, a Grand Naine, subgrupo Cavendish, e a variedade Yankambi, subgrupo Ibota, e determinaram o conteúdo de ácidos graxos. Os genótipos apresentaram quantidades significativas de ácidos graxos insaturados, principalmente os ácidos linolêico e α -linolênico que corresponderam a 40% do total de ácidos graxos. No mesmo estudo, o total de lípidios crus foi avaliado em 5,7% sobre a matéria seca para a variedade Grand naine e 10,9% para a variedade Yankambi.

Frutas e vegetais não só fornecem uma pequena parte da ingestão diária de calorias de nossa dieta, mas também certas substâncias com capacidade antioxidante, como a vitamina A, C e E, polifenóis e carotenoides. Eles são capazes de restringir a propagação de reações em cadeia e danos induzidos por radicais livres. Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em determinar fontes dietéticas relevantes de compostos antioxidantes devido à sua importância evidente na prevenção e no tratamento de certas doenças humanas (BIANCHI; ANTUNES, 1999)

Frutas tropicais possuem forte atividade antioxidante, assim como o extrato aquoso de casca de banana que suprime a autooxidação do ácido linoleico entre 65-70%, após cinco dias de incubação em sistema de emulsão (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000). Kanazawa e Sakakibara (2000) consideram que a polpa e a casca das bananas contêm

substâncias antioxidantes com capacidade de proteção contra fatores de peroxidação. Por sua vez, Rodriguez-Amaya (2010) ressalta que a composição química das frutas é dependente de fatores genéticos, como a cultivar, e de fatores ambientais, e.g., o local de cultivo, a época de a colheita, a parte da planta utilizada, as práticas agrícolas, o manuseio em pós-colheita, o processamento e as condições de armazenamento.

Os compostos antioxidantes das cascas de banana, como em *Musa* spp, subgrupo Cavendish, foram estudados por Someya e colaboradores (2002) e a galocatequina (Fig. 2) foi identificada; um composto conhecido devido a sua propriedade antioxidante. De fato, a galocatequina é mais abundante nas cascas da fruta (158 mg/100 g de peso seco) que na polpa (29,6 mg/100 g de peso seco) em genótipos de *Musa* spp, subgrupo Cavendish. A atividade antioxidante do extrato de casca de banana frente a processos de autoxidação lipídica foi maior em comparação aos extratos de polpa de banana. Este resultado corroborou a análise de galocatequina nas cascas de banana, demonstrando ser este o metabólito secundário majoritário no extrato e com potencial antioxidante. Assim, cascas de banana podem ser consideradas uma fonte interessante de compostos antioxidantes naturais, uma vez que é evidenciado na literatura que as catequinas apresentam efeito antioxidante frente a processos de lipoperoxidação e efeitos protetores relacionados ao câncer e a doenças cardiovasculares (DAVEY et al., 2006; KONDO et al., 1999).

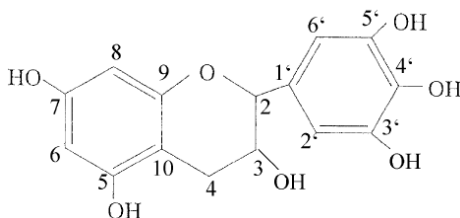


Figura 2. Estrutura química da galocatequina, flavonóide presente na casca de algumas espécies da família Musaceae (SOMEYA; YOSHIKI; OKUBO, 2002).

Davey e colaboradores (2006) determinaram o conteúdo de pró-vitamina A (α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina) na polpa e na casca de duas amostras de bananas *Musa* spp, subgrupo Cavendish, e Yangambi-5. Os resultados revelaram alto conteúdo de pró-vitamina A, sendo que na casca de *Musa* spp, subgrupo Cavendish, o teor de

carotenoides é aproximadamente três vezes maior e mais complexo, comparativamente à polpa da fruta.

A atividade antioxidante proveniente do extrato das cascas de banana (*Musa paradisiaca*) em modelo experimental de ratos submetidos a uma dieta normal ou rica em ácidos graxos foi superior nos animais tratados por via oral com o extrato. Estes animais apresentaram concentrações significativamente diminuídas dos produtos de peroxidação, hidroperóxidos e dienos conjugados. Ao mesmo tempo, as atividades das enzimas catalase e superóxido dismutase aumentaram significativamente nos animais tratados com ração comercial enriquecida com flavonoides extraídos de casca de banana (10 mg de peso corporal/dia) e dieta rica em ácidos graxos contendo flavonoides (10mg de peso corporal/dia), durante os 90 dias do período experimental (VIJAYAKUMAR et al., 2008).

As catequinas consistem um dos maiores grupos de ocorrência natural de compostos fenólicos com potencial antioxidante e são amplamente distribuídas em folhas, sementes, cascas e flores de plantas (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002). A fim de estudar o extrato de casca de *Musa* spp rico em galocatequina (EG: 106,6 µg/mL) durante o processo de cicatrização de lesões epiteliais em camundongos isogênicos Balb/C, estes foram submetidos a um processo de excisão tecidual e divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle negativo (CN - aplicação tópica de água durante três, seis, nove e 12 dias), grupo de controle positivo (CP - aplicação tópica de solução de alantoína, 50 mg/Kg /dia) e o grupo de tratamento (aplicação tópica de EG, 50 mg/Kg/dia). Os animais tratados com EG foram estatisticamente significativos compatativamente aos grupos CN e CP. A cicatrização das lesões tratadas com EG finalizou aos nove dias e o tratamento foi capaz de diminuir o período de epitelização em relação aos grupos controles. O estudo histológico da lesão confirmou que EG apresenta potencial cicatrizante devido à proliferação de fibroblastos e indução do processo de reepitelização. Os resultados deste estudo sugerem que o extrato de casca de *Musa* spp preveniu o dano oxidativo das estruturas celulares no leito da lesão, o que foi mais acentuado e importante nos dias iniciais do processo de cicatrização, aparentemente porque permitiu o controle dos níveis de EROs. O espaço da lesão foi condicionado à rápida proliferação celular e eficazmente culminou no final do processo cicatricial (PEREIRA, 2010).

3. Estudo do metabolismo vegetal

O metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem no interior das células. Nos vegetais, o metabolismo é dividido, didaticamente, em primário e secundário. O metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário são os polissacarídeos, as proteínas, os lipídeos e os ácidos nucleicos e possuem uma distribuição universal nas plantas. Já o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal entre os vegetais (VOET; VOET, 2006).

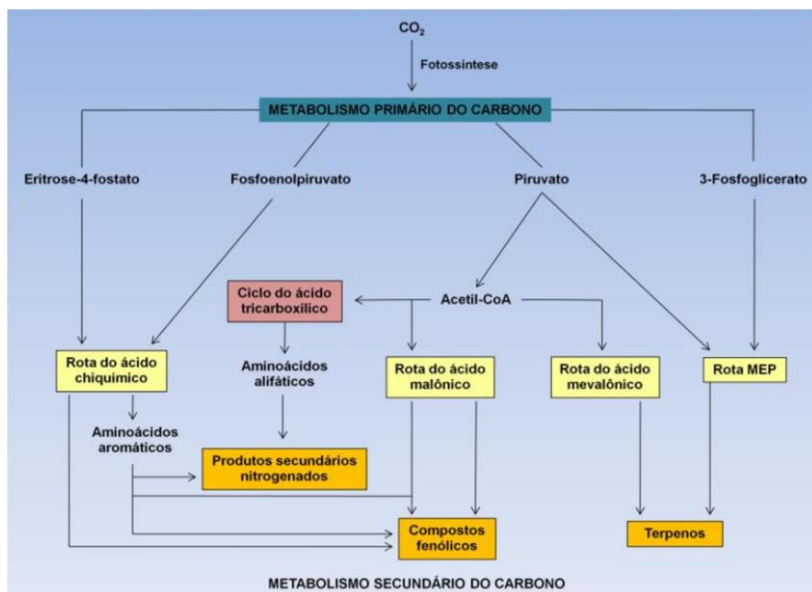


Figura 3. Vias de síntese dos principais metabólitos secundários de plantas relacionadas às vias de síntese do metabolismo primário do carbono (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos do metabolismo secundário, ao contrário dos compostos do metabolismo primário, não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta, mas podem ser imprescindíveis à sobrevivência e continuidade da espécie dentro do ecossistema.

Possuem características químicas variadas e apresentam atividades biológicas bastante relevantes (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Os metabólitos secundários desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. A herbivoria, o ataque de patógenos, a competição entre plantas e a atração de polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes são fatores bióticos cuja interação planta-ambiente é mediada por compostos do metabolismo secundário. Além disso, estes metabólitos também possuem ação protetora em casos de estresses abióticos, como mudanças na temperatura, no conteúdo de água, na intensidade de luz, e na deficiência de nutrientes e minerais. Assim, a demanda da dinâmica do ambiente confere uma plasticidade natural ao metabolismo secundário e proporciona a evolução da diversidade genética (KUTCHAN; DIXON, 2005).

A via de síntese dos metabólitos secundários está intimamente relacionada à via principal do metabolismo de carboidratos (Fig. 3). Os compostos intermediários, fosfoenolpiruvato (via glicolítica) e eritrose-4-fosfato (via das pentoses-fosfato), originam o ácido chiquímico, precursor de diversos compostos que possuem núcleos aromáticos em sua estrutura química. A via do mevalonato e a via de condensação do acetato são rotas alternativas de síntese de metabólitos secundários. A via do mevalonato dá origem aos terpenoides e aos esteroides, enquanto que a via de condensação do acetato às acetogeninas (WALTON; BROWN, 1999).

De acordo com a sua origem, os metabólitos secundários podem ser classificados em três grandes classes: compostos fenólicos, terpenos e alcaloides (HARBORNE, 1999). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido malônico. Os terpenos são sintetizados a partir do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto. E os alcaloides são derivados dos aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), assim como dos aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina). Os compostos do metabolismo secundário das plantas, tais como carotenoides, compostos fenólicos, flavonoides e vitaminas E e C, contribuem para a atividade antioxidante e seu potencial terapêutico quando aplicados em humanos, além de destacarem-se por exercerem funções variadas no ciclo de vida da planta (WANG et al., 1997; VERPORTE; CONTIN; MEMELINK, 2002; SAURA-CALIXTO; GONI, 2006).

O interesse no metabolismo secundário vegetal tem sido crescente nos últimos anos, uma vez que muitas pesquisas têm sido conduzidas na área da nutrição humana, considerando que o consumo

destes metabólitos apresenta resultados promissores na prevenção de doenças como o câncer, disfunções cardiovasculares e outras patologias crônicas. Portanto, estimular o aumento dos conteúdos de compostos secundários nos tecidos vegetais, extraí-los, identificá-los, processá-los de forma adequada e utilizá-los de maneira que enriqueçam a composição química de determinados alimentos agregando valor nutricional, tem sido um desafio constante da biotecnologia vegetal, com recursos à engenharia metabólica (AHARONI; GALILI, 2010).

Devido as suas particularidades, em especial o baixo custo, a banana é uma fruta consumida em todo o mundo e pode ser considerada importante, sobretudo devido ao seu potencial como alimento funcional e nutracêutico. Além disso, uma atenção especial deve ser dada à potencialidade dos compostos de metabolismo secundário presentes nas cascas da fruta quando empregada em processos de regeneração de tecido cutâneo.

3.1. Carotenoides

São um grupo de compostos de coloração amarela e alaranjada encontrado em diversos sistemas biológicos. A estrutura básica de um carotenóide é um esqueleto tetraterpênico (40 átomos de carbono) formado por oito unidades de isopreno (C_5H_8) (GOODMAN; HUANG, 1965). Os carotenoides podem ser classificados em carotenos e xantofilas. Carotenos são hidrocarbonetos, tais como α e β -caroteno e licopeno (Fig. 4), enquanto xantofilas são derivados oxigenados dos carotenos e incluem os compostos luteína, β -criptoxantina, e zeaxantina (Fig. 5), por exemplo. Alguns carotenoides são também precursores de vitamina A (KURILICH; JUVIK, 1999).

Os carotenoides são sintetizados pela via isoprenoide (Fig. 6). O pirofosfato de isopentenila (IPP) é o precursor comum de muitos dos terpenos e nas plantas, a rota metabólica a partir do IPP ocorre nos plastídeos. A biossíntese de carotenoides é iniciada a partir da condensação de unidades de IPP até formar uma unidade C20 (pirofosfato de geranyl geraniol - GGPP). A condensação de duas unidades de GGPP é catalisada pela enzima fitoeno sintase (PSY), que produz o primeiro carotenóide, o fitoeno (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ, PAREDES-LÓPEZ, 2000; STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003; GROTEWOLD, 2006; TANAKA; SASAKI; OHMIYA, 2008).

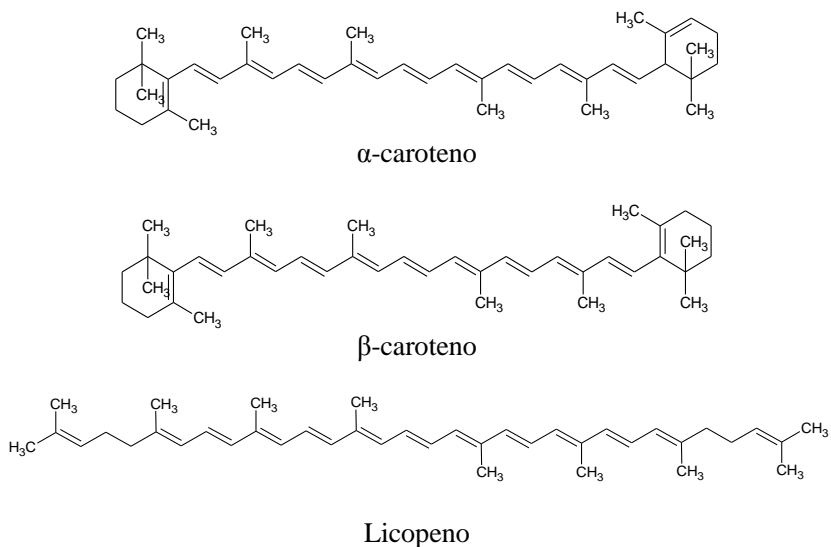


Figura 4. Detalhes da estrutura química de carotenos importantes à saúde humana (GOODMAN; HUANG, 1965).

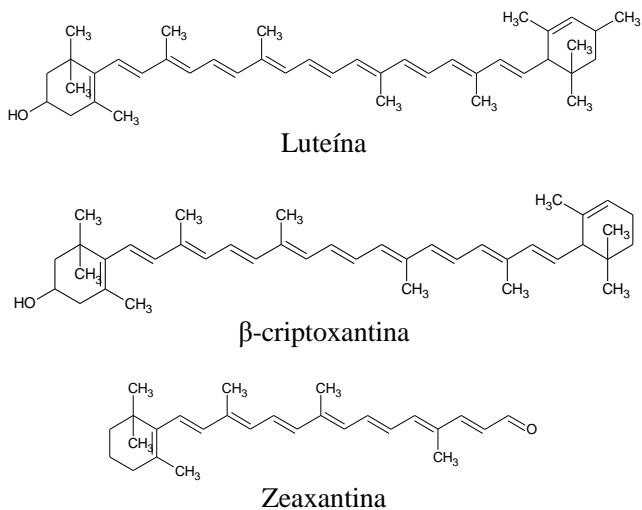


Figura 5. Detalhes da estrutura química das xantofilas de interesse à saúde humana (GOODMAN; HUANG, 1965).

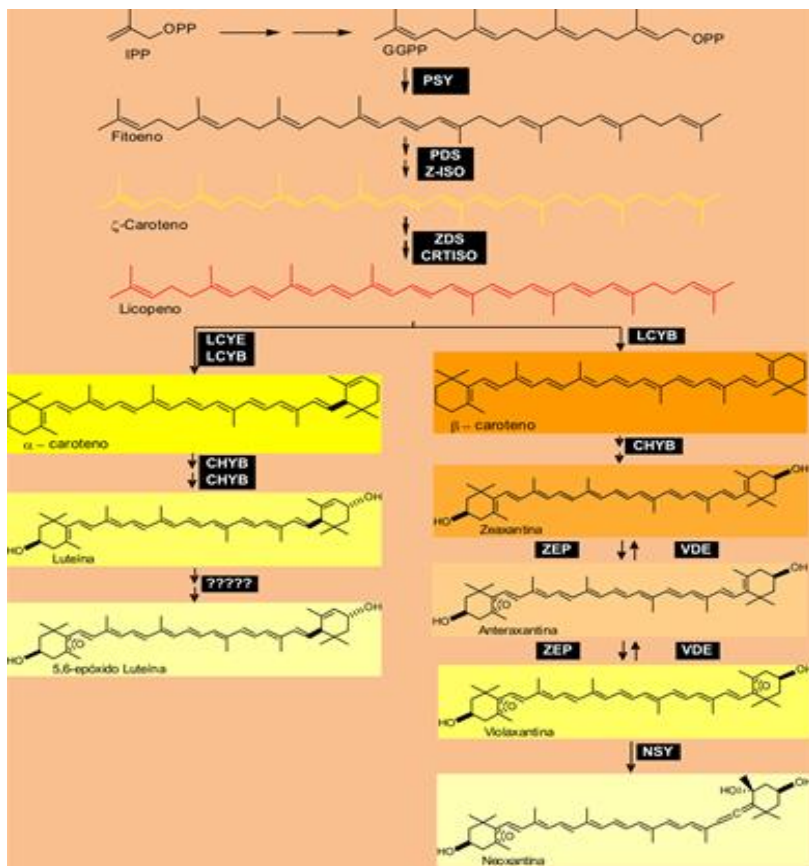


Figura 6. Via biossintética dos carotenoides em plantas (PSY: fitoeno sintase; PDS: fitoeno desaturase; ZDS: ζ-caroteno desaturase; LCYB: licopeno β-ciclase; LCYE: licopeno ε-ciclase; CHYB: β-anelhidroxilase; CHYE: ε-anelhidroxilase; ZEP: zeaxantina epoxidase; VDE: violaxantina de-epoxidase; CRTISO: carotenoide isomerase; NSY: neoxantina sintase) (HAMERSKI; RESENDE; SILVA, 2013).

Conforme a fig. 7, a conversão enzimática de pró-vitamina A em vitamina A ocorre principalmente na mucosa intestinal durante a absorção dos referidos precursores, protegendo contra a deficiência daquela vitamina. β-caroteno é o principal precursor de vitamina A para o organismo humano e sua conversão envolve a reação de clivagem central gerando duas moléculas de retinal (GOODMAN; HUANG, 1965) e a redução de retinal a retinol (FIDGE; GOODMAN, 1968).

Geralmente, a molécula de retinol é esterificada com ácidos graxos de cadeia longa e absorvido através da via linfática em associação com quilomícrons linfáticos (GOODMAN; HUANG, 1965).

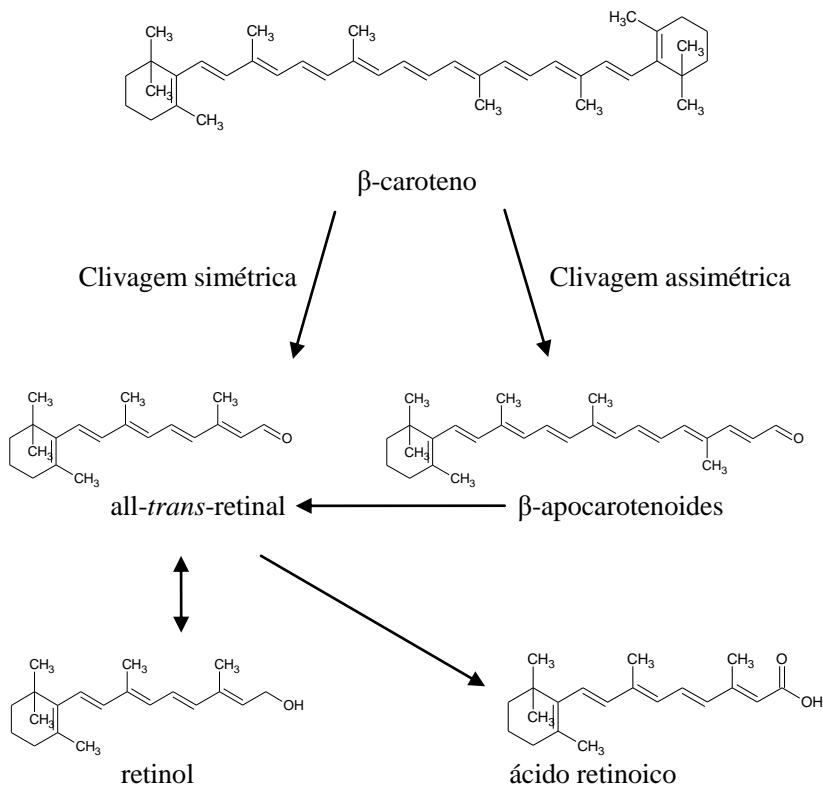


Figura 7. Uma molécula de β-caroteno pode ser clivada simetricamente por uma enzima intestinal gerando duas moléculas de all-*trans*-retinal. Esta é a etapa principal na síntese de vitamina A, i. e., a clivagem oxidativa da pro-vitamina A carotenoide por β, β-caroteno 15, 15'-monooxigenase (CHICHILI et al., 2005).

Nas plantas, os carotenoides participam do processo fotossintético absorvendo energia luminosa e transferindo-a para os centros de reação da clorofila (HARBONER, 1999), além de protegerem o aparato celular fotossintético contra danos foto-oxidativos (BARTLEY; SCOLNIK, 1995). Além disso, os carotenoides apresentam diversos efeitos benéficos à saúde como imunomoduladores e na

redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas, de câncer, das doenças cardiovasculares, de catarata e da degeneração macular (KRINSKY; JOHNSON, 2005; TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

A função biológica mais conhecida dos carotenoides é sua atividade pró-vitamina A, porém, outras funções têm sido atribuídas a essa classe de compostos. De acordo com Erdman e colaboradores (1993), α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, mas não o licopeno, são conhecidos como pro-vitaminas A. Os carotenoides são também substâncias antioxidantes naturais que contribuem à estabilidade dos alimentos, porém encontram-se distribuídos não uniformemente nos alimentos vegetais, concentrando-se na casca em relação à polpa de frutas (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001).

3.2. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos (Fig. 8) são formados por um ou mais anéis benzênicos com grupamentos hidroxil ligados como substituintes, assim como radicais metil, metoxil, amino e monossacarídeos. Na natureza, tais compostos são usualmente encontrados conjugados com mono e polissacarídeos, ou sob a forma de ésteres e ésteres metílicos (HARBONER, 1999).

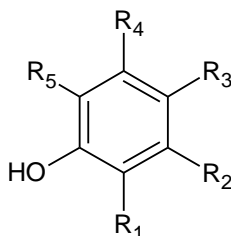


Figura 8. Estrutura química geral de compostos fenólicos. R1, R2, R3, R4 e R5: anel benzênico, hidroxil, metil, metoxil, grupos amino e/ou mono e polissacarídeos (HARBONER, 1999).

Duas rotas metabólicas básicas estão envolvidas na biossíntese dos compostos fenólicos, i.e. as rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico (Fig. 9). A rota do ácido chiquímico (Fig. 10) responde pela síntese da maioria dos compostos fenólicos presente nos vegetais, sendo

a rota do ácido malônico menos significativa nas plantas superiores (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Como pode ser observado na Fig. 9, o ácido chiquímico é formado pela condensação de dois metabólitos da glucose (fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fostato). O próximo passo dessa via é a formação do ácido corísmico, que gera os aminoácidos aromáticos triptofano, fenilalanina e tirosina, i.e., os precursores de vários alcalóides. A via do ácido chiquímico é presente em plantas, fungos e bactérias, mas não em animais. Por isso, os aminoácidos triptofano e fenilalanina são considerados essenciais. Como a tirosina pode ser formada a partir da fenilalanina, ela não é considerada essencial na dieta humana.

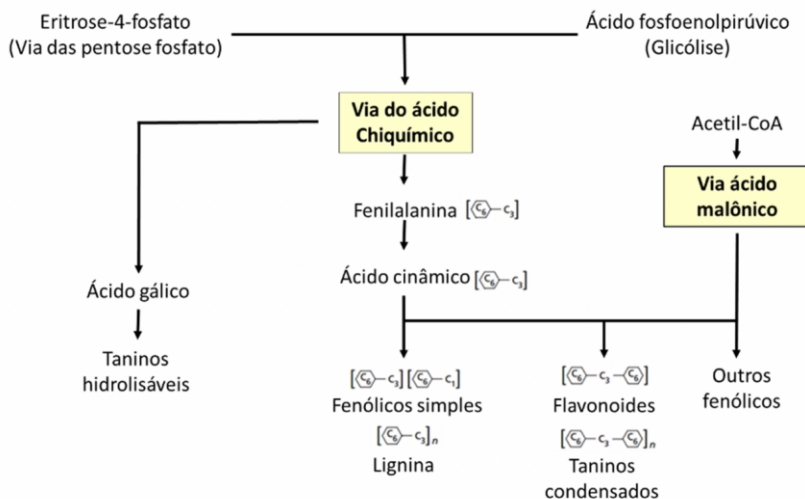


Figura 9. Vias biossintéticas de compostos fenólicos em vegetais superiores. Adaptado de Taiz e Zeiger (2009).

Os compostos fenólicos mais abundantes em vegetais são derivados da fenilalanina, via eliminação de uma molécula de amônia catalisada enzimaticamente pela fenilalanina amônia liase (FAL), originando o ácido cinâmico. A FAL está situada em um ponto de ramificação entre os metabolismos primário e secundário, com função reguladora importante na formação de muitos compostos fenólicos. A FAL é regulada por fatores ambientais como o nível nutricional, a luz e a infecção por fungos. Entre as substâncias formadas após a ação da

FAL estão o ácido benzoico, por exemplo, o qual dá origem ao ácido salicílico, um importante composto na defesa das plantas contra patógenos (TAIZ; ZEIGER, 1998).

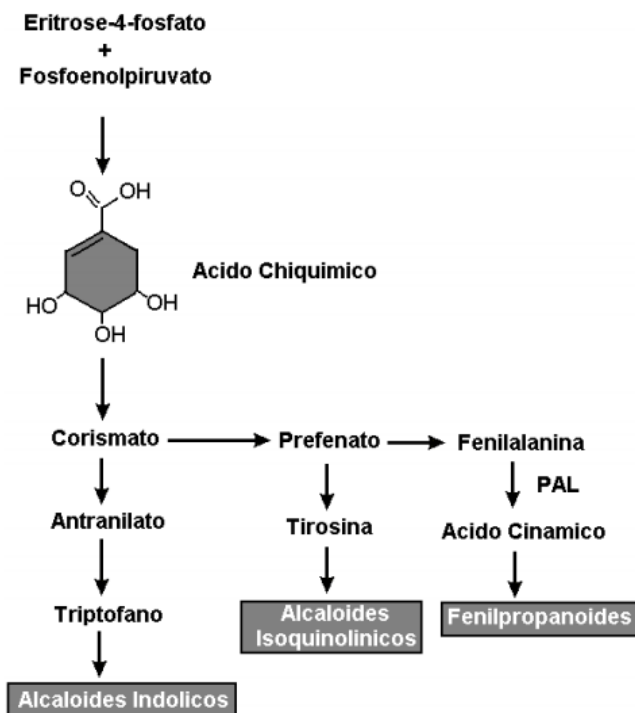


Figura 10. Via do ácido chiquímico para biossíntese de compostos fenólicos e alguns alcaloides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A atividade antioxidante em frutas pode ser considerada relevante, uma vez que elas são ricas em compostos fenólicos. Esse grupo de compostos pode ser dividido em fenóis simples e polifenóis, baseando-se no número de unidades de hidroxilas. O potencial antioxidante dos compostos fenólicos é baseado no número de radicais hidroxil presentes na estrutura aromática e pode ser resultante da sua potente atividade *scavenging* de radicais livres, além das suas propriedades de oxirredução, i.e., agentes redutores doadores de prótons, assim como supressores de oxigênio singlete. Estão largamente distribuídos nas plantas superiores e são capazes de captar o ânion superóxido e radicais hidroxila por transferência de elétron (RICE-

EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), bem como atividade quelante de metais (PATTANAYAK; SUNITA, 2008).

Uma gama de compostos polifenólicos tem sido identificada em frutas, com destaque aos derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, os flavonoides (flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis e flavanas) e taninos (KONDO et al., 1999).

Destaca-se a importância de estudos de caracterização da composição química dos metabólitos secundários, pois os compostos fenólicos têm mostrado propriedades protetoras contra a doença de Alzheimer e doença de Parkinson (GIASSON et al., 2002) e atividades biológicas importantes, como antitumoral (RAO et al., 1990), antiinflamatória (MAGGI-CAPEYRON et al., 2001), antiviral (KING et al., 1999) antibacteriana, antialérgica, antitrombótica e vasodilatadora (COOK; SAMMAN, 1996). Portanto, a fitoquímica das cascas de banana quanto ao perfil de composição de compostos fenólicos torna-se relevante no intuito de agregar valor a um resíduo da indústria de alimentos, com possível aplicação farmacológica.

3.3. Catecolaminas

As aminas biogênicas ou monoaminas são compostos orgânicos que contêm um átomo de nitrogênio na sua estrutura química, apresentam característica alcalina e baixo peso molecular. São sintetizadas e degradadas por aminação e transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica ou, principalmente, através da descarboxilação de aminoácidos como resultado do metabolismo normal de animais, vegetais e microorganismos (MAINTZ; NOVAK, 2007).

As catecolaminas são um grupo de aminas biogênicas que possuem um anel benzênico com dois substituintes hidroxila nas posições 3 e 4. Na fig. 11, detalhes da estrutura química da dopamina (1), norepinefrina (2) e epinefrina (3) são mostrados, as quais encontram-se amplamente distribuídas nos animais e em uma série de famílias de plantas (SMITH, 1977).

Entre os neurotransmissores do sistema nervoso central, existem algumas monoaminas muito importantes. Um grupo delas é formado por uma parte de cadeia alifática, a amina, e uma parte aromática, denominado grupamento catecol. Outro grupo de monoaminas contém o radical indol, e devido à presença desses dois tipos de radicais nas monoaminas estas substâncias são denominadas catecolaminas e indolaminas, respectivamente. As catecolaminas mais

conhecidas são a dopamina, a norepinefrina (noradrenalina) e a epinefrina (adrenalina). Por sua vez, a serotonina (5-hidroxitriptamina) é um neurotransmissor indolamínico (JUDAS et al., 2001; KATZUNG; BERTRAM, 2001).

O papel fisiológico das catecolaminas nos animais é muito bem estudado e conhecido. Tanto a epinefrina quanto a norepinefrina são sintetizadas e secretadas pela medula da glândula adrenal de mamíferos. O catabolismo das catecolaminas inicia com a metilação dos grupamentos hidroxil do anel catecol, seguida da oxidação do ácido homovanílico e do ácido vanililmandélico, com subsequente excreção pela urina (SMITH, 1980).

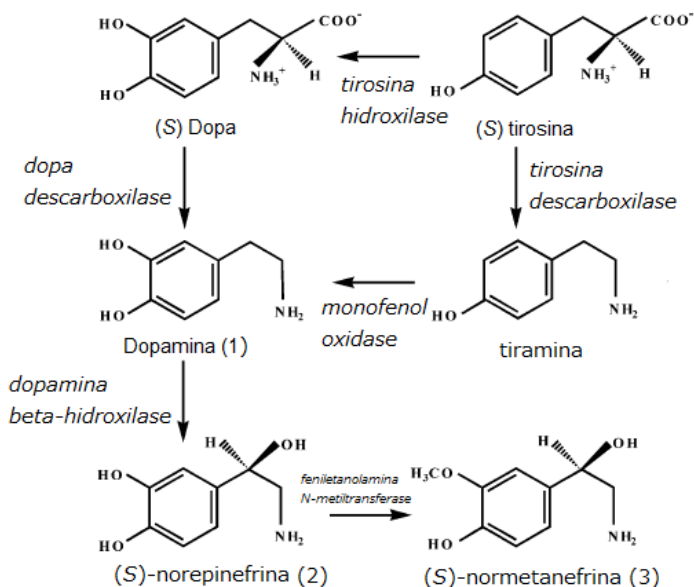


Figura 11. Rota biossintética de catecolaminas em vegetais superiores (Adaptado de SZOPA et al., 2001).

Em contraste com o vasto conteúdo de informações a respeito das catecolaminas e o seu papel nos seres humanos, muito pouco é conhecido quanto ao metabolismo destas aminas em plantas. As catecolaminas foram descritas pela primeira vez em plantas, durante o estudo dos mecanismos de ação e efeito terapêutico da polpa da banana (WAALES et al., 1958). Desde então, as catecolaminas, seus

precursores e derivados já foram determinados em uma série de espécies vegetais que em sua maioria fazem parte da alimentação humana (KIMURA, 1968). Vários relatos da literatura sugerem que as catecolaminas são precursores de alcaloides, como por exemplo o alucinógeno mescalina, identificado em várias espécies de cactos (LUNDSTROM, 1983), e o alcaloide tetrahydroisoquinolina (GUINAUDEAU; BRUNETON, 1993), ambos derivados da dopamina. Além disto, se observada a via de síntese dos compostos fenólicos (Figs. 9 e 10), é possível identificar os aminoácidos tirosina, triptofano e fenilalanina como, precursores de alcaloides, assim como das catecolaminas.

Na banana, a dopamina e a norepinefrina são formadas através da hidroxilação do proto-alcalóide tiramina. Conforme esquema apresentado na Fig. 11, a rota de biossíntese das catecolaminas nas plantas é semelhante nos animais.

O metabolismo normal da dopamina em humanos pode contribuir à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), citotóxicas na presença de íons de metais de transição como ferro, cobre e manganês (GIASSON et al., 2002; HALD; LOTHARIUS, 2005). Em condições fisiológicas, a dopamina é oxidada não-enzimaticamente pelo oxigênio molecular a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e quinonas. A formação de H_2O_2 , um composto que pode ser facilmente reduzido na presença do íon ferroso (Fe^{++} , i.e., reação de Fenton), contribui à geração do radical hidroxil (OH^*), uma espécie altamente reativa a qualquer macromolécula celular (HALD; LOTHARIUS, 2005). A catálise do radical hidroxil mediada pelo ferro pode ser um mecanismo patogênico chave que contribui com o estresse oxidativo observado na doença de Parkinson (DP - GERLACH et al., 1994). Em contraste com outras doenças neurodegenerativas, na DP há relativamente uma boa terapia sintomática. O atual tratamento padrão para a doença baseia-se na terapia de reposição de dopamina, além de agonistas dopaminérgicos, inibidores da enzima monoamina oxidase e/ou antagonistas de receptores colinérgicos (SCHAPIRA et al., 2006).

Diante da importância da dopamina no tratamento paliativo da DP, tornou-se interessante padronizar uma metodologia de extração e quantificação de dopamina e seu precursor L-dopa a partir das cascas de banana como fonte de matéria-prima vegetal destes compostos.

4. A cicatrização de lesões cutâneas

A pele é o maior órgão do corpo, atingindo 16% do peso corporal, e com múltiplas funções devido à sua estrutura e propriedades físicas, químicas e biológicas. Confere proteção mecânica ao organismo frente à penetração de agentes externos de qualquer natureza e, ao mesmo tempo, impede perdas de água, eletrólitos e outras substâncias do meio interno. A pele tem importante papel também na termorregulação do corpo e protege os tecidos adjacentes contra moderada exposição às radiações ultravioletas A e B, capazes de causar queimaduras e diversos tipos de câncer de pele. Além disso, a presença de células imunologicamente ativas faz da derme um local com intensa atividade imunológica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; SAMPAIO; RIVITTI, 2007).

Após uma lesão no tecido cutâneo, a reparação tecidual apresenta diversos mecanismos associados. Os processos de reparo de lesões têm sido estudados a partir dos mecanismos que envolvem fases distintas para que ocorra a regeneração tecidual e os eventos celulares associados. Mediadores químicos de natureza lipídica (eicosanoides) e de natureza peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos) estão intimamente associados aos processos de regeneração. Estes processos acontecem para que seja restabelecida a homeostasia tecidual, assim como a atividade funcional da pele (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

4.1. Breve histórico da cicatrização

Desde a antiguidade, o homem busca intervir no processo de cicatrização de feridas. Manuscritos egípcios, datados de 3000-2500 A. C., descrevem o uso de curativos utilizando mel, graxa, fios de linho e diversos tipos de excrementos. O Papiro de Edwin Smith, utilizado no Egito (5.000 A. C.), é conhecido como o documento cirúrgico mais antigo e se destaca por suas orientações sobre o tratamento de infecções (ZIMERMANN; VEITH, 1961). Hipócrates recomendava que as feridas fossem mantidas limpas com água morna, vinho e vinagre e secas (D'ACAMPORA et al., 2002).

Por volta da Segunda Guerra Mundial (1939-1945), iniciou-se o uso de substâncias com propriedades antissépticas e de agentes antimicrobianos, sendo que se procedia com a proteção das feridas utilizando-se curativos na forma de coberturas secas (SINCLAIR; RYAN, 1993).

A partir de 1970, tanto nos Estados Unidos da América quanto na Europa, novos recursos terapêuticos à cicatrização surgiram e, junto com eles, a necessidade de se conhecer seus reais benefícios. Essa preocupação fez com que os órgãos e agências sanitárias passassem a coordenar estudos para estabelecer critérios de avaliação e indicação de parâmetros que direcionassem uma adequada seleção para o tratamento de feridas (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

4.2. Aspectos gerais da cicatrização

A cicatrização é um dos processos biológicos mais complexos que se conhece. Após a lesão, diversas vias metabólicas são imediatamente ativadas e sincronizadas em resposta aquele estímulo. A cicatrização consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares, intra e intercelulares, que interagem determinando a repavimentação, a restauração tissular e a homeostase (SINGER; CLARK, 1999).

Os danos tissulares desencadeiam uma série de eventos que resultam da ativação de células nervosas, estromais, vasculares e sanguíneas. Os eventos se dão através de estímulos físicos ou por sinalização química através de estruturas das células rompidas (porções da membrana celular e organelas), fragmentos dos elementos inertes dos tecidos (colágenos, elastinas, fibronectinas, e outros), proteínas séricas que extravasam dos vasos rompidos e por ação de mediadores inflamatórios pré-formados (liberados principalmente dos grânulos das plaquetas, mastócitos e terminações nervosas periféricas) ou neossintetizados (eicosanóides e PAF). Essas moléculas, ao se ligarem a receptores na superfície da membrana das células locais, induzem modificações no seu metabolismo e na sua expressão gênica. Como resposta, há produção de uma segunda onda de mediadores de natureza lipídica (eicosanóides) e peptídica (citocinas, fatores de crescimento e neuropeptídeos) e a externalização de proteínas de adesão para leucócitos, nas células endoteliais na superfície da membrana voltada à luz dos vasos (CONTRAN; KUMAR; COLLINS, 2001).

Além disso, como decorrência do próprio trauma ou da ativação celular, o microambiente tem sua composição físico-química alterada com baixa tensão de oxigênio e diminuição de pH. Há presença de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, sendo esta uma outra forma de sinalização que ativa as células envolvidas no reparo tissular. Na continuidade do processo, ocorrem no tecido lesado a infiltração de células circulantes, como neutrófilos e monócitos, e a migração de

células das áreas adjacentes, como células epiteliais, queratinócitos e fibroblastos. Estas últimas, em cooperação com as células locais, anteriormente ativadas, serão as protagonistas da produção de colágeno pelos fibroblastos (fibroplasia) e deposição de matriz extracelular, formação de novos vasos (angiogênese), cicatrização e reepitelização da área lesionada (SINGER; CLARK, 1999).

Clark (1993) dividiu o reparo tecidual em três fases, conforme representado esquematicamente na Figura 12: 1) a inflamação, 2) a formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular e 3) a remodelação tissular, as quais se sobrepõem ao longo do tempo. Estas fases não são mutuamente excludentes, sendo sobrepostas no tempo e envolvem componentes da matriz extracelular, células residentes, ou seja, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células nervosas (CLARK, 1993). Há também a participação de leucócitos (neutrófilos, macrófagos/monócitos e linfócitos), bem como de mediadores lipídicos como prostaglandinas, leucotrienos e fator de agregação plaquetária e de mediadores protéicos como citocinas e fatores de crescimento. Os estágios iniciais do processo de cicatrização envolvem a síntese de colágeno, como componente principal, e de matriz extracelular. O colágeno contém, além de outros aminoácidos, quantidade substancial de hidroxiprolina que é um marcador bioquímico utilizado à determinação desta fibra nos tecidos (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

A primeira fase da cicatrização de uma lesão, a inflamação, ocorre imediatamente após o dano tecidual. Os componentes da cascata de coagulação, das vias inflamatórias e do sistema imune são necessários para evitar a perda de sangue, remover o tecido morto e desvitalizado e evitar a infecção. A hemostasia inicial ocorre através da formação de um tampão plaquetário, seguido por uma matriz de fibrina que forma uma rede e permite a infiltração de outras células. Os neutrófilos são então recrutados para a ferida em resposta à ativação do complemento, à degranulação das plaquetas e aos produtos de degradação bacteriana. Após 2-4 dias, os monócitos aparecem no leito da lesão e se diferenciam em macrófagos. Acredita-se que os macrófagos são cruciais na coordenação dos eventos tardios em resposta à lesão (CLARK, 1993; RICHES, 1996).

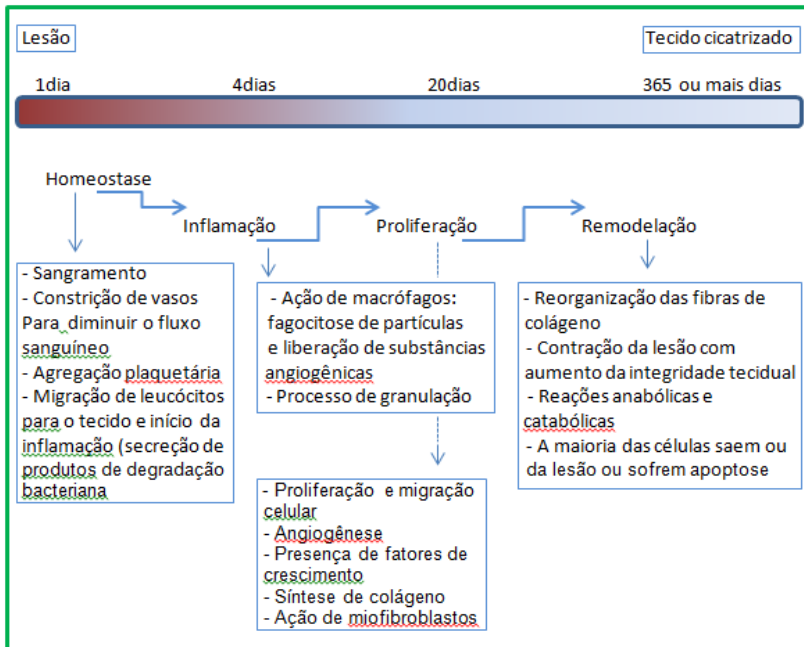


Figura 12. Fases do processo de cicatrização de uma lesão (CLARK, 1993; RICHES, 1996).

A segunda etapa da cicatrização, ou seja, a formação de tecido novo ocorre entre 2-10 dias após a lesão e é caracterizada por proliferação celular e migração de diferentes tipos de células. O primeiro evento é a migração dos queratinócitos para a derme. Em seguida, há formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese). Esses novos capilares associados aos fibroblastos e macrófagos substituem a matriz de fibrina com tecido de granulação, formando um novo substrato à migração de queratinócitos na fase tardia do processo de reparo da lesão. Os reguladores positivos mais importantes da angiogênese são o fator A de crescimento do endotélio vascular (VEGFA) e o fator 2 de crescimento de fibroblasto (FGF2 ou bFGF). A angiogênese também pode acontecer a partir do recrutamento de células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea, embora a magnitude desta contribuição seja pequena. Ao final dessa etapa, os fibroblastos que são atraídos a partir da borda da lesão ou da medula óssea são estimulados pelos macrófagos e alguns se diferenciam em miofibroblastos. Miofibroblastos são células contráteis que, ao longo do

tempo, aproximam as bordas da lesão. Fibroblastos e miofibroblastos interagem e produzem matriz extracelular, principalmente na forma de colágeno, o que constitui um tecido cicatricial com certo grau de maturidade (CLARK, 1993; RICHES, 1996).

A terceira etapa da cicatrização é a remodelação tissular. Esse processo se inicia 2-3 semanas após a lesão e tem duração de um ano ou mais. Durante essa etapa, todos os processos ativados após a lesão são gradualmente diminuídos e cessam. A maioria das células endoteliais, os macrófagos e os miofibroblastos sofrem apoptose ou saem da ferida, deixando uma massa que contém poucas células e consiste principalmente de colágeno e outras proteínas de matriz extracelular. Interações epitélio-mesenquimais continuamente regulam a integridade e a homeostase da pele (CLARK, 1993; RICHES, 1996).

Mais de 6-12 meses são necessários para que a matriz extracelular esteja ativamente remodelada, principalmente a partir de um molde de colágeno tipo III para um composto predominantemente por colágeno tipo I. Esse processo é realizado pelas metaloproteínas de matriz secretadas por fibroblastos, macrófagos e células endoteliais, e reforça a reparação tecidual. No entanto, o tecido cicatricial não recupera as propriedades de um tecido que nunca foi lesado. O reparo completo de tecidos resulta de alternâncias sucessivas de reações anabólicas e catabólicas. Além da atividade imunológica, os leucócitos estão intimamente envolvidos com as reações catabólicas de degradação de tecidos pela produção de proteases e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como com as reações anabólicas de formação de tecidos pela produção de fatores de crescimento (RICHES, 1996).

5. Contextualização da hipótese do estudo

O desenvolvimento da terapêutica moderna não teria sido possível sem a contribuição dos produtos naturais, principalmente das plantas superiores (PHILLIPSON, 2001). Os avanços nas técnicas de separação, purificação e identificação de misturas complexas, i.e., em estudos fitoquímicos, e a diversidade química presente na natureza são fatores importantes ao incremento do interesse por compostos de origem vegetal (COSTA, 2009).

Os benefícios da utilização de plantas medicinais geralmente resultam da combinação de metabólitos secundários, também denominado sinergismo entre os compostos, presentes nas matrizes vegetais complexas (WINK, 2003).

Várias são as espécies vegetais de interesse à pesquisa no contexto supracitado e um exemplo a ser considerado é a casca de banana. Baseado na alegação de um dado efeito terapêutico identificado na medicina popular, um material de origem vegetal pode tornar-se uma fonte de matéria-prima ao desenvolvimento de novos fármacos. Entretanto, costuma-se argumentar que não é possível recomendar o uso de formulações derivadas do conhecimento popular ou tradicional, dada à dificuldade em controlar o seu conteúdo em compostos bioativos, de forma análoga aos medicamentos alopáticos.

Assim, definiu-se que a hipótese deste estudo fundamenta-se na ideia de que os extratos de casca de banana da cultivar Prata Anã (*Musa sp.*) apresentam ação cicatrizante, consoante ao seu perfil de composição química. Assume-se que conhecendo a composição química dos extratos de casca de banana, é possível relacioná-la a sua ação terapêutica, i.e., capaz de promover a regeneração tecidual. E a associação do hidrogel de PVA ao EBA de cascas de banana resulta em um importante fitomedicamento à aplicação em processo cicatricial.

6. Objetivos

6.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil de compostos bioativos de extratos de cascas de banana orgânica (*Musa sp.*, cv. Prata Anã), obtidos por métodos de extração convencional e supercrítica, e comprovar o efeito cicatrizante *in vitro* e *in vivo* de extrato padronizado. Além disso, desenvolver um curativo, derivado de polímero sintético contendo substâncias naturais cicatrizantes, i.e. contendo extrato de cascas de banana padronizado.

6.2. Objetivos específicos

- determinar o conteúdo e o perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos e fenólicos totais de cascas de banana orgânica;
- extrair e determinar o conteúdo de L-dopa e dopamina de amostras de cascas de banana orgânicas *in natura*, secas a 45°C e liofilizadas;
- avaliar o potencial cicatrizante de extratos de cascas de banana orgânica, derivados de métodos convencional (assistido por ultrassom e microondas) e supercrítico, em modelo experimental *in vivo* de excisão de tecido epitelial;

- determinar o perfil espectral de 1D- e 2D-RMN de amostras de tecido epitelial ao longo do processo de cicatrização por excisão tecidual, em modelo animal de camundongos isogênicos Balb/C;
- desenvolver um dispositivo de cunho biotecnológico, em conexão com o uso de resíduos da indústria alimentícia, i.e., contendo extrato padronizado de casca de banana para o tratamento de lesões cutâneas.

7. Referências bibliográficas

AHARONI, A.; GALILI, G. Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 1-6, 2010.

ALBUQUERQUE, U. P. **Introdução à etnobotânica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2005. 158 p.

ANNADURAI, G.; JUANG, R. S.; LEE, D. J. Adsorption of heavy metals from water using banana and orange peels. **Water Science and Technology**, v. 47, p. 185–190, 2004.

BALBACH, A. **As frutas na medicina doméstica**. 21. ed. São Paulo: Editora M. V. P., 1945. 374 p.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 27-51, 2005.

BARDIYA, N.; SOMAYAJI, K. Biomethanation of banana peel and pineapple waste. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 73–76, 1996.

BARTLEY, G.E.; SCOLNIK, P.A. cDNA cloning, expression during development, and genome mapping of PSIZ, a second tomato gene encoding phitoene synthase. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 268, p. 25718-25721, 1993.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta: artigo de revisão. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCK, L.; MASSARO, D. Oxygen,

gene expression and cellular function. **Marcel Dekker**, v. 105, p. 1-25, 1997.

CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; SERGE, H.; NICOLAS, D.
L'amélioration des plantes tropicales. In: CIRAD-Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. France: **CIRAD ORSTOM**, 109-139, 2004.

CHICHILI, G.R.; NOHR, D.; SCHÄFFER, M.; LINTIG, J.; BIESALSKI, H.K. β -Carotene conversion into vitamin A in human retinal pigment epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, p. 3562–3569, 2005.

CLARK, R.A.F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 11, p. 647-661, 1993.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Fundamentos de Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1268p.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids, chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. **Nutricional Biochemistry**, v. 7, p. 66–77, 1996.

COSTA, P.R.R. Produtos naturais como ponto de partida para a descoberta de novas substâncias bioativas: Candidatos a fármacos com ação antiofídica, anticâncer e antiparasitária. **Revista Virtual Química**, v. 1, p. 58-66, 2009.

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. In: Towards Prolongation of healthy life span: practical approaches to intervention. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 435-443. 1998.

D'ACAMPORA, A.J.; ORTELLADO, D.K.; SCHEMES, K.E.; CÚTULO, L.R.A. Um pouco da história e evolução da medicina. **Revista CCS**, v. 20, p. 65-67, 2002.

DAVEY, M.W.; KEULEMANS, J.; SWENNEN, R. Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 176-184, 2006.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A.R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains--characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173–289, 2000.

ELISABETSKY, E. From indigenous disease concepts to laboratory working hypothesis: the case of “Nerve Tonics” from the Brazilian Amazon. *International Foundation for Science*, v. 19, p. S-11438, 1987.

EL-KHISHIN, D.A.; BELATUS, E.L.; EL-HAMID, A.A.; RADWAN, K.H. Molecular characterization of banana cultivars (*Musa* spp.) from Egypt using AFLP. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5, p. 272-279, 2009.

EMAGA, T.H.; ANDRIANAIVO, R.H.; WATHELET, B.; TCHANGO, J.T.; PAQUOT, M. Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantains peels. **Food Chemistry**, v. 103, p. 590-600, 2007.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Agência de Informação Embrapa**: Banana. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia40/AG01/Abertura.html>>. Acesso: 12 jan. 2014.

ERDMAN, J.W.JR.; BIERER, T.L.; GUGGER, E.T. Absorption and transport of carotenoids. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 691, p. 76-85, 1993.

ENSSLIN, L.; VIANNA, W.B. O design da pesquisa quali-quantitativa em engenharia de produção: questões epistemológicas. **Revista Produção On-Line**, v. 8, n. 1, 2008.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The world banana economy 1985-2002**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5102e/y5102e00.htm>>. Acesso em 12 jan. 2014.

FIDGE, N.H.; GOODMAN, D.S. The enzymatic reduction of retinal to retinol in rat intestine. **Journal Biology Chemistry**, v. 243, p. 4372–4379, 1968.

FUKUSAKI, E.; KOBAYASHI, A. Plant metabolomics: potential for practical operation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 347–354, 2005.

GIASSON, B.I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V.M.; TROJANOWSKI, J.Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radical Biology Medicine**, v. 32, p. 1264-75, 2002.

GOODMAN, D.; HUANG, H. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. **Science**, v. 149, p. 879–880, 1965.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. **Circulation**, v. 108, p. 1912-1916, 2003.

GROTEWOLD, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 761-780, 2006.

GUINAUDEAU, H.; BRUNETON, J. Isoquinoline alkaloids. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. *Methods in Plant Biochemistry*. **Academic Press**, v. 8, p. 373–419, 1993.

GUNASEELAN, V.N. Biochemical methane potential of fruits and vegetable solid waste feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 389–399, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. Oxford: Oxford University Press, 1999. 147 p.

HAMERSKI, L.; RESENDE, M.J.C.; SILVA, B.V. Usando as cores da natureza para atender aos desejos do consumidor: substâncias naturais como corantes na indústria alimentícia. **Revista Virtual Química**, v. 5, p. 394-420, 2013.

HARBORNE, J.B. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: CODY, B.; MIDDLETON, E.; HARBORNE, J.B. **Plant flavonoids biology and medicine**. New York: AlanLiss, 1986, 129 p.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants**. 2 ed. Taylor and Francis, 221-234 p., 1999.

HARDISON, A.; RUBIO, C.; BAEZ, A.; MARTIN, M.; ALVAREZ, R.; DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, v. 73, p. 153-161, 2001.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do planejamento, orçamento e gestão. **Produção agrícola municipal 2005**. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=740>. Acesso em: 12 jan. 2014.

INIBAP - International Network For The Improvement Of Banana And Plantain. **Net Working Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2001**. France, 2002.

INIBAP - International Network For The Improvement Of Banana And Plantain. **Celebrating 20 years of networking banana and plantain: Annual Report 2005**. France, 2006.

JENNY, C.; TOMEKPÉ, K.; BAKRY, F.; ESCALANT, J. V. Conventional Breeding of Bananas. In: JACOME, L.; LEPOIVRE, P.; MARIN, D.; ORTIZ, R.; ROMERO, R.; ESCALANT, J. V. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. **Proceedings of the 2nd International Workshop on Mycosphaerella leaf spot diseases held in San Jose, 2003**.

JUNG, C.F. **Metodologia Científica - Ênfase em Pesquisa Tecnológica**. 2003. Disponível em: <<http://www.jung.pro.br/moodle/>> Acesso em: 15/12/2013.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. 540 p.

KANAZAWA, K.; SAKAKIBARA, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 844-848, 2000.

KIMURA, M. Fluorescence histochemical study on serotonin and catecholamin in some plants. **Journal of Pharmacology**, 18, 162-168, 1968.

KING, P.J.; MA, G.; MIAO, W.; JIA, Q.; MCDUGALL, B.R.; REINECKE, M.G.; CORNELL, C.; KUAN, J.; KIM, T.R.; ROBINSON, W.E. Structure-activity relationships: Analogues of dicaffeoylquinic and dicaffeoyltartaric acids as potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and replication. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, p. 497-509, 1999.

KNAPP, F.F.; NICHOLAS, H.J. The sterols and triterpenes of banana peel. **Phytochemistry**, v. 8, p. 207-214, 1969.

KONDO, K.; KURIHARA, M.; MIYATA, N.; SUZUKI, T.; TOYODA, M. Mechanistic studies of catechins as antioxidants against radical oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p. 79-86, 1999.

KRINSKY, N.I.; JOHNSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, p. 459-516, 2005.

KURILICH, A.C.; JUVIK, J.A. Quantification of carotenoid and tocopherol antioxidants in *Zea mays*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 1948-55, 1999.

KUTCHAN, T.; DIXON, R.A. Physiology and metabolism. Secondary metabolism: nature 's chemical reservoir under deconvolution. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 227-229, 2005.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LUNDSTROM, J. Simple isoquinoline alkaloids. In: BROSSI, A. The Alkaloids. **Academic Press**, v. 21, p. 255-327, 1983.

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

MAGGI-CAPEYRON, M.F.; CEABLLOS, P.; CRISTOL, J.P.; DELBOSC, S.; LE DOUCEN, C.; PONS, M.; LEGER, C.L.; DESCOMPS, B. Wine phenolic antioxidants inhibit AP-1 transcriptional activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5646–5652, 2001.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393-410, 2003.

NAYAK, B.S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. **Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2007. 1-6 p.

ONWUKA, C.F.I.; ADETILOYE, P.O.; AFOLAMI, C.A. Use of household wastes and crop residues in small ruminant feeding in Nigeria. **Small Ruminant Research**, v. 24, p. 233–237, 1997.

PATTANAYAK, S.P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 241-247, 2008.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*).** 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PEREIRA, J.R.C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalín, heparina e alantóina. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, p. 603-608, 2003.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

POPPER, K. **A lógica da pesquisa científica.** São Paulo: Editora Cultrix, 1998. 140 p.

RAO, A.R.; SADHANA, A.S.; GOEL, H.C. Inhibition of skin tumors in DMBA-induced complete carcinogenesis system in mice by garlic (*Allium sativum*). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 28, p. 405–408, 1990.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICHES, D.W. Macrophage involvement in wound repair, remodeling and fibrosis. In: CLARK, R.A.F., (Ed.) **The molecular and cellular biology of wound repair**. 2° ed. New York: Plenum, 1996, 143-168 p.

ROBINSON, J.C. Distribution and importance; taxonomic classification, cultivars and breeding. In Robinson, J.C. **Banana and plantains**, 1996, 1–33 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. OMNI Research, 2001. 71 p.

SAMPAIO, S.A.P.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007. 147 p.

SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chemistry**, v. 94, p. 442-447, 2006.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudos de mercado SEBRAE/ESPM: Banana relatório completo**, 2008. 88 p.

SEYMOUR, G. B. Banana. In: SEYMOUR, J. E.; TUCKER, G. A. (eds) **Biochemistry of Fruit Ripening**, Chapman and Hall NY, 1993. 83-106 p.

SIES, H. **Oxidative stress**. United States of America: Academic press, 1985. 195 p.

SILVA, E.L.D.; MENEZES, E.M. **Metodologia da Pesquisa e Elaboração de Dissertação**. Editora da UFSC, 2005. 127 p.

- SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-746, 1999.
- SMITH, T.A. Phenethylamine and related compounds in plants. **Phytochemistry**, v. 16, p. 9-16, 1977.
- SOMEYA, S., YOSHIKI, Y., OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). **Food Chemistry**, v. 79, p. 351–354, 2002.
- STOVER, R.H., SIMMONDS, N.W. Classification of banana cultivars. In Stover, R.H.; Simmonds, N.W. **Bananas**. 3. ed. New York: Longman Scientific & Technical, 1987. 468p.
- STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247-269, 2003.
- SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p. 817-836, 2003.
- SZOPA, J.; WILCZYNSKI, G.; FIEHN, O.; WENCZEL, A.; WILLMITZER, L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC–MS. **Phytochemistry**, v. 58, p. 315–320, 2001.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant physiology**. California, The Benjamin/Cummings Publishing Co., 1998. 559 p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 762 p.
- TANAKA, Y.; SASAKI, N.; OHMIYA, A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. **The Plant Journal**, v. 54, p. 733-749, 2008.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, p. 100-110, 2004.

TEWARI, H.K.; MARWAHA, S.S.; RUPAL, K. Ethanol from bananas peels. **Agricultural Wastes**, v. 16, p. 135–146, 1986.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VERPORTE, R.; CONTIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Phytochemistry Review**, v. 1, p. 13-25, 2002.

VIJAYAKUMAR, S.; PRESANNAKUMAR, G.; VIJAYALAKSHMI, N.R. Antioxidant activity of banana flavonoids. **Fitoterapia**, v. 79, p. 279–282, 2008.

VILLAS-BÔAS, S.G.; GOMBERT, A.K. Análise do metaboloma, uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 36, p. 58-69, 2006.

VOET, D.; VOET, J.G. **Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2006. 1523 p.

WAALES, T.P.; SJOERDSMA, A.; GREVELING, C.R.; WEISSBACH, H.; UDENFRIEND, S. Serotonin, norepinephrine and related compounds in bananas. **Science**, v. 127, p. 648-650, 1958.

WALL, M.M. Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and payaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 434-445, 2006.

WALLER, D.P. Methods in ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 38, p. 189-195, 1993.

WALTON, N.J.; BROWN, D.E. **Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products**. London, 1999. 425 p.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, p. 3-19, 2003.

ZHANG, P.; WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; HAMAKER, B.R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility – a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 443–458, 2005.

ZIMERMANN, L.M., VEITH, I. **Great ideas in the history**. Baltimore Wilkins & Wilkins Co., 1961. 132 p.

Capítulo 1: Análise fitoquímica da casca de banana

1. Introdução

A análise fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos de espécies vegetais. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes no material amostral. Entretanto, caso o interesse seja restrito a uma classe específica de compostos ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada à elucidação estrutural e quantificação destes compostos de maior relevância, bem como ao seu isolamento (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2003).

Os produtos naturais têm desempenhado um histórico e importante papel no processo de descoberta de fármacos. Contudo, logo após a Segunda Guerra Mundial, estes foram relegados a um segundo plano, pois acreditava-se que a obtenção de fármacos deveria ser somente através da síntese de compostos. Por volta de 1970, quando a Organização Mundial de Saúde reconheceu os benefícios da medicina chinesa e com o surgimento de alguns importantes medicamentos obtidos de fontes naturais, cientistas e indústrias novamente se interessaram por esse ramo. Atualmente, os produtos naturais são responsáveis, direta ou indiretamente, por uma grande variedade de fármacos disponíveis na terapêutica moderna. Assim, pode-se dizer que neste século está se desenvolvendo uma nova química medicinal, a qual transmite a ideia de que, com recursos suficientes e em pouco tempo, muitas patologias que hoje permanecem sem tratamento adequado poderão vir a sê-lo de maneira mais eficiente (YUNES; CALIXTO, 2001).

Embora milhares de compostos oriundos de plantas e também obtidos de microorganismos já tenham sido determinados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas químicas com atividades de extrema importância à química medicinal e à agricultura (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Todos estes materiais podem ser submetidos a vários métodos de estudo no intuito de identificar e quantificar a sua composição química. É necessário realizar um *screening* dos extratos vegetais, por exemplo, os quais são constituídos de misturas complexas de compostos. Cabe ressaltar que entre todas as espécies existentes no planeta, apenas uma pequena porcentagem foi estudada até o momento e somente para algum

efeito específico. Técnicas como a espectrofotometria UV-visível, a ressonância magnética nuclear, as cromatografias líquida e gasosa, a espectroscopia de infravermelho e a espectrometria de massas procuram diminuir cada vez mais o tempo de isolamento e de determinação estrutural e quantitativa de compostos naturais relevantes.

Não há dúvidas de que conhecer as proteínas ou o genoma de um organismo é importante. Todavia, existe também um universo de pequenas moléculas orgânicas que interagem diretamente com essas macromoléculas (HALL, 2006). Metabólitos de baixo peso molecular atuam como substratos, inibidores ou ativadores alostéricos de uma enzima, por exemplo. Além disso, podem ser precursores de compostos importantes dentre as inúmeras rotas metabólicas celulares, ou até mesmo um resíduo metabólico de alguma via de síntese ou degradação de macromoléculas que por algum motivo é armazenada intracelularmente (ENGEL; JENSEN; FENICAL, 2002). Os metabólitos são divididos em primários e secundários. Os primários estão diretamente envolvidos nas vias de síntese e degradação de macromoléculas de qualquer ser vivo (DIXON, 2001). Os secundários são mais comuns em plantas e fungos (CHALLIS; HOPWOOD, 2003; HALL, 2006).

O nome dado às tecnologias de análise de metabólitos através de plataformas analíticas que geram grandes quantidades de dados é metabolômica. Neste contexto, de acordo com Rochfort (2005), desde o ano de 2001 é crescente o número de publicações relacionadas às análises de matrizes complexas, conforme a proposta deste estudo.

A técnica de ressonância magnética nuclear é bastante interessante do ponto de vista da aquisição de informações, uma vez que é uma técnica automatizada e capaz de atuar como uma ferramenta bastante eficaz na identificação de uma gama de compostos presentes em uma matriz extremamente complexa amostral. É uma técnica com alta reprodutibilidade, versátil, não seletiva e requer um preparo muito simples das amostras. Entretanto, esta técnica necessita de equipamentos especiais e recursos humanos altamente qualificados, acabando por limitar o seu uso (STRAUS, 2004). Devido a essas peculiaridades, a maioria dos grupos de pesquisa voltados aos estudos de metabolômica busca utilizar tanto a espectrometria de massa quanto a RMN uni- e bidimensional (ROBERTSON, 2005).

Um estudo fitoquímico conta com um leque de possibilidades, i.e., um conjunto de técnicas disponíveis, as quais podem ser consideradas ferramentas essenciais ao desenvolvimento de novos medicamentos, sejam eles fármacos ou fitoterápicos. Um dos

compromissos da fitoquímica é validar plantas medicinais consagradas pela medicina popular na procura de novos fitoterápicos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). Neste contexto, se insere a casca de banana. Há relatos na medicina popular descrevendo a aplicação da parte interna de cascas de banana em lesões cutâneas como as queimaduras (BALBACH, 1945). As cascas de banana madura também podem ser utilizadas como compressa a ser aplicada na lesão, no intuito de reduzir a dor ou inchaço. Uma vez que a parte interna da casca de banana apresenta propriedades antissépticas, ela pode ser aplicada diretamente na área lesionada (INIBAP, 2002).

Estudos fitoquímicos podem contribuir à determinação de alvos biológicos de importância médica, através da elucidação do mecanismo de ação de um dado produto natural. Além disso, podem determinar novos compostos ou elementos estruturais de importância na atividade, melhorar e simplificar as técnicas de controle de qualidade de fitofármacos (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). O estudo da composição fitoquímica de cascas de banana quanto ao teor e ao perfil de compostos carotenoídicos, fenólicos e de catecolaminas, é considerado relevante por estabelecer uma relação entre estes metabólitos secundários e a atividade biológica de extratos, i.e. daquela biomassa.

Analisando todas as fases do desenvolvimento da química de plantas medicinais, é possível evidenciar sua importância, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas também como fonte de novos e potentes fármacos. O desenvolvimento destes novos fitofármacos e fitoterápicos pode ser atingido em um país como o Brasil, considerando toda a diversidade e extensão da sua flora, a partir do momento em que o governo incentive esta prática e que sejam estabelecidas parcerias sólidas entre as universidades, os centros de pesquisa e as indústrias farmacêuticas (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

Em função do exposto, este capítulo descreve o estudo da composição química de amostras de cascas de banana, com ênfase na identificação e quantificação de compostos carotenoídicos, fenólicos e de catecolaminas, entre outros metabólitos, de *Musa* sp., cultivar Prata Anã. Para tal, extratos da biomassa de interesse foram analisados por espectrofotometria UV-visível, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase reversa e ressonância magnética nuclear ($^1\text{H-RMN}$).

2. Material e métodos

2.1. Pré-processamento do material vegetal

Amostras de bananas orgânicas (Fig. 13) foram cultivadas e coletadas mensalmente, no período de Julho-2010 a Fevereiro-2013, na Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), no município de Urussanga (SC, Fig. 14). Previamente às análises, as amostras de bananas foram higienizadas em água corrente e secas com papel toalha. Em seguida, as cascas dos frutos foram retiradas manualmente e submetidas à secagem em estufa, com fluxo de ar, até peso constante, ou liofilizadas. A biomassa seca foi acondicionada em sacos de polietileno contendo sachês de sílica e armazenada a -20°C .



Figura 13. Detalhes do cacho, frutos e do aparato foliar da bananeira (*Musa* sp., cv. Prata Anã) cultivada na estação experimental da EPAGRI (Urussanga, Santa Catarina).



Figura 14. Localização da área de plantio das bananas (*Musa* sp., cultivar Prata Anã). Estação Experimental da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI), município de Urussanga (Latitude 28°31'22" Sul; Longitude 49°19'3" Oeste), Santa Catarina.

2.2. Estabelecimento do protocolo de secagem e extração

Para a obtenção dos extratos organosolventes, amostras (1 g) de cascas de bananas maduras *i. in natura* (i.e., não submetida a processo de secagem), *ii. secas* à 45 °C sob fluxo de ar, *iii. secas* à 65 °C sob fluxo de ar, ou *iv. liofilizadas*, foram adicionadas de 15 mL de etanol (p.a.), solução etanólica acidificada (1% HCl p.a., v/v), metanol (p.a.), ou solução metanólica acidificada (1% HCl p.a., v/v). O material foi incubado em banho-maria (37 °C, 30min), seguida de centrifugação (4.000 rpm, 15 min) e coletada do sobrenadante para um ensaio piloto com o objetivo de determinar o conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de casca de banana), via espectrofotometria UV-visível.

2.2.1. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado nas amostras citadas no item 2.2, através do método descrito por Randhir, Shetty e Shetty (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. O reativo de Folin-Ciocalteu consiste da mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco. O molibdênio está no estado oxidado (cor amarela). Porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados complexos molibdênio-tungstênio de cor azul (Huang et al. 2005). A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão (epigallocatequina

galato - 50 $\mu\text{g/mL}$ -1250 $\mu\text{g/mL}$, $y = 0,0002x$, $r^2 = 0,99$) e os resultados foram expressos em equivalentes de epigalocatequina galato. As análises foram realizadas em triplicata e os conteúdos médios de compostos fenólicos totais foram comparados via análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad Instat® 3.

2.3. Determinação do perfil químico de extratos de casca de banana

A partir dos resultados obtidos no item 2.2.1, foram selecionadas as condições de maior rendimento de extração, considerando os processos de secagem e os solventes orgânicos utilizados. Assim, os extratos selecionados a análises detalhadas de composição química originaram-se de amostras de cascas de bananas seca à 45°C, adicionadas de água destilada ou solução MeOH-HCl 1% (v/v). Subsequentemente, o perfil químico destes extratos foi determinado no intuito de correlacionar aquela variável à atividade cicatrizante previamente observada por Pereira (2010).

2.3.1. Espectrofotometria de varredura UV-visível

O perfil espectral UV-visível (200 ηm a 1000 ηm) das amostras de extratos de cascas de banana foi determinado a partir de uma varredura exploratória. Cinco espectros foram coletados para cada amostra, com intervalo 1 ηm /ponto amostral. Os espectros foram normalizados e expressos em valores de absorbância para a janela espectral de 200 ηm a 1000 ηm .

2.3.2. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado conforme descrito no item 2.2.1.

2.3.3. Perfil cromatográfico (FR-CLAE-UV-Vis) de compostos fenólicos

Alíquotas (10 μL) de amostras de extratos de cascas de bananas foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C18 (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm \varnothing

interno, 5 μm partícula) e detector espectrofotométrico UV-visível (280 nm). A eluição utilizou H_2O : AcOH : $\eta\text{-BuOH}$ (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel, em fluxo de 0,8 mL/min. A identificação dos compostos de interesse (i.e., ácidos gálico, ferúlico, caféico, cinâmico, clorogênico, *p*-cumárico, quercetina, epicatequina, epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina galato) considerou os tempos de retenção e co-cromatografia de amostras padrões (Sigma - 100 $\mu\text{g/mL}$), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos analitos utilizou curva padrão externa de ácido gálico (5 $\mu\text{g/mL}$ – 300 $\mu\text{g/mL}$; $r^2 = 0,99$; $y = 35158x$), tendo como referencial a integral da área dos picos correspondentes. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 injeções consecutivas.

Os conteúdos médios de compostos fenólicos foram inicialmente submetidos à análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad InStat® 3.

2.3.4. Extração e quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-visível

Amostras de farinhas de casca de banana seca a 45 °C (1 g, peso seco) foram adicionadas de 20 mL de solução de hexano: acetona (v/v), contendo 100 mg/L de BHT (*tert*-butil-4-hidroxitolueno) e incubadas (40 min, ausência de luz). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm, 15 min), o sobrenadante coletado e concentrado sob fluxo controlado de N_2 . O extrato concentrado foi ressolubilizado em 3 mL de hexano e analisado quanto ao conteúdo de carotenoides totais por espectrofotometria UV-Vis (450 nm). A concentração total dos analitos foi calculada utilizando curva padrão externa de β -caroteno (1 $\mu\text{g/mL}$ –50 $\mu\text{g/mL}$, $y = 0,0552x$, $r^2 = 0,99$ - AMAN et al., 2001). As análises foram realizadas em triplicata e os conteúdos médios de carotenoides totais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad InStat® 3.

2.3.5. Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (RF-CLAE-UV-Vis)

Alíquotas (10 μL) de extratos obtidos no item 2.3.4 foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C18 de fase reversa (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm \varnothing interno, 5 μm partícula), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 μm) e detector

espectrofotométrico UV-visível operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos de interesse (i.e., α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína e zeaxantina) foi efetuada com base nos tempos de retenção determinados a partir da análise de amostras de padrões (Sigma – 100 μ g/mL), sob as mesmas condições experimentais.

Para efeitos de cálculo do conteúdo dos compostos carotenóidicos, foram utilizadas as curvas-padrão externa para: 1) quantificação de β -caroteno e isômeros alfa: 1 μ g/mL–50 μ g/mL de β -caroteno, $y = 0,055207x$, $r^2 = 0,99$; 2) quantificação de luteína, zeaxantina e β -criptoxantina: 1 μ g/mL–50 μ g/mL de luteína, $y = 7044,96x$, $r^2 = 0,99$, e a integral dos picos correspondentes. Aos dados de conteúdos médios (3 injeções consecutivas) de compostos carotenóidicos aplicou-se a análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad InStat® 3. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão.

2.3.6. Estabelecimento de protocolo de extração e quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

No intuito de quantificar o conteúdo de catecolaminas, especificamente L-dopa e dopamina, foi realizada uma gama de extrações a partir da biomassa vegetal, variando seu grau de maturação e processamento. Para a obtenção dos extratos, foram utilizadas cascas de banana *in natura* totalmente verde, parcialmente madura (biomassa com coloração verde e amarela) e madura (casca totalmente amarela), assim como amostras de cascas de bananas maduras e seca à 45 °C, ou liofilizadas. A proporção utilizada de casca de banana e solução de ácido clorídrico 0,1 M como solvente extrator foi de 1:3. As amostras foram maceradas em cadinho de porcelana, sonicadas por intervalos de tempo entre 0 e 60 min, centrifugadas (4.000 rpm, 10 min) e filtradas (0,22 μ m), previamente à análise cromatográfica.

Alíquotas (10 μ L) foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C18 de fase reversa (NST 033003, 30 mm x 3 mm x 0,3 μ m \varnothing interno) e detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 280 nm. A eluição utilizou tampão Tris (50mM, pH 7): metanol: acetonitrila (8: 1: 1, v/v/v) como fase móvel, em fluxo de 0,5 mL/min. A identificação e a separação dos compostos de interesse (L-dopa e dopamina) baseou-se

nos tempos de retenção de amostras de padrões analíticos (Sigma – 100 µg/mL), sob as mesmas condições experimentais.

Para efeito de cálculo do teor de catecolaminas, curvas-padrão externas de L-dopa (25 µg/mL–150 µg/mL, $y = 5930,2x$, $r^2 = 0,98$) e dopamina (25 µg/mL–150 µg/mL, $y = 4085,2x$, $r^2 = 0,94$) e a integral da área dos picos correspondentes foram utilizadas. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 injeções consecutivas. Os conteúdos médios de catecolaminas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad Instat® 3.

2.3.7. Determinação do perfil espectral de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H -RMN) dos extratos de casca de banana

Os experimentos de ressonância magnética nuclear foram realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), em Campinas/SP, sob a orientação da Dra. Ana Carolina de Mattos Zeri e auxílio da Dra. Silvana Rocco.

Para obtenção dos espectros de ^1H -RMN, alíquotas (7 mL) dos extratos aquosos de cascas de bananas foram liofilizadas. Na sequência, 100 mg de extrato liofilizado foram ressolubilizados em 850 µL de tampão fosfato-salino em água deuterada (PBS- D_2O) e centrifugado (10.000 rpm, 5 min). Uma alíquota (500 µL) do sobrenadante foi adicionada de 200 µL de padrão interno TSP 0,75%, m/v (2,2,3,3-tetradeutero-3-[trimetilsilil]propionato). De forma similar, foi preparado o extrato metanólico acidificado das cascas de bananas.

A atribuição das ressonâncias (δ ppm) do espectro de ^1H -RMN da amostra de extrato aquoso de casca de banana referente ao mês de julho de 2010 baseou-se nos dados de Fan (1996), Fan e Lane (2008) e Papotti e colaboradores (2010).

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H foram obtidos em condição padrão, em equipamento Varian Inova, operando em 500 MHz de frequência de ressonância de hidrogênio (MARASCHIN et al., 2002).

Os espectro de ^1H -RMN foram processados utilizando o software ACDFREE12 – NMR Processor®. Este *software* processa os dados obtidos de um espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) no formato denominado curva “fid” através da Transformada de Fourier. Ao aplicar-se a Transformada de Fourier, passa-se do domínio do tempo (s) para o domínio da frequência (ppm). Em seguida, foram indicados

pelo *software* os deslocamentos químicos (δ ppm) e, a partir disso, foram atribuídas às ressonâncias os compostos identificados de acordo com Fan (1996), Fan e Lane (2008) e Papotti e colaboradores (2010).

3. Resultados e discussão

3.1. Estabelecimento do protocolo de secagem e extração

Previamente às análises de determinação do perfil químico de extratos de cascas de bananas, realizou-se um ensaio piloto à quantificação de compostos fenólicos totais, com amostras daquela biomassa coletadas no mês de Julho-2010 e secas à 45 °C, 65 °C, ou liofilizadas. Adicionalmente, foram determinou-se a eficiência de recuperação de analitos de cinco solventes extratores, conforme descrito no item 2.2. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Métodos de secagem de cascas de bananas e solventes extratores - Ensaio piloto à determinação do conteúdo de fenólicos totais (mg/g de casca de banana) por espectrofotometria UV-visível.

	Água destilada	Etanol (p.a.)	Etanol (p.a.) acidificado (HCl 1%)	Metanol (p.a.)	Metanol (p.a.) acidificado (HCl 1%)
Casca <i>in natura</i>	0,111 ± 0,005 ^{α,β,γ}	0,212 ± 0,002 ^{α,β,γ}	0,316 ± 0,013 ^{α,β,γ}	0,242 ± 0,009 ^{α,β,γ}	0,962 ± 0,019 ^{α,β,γ}
Casca seca (45 °C)	0,255 ± 0,015 ^{β,γ}	0,245 ± 0,053 ^{β,γ}	0,911 ± 0,052 ^{β,γ}	0,392 ± 0,043 ^{β,γ}	2,810 ± 0,002 ^{β,γ}
Casca seca (65 °C)	0,178 ± 0,034 ^{α,γ}	0,154 ± 0,004 ^{α,γ}	0,261 ± 0,027 ^{α,γ}	0,165 ± 0,020 ^α	1,117 ± 0,031 ^{α,γ}
Casca liofilizada	0,145 ± 0,001 ^{α,β}	0,062 ± 0,001 ^{α,β}	0,759 ± 0,001 ^{α,β}	0,149 ± 0,013 ^α	2,630 ± 0,059 ^{α,β}

Nota: Diferenças estatísticas foram simbolizadas por α , β , γ onde α : em relação à casca seca (45 °C), β : em relação à casca seca (65 °C) e γ : em relação à casca liofilizada, considerando $p < 0,05$.

Uma análise do efeito da temperatura de secagem da biomassa em estudo (Tab. 1) sugere que o processamento pós-colheita utilizando estufa (45 °C, fluxo de ar constante) permitiu uma maior recuperação de metabólitos, comparativamente à amostra *in natura*. O procedimento de

secagem em estufa com fluxo de ar adotado visou à suspensão da atividade metabólica das substâncias presentes nas cascas, minimizando a degradação dos compostos químicos ali presentes. Todavia, o uso de temperaturas superiores, i.e. 65° C, pode afetar a atividade antioxidante e a estabilidade dos compostos fenólicos (DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012), conforme observado experimentalmente no presente estudo. Os resultados observados com as amostras de cascas de bananas *in natura* demonstram a importância da secagem do material vegetal, tanto para fins de armazenamento e conservação deste, quanto para a qualidade dos extratos obtidos a partir da biomassa seca. É sabido que em estudos fitoquímicos as etapas de coleta, armazenamento e preparo das amostras merecem atenção especial, de modo a evitar ao máximo a degradação ou transformação dos metabólitos pela ação de fatores como catálise enzimática, calor, luz, oxidação e alterações de pH (OLIVER; PALOU, 2000; TSAO; DENG, 2004; LAY et al., 2006).

Os compostos fenólicos são fitonutrientes largamente distribuídos em plantas e muito importantes por apresentarem propriedade antioxidante (LOLIGER, 1991; VELIOGLU et al., 1998). O princípio da função antioxidante é diminuir o processo oxidativo de moléculas através da inibição da iniciação ou propagação das reações em cadeia de oxidação dos radicais livres (NAMIKI, 1990). É função desta propriedade, os compostos fenólicos, geralmente, apresentam um número considerável de propriedades farmacológicas. Muitas destas propriedades são conhecidas como formas de prevenção eficiente de doenças em humanos (LINDLEY, 1998; PAPAS, 1999).

A extração de compostos fenólicos de biomassas vegetais, normalmente, considera o uso de solventes orgânicos e/ou de misturas destes. Entretanto, a eficiência da extração é afetada por uma série de fatores, entre eles o tipo de solvente utilizado que pode ser considerado o mais relevante (DORTA; LOBO; GONZÁLEZ, 2012). O dados derivados do uso dos solventes extratores etanol acidificado e metanol acidificado (Tab. 1) no presente trabalho corroboram esta afirmação. Além disso, a acidificação do meio extrator fornece íons H⁺, capazes de manter estáveis as substâncias antioxidantes, i.e. na sua forma reduzida, conferindo maior precisão ao método de quantificação (MOURE et al., 2001).

De outra forma, consoante aos resultados descritos no capítulo 2, o solvente extrator água destilada também foi selecionado, dado ao interesse em avançar na análise de seu perfil químico, no intuito de correlacioná-lo à atividade cicatrizante observada. A extração utilizando água destilada simula o uso da casca de banana descrito na medicina

popular brasileira (BALBACH, 1945) e corrobora os resultados obtidos no presente estudo. Além disto, ressalta-se que o extrato aquoso de cascas de bananas apresenta menor toxicidade, comparativamente aos extratos organosolventes. De fato, esta abordagem enquadra-se no contexto das “tecnologias de extração verde”, no sentido de permitir recuperar os compostos bioativos das cascas de bananas, sendo um dos principais objetivos deste trabalho. De acordo com Koch-Kukula et al. (2013), frações ricas em substâncias com propriedade *scavenger* de radicais livres, obtidas a partir de extrações utilizando solventes não-tóxicos, são potencialmente interessantes como suplementos de alto valor na dieta, em formulações farmacêuticas e na indústria de cosméticos.

3.2. Determinação do perfil químico de extratos de casca de banana

3.2.1. Espectrofotometria de varredura UV-visível

Os resultados dos perfis espectrofotométricos de varredura (200 nm-1000 nm – Fig. 15 e 16) revelaram certa similaridade entre as amostras de cascas de bananas secas à 45 °C, ao longo dos meses de coleta, i.e., Julho-2010 a Fevereiro-2013, obtidas a partir dos solventes água e solução metanólica acidificada (HCl 1%, v/v).

A espectrofotometria de varredura UV-visível é uma técnica bastante simples, utilizada na obtenção de perfis químicos a fim de proporcionar uma visão ampla da composição de extratos vegetais, e.g., classes de metabólitos secundários, direcionando a análise fitoquímica mais apurada. Segundo Bachereau et al. (1998), os comprimentos de onda que compreendem as absorbâncias máximas para compostos fenólicos são observados entre 290 e 380 nm. Todas as amostras apresentaram médias de absorbâncias superiores a 2 (duas) unidades naquela janela espectral, i.e., máximos de absorbâncias entre 300 nm a 375 nm para os extratos aquosos e entre 300 nm a 400 nm para os extratos MeOH-HCl 1% (Fig. 15 e 16 – setas indicativas). Em termos quantitativos, os dois sistemas extratores, i.e. água destilada e solução metanólica acidificada (HCl 1%), atuaram de forma eficiente e similar na extração de compostos fenólicos. Valores de 1 (uma) unidade de absorbância foram observados para ambos os sistemas extratores no comprimento de onda correspondente a 450 nm (Fig. 15 e 16 – setas indicativas), indicando a presença de compostos carotenoides (MÍNGUEZ-MOSQUERA et al., 2002)

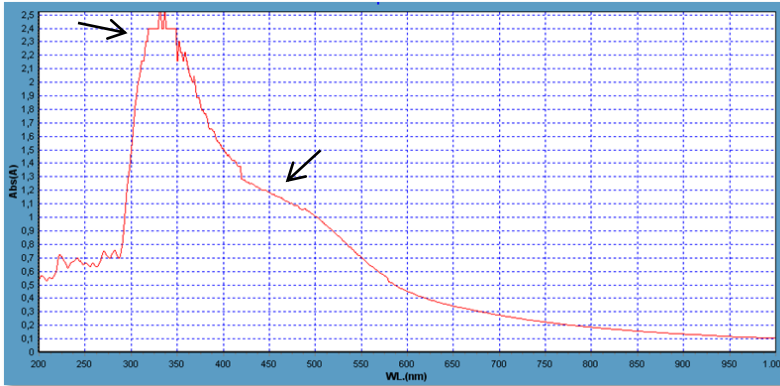


Figura 15. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200 \text{ nm}-1000 \text{ nm}$) do extrato aquoso de cascas de bananas secas à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n=3$). Setas indicativas dos valores máximos de absorvâncias.

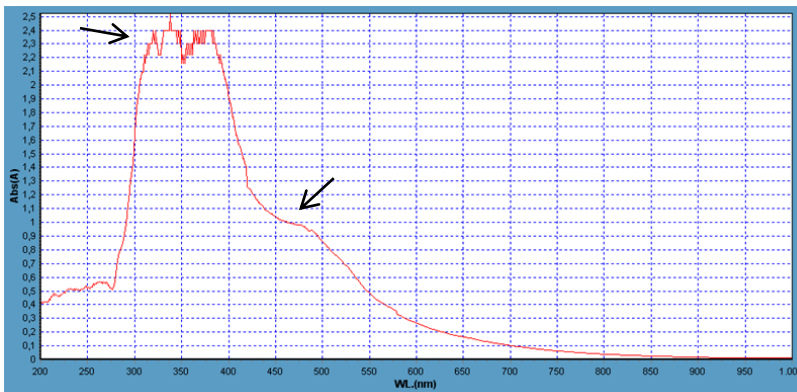


Figura 16. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200 \text{ nm}-1000 \text{ nm}$) do extrato metanólico acidificado (HCl 1 %) de cascas de bananas secas à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n=3$). Setas indicativas dos valores máximos de absorvâncias.

Com relação ao sistema extrator hexano: acetona (v/v), o perfil espectrofotométrico de varredura, indica a presença de carotenoides nas amostras de cascas de bananas seca à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, caracterizado pelos sinais na janela espectral entre 420 a 470 nm , possivelmente devido a presença de β -caroteno e de xantofilas (Fig. 17 – setas indicativas). De acordo

com Mínguez-Mosquera et al. (2002), os comprimentos de onda correspondentes às absorvâncias máximas para o β -caroteno são detectados em 429, 452 e 478 $\eta\text{m}_{(\text{acetona})}$. Por sua vez, as xantofilas luteína e zeaxantina apresentam máximas de absorvâncias em 430, 452 e 479 $\eta\text{m}_{(\text{acetona})}$. Além disso, foram observados valores de absorvância importantes na região espectral de 295 ηm , referentes a compostos fenólicos no extrato hexano: acetona (v/v) (BACHEREAU et al.,1998).

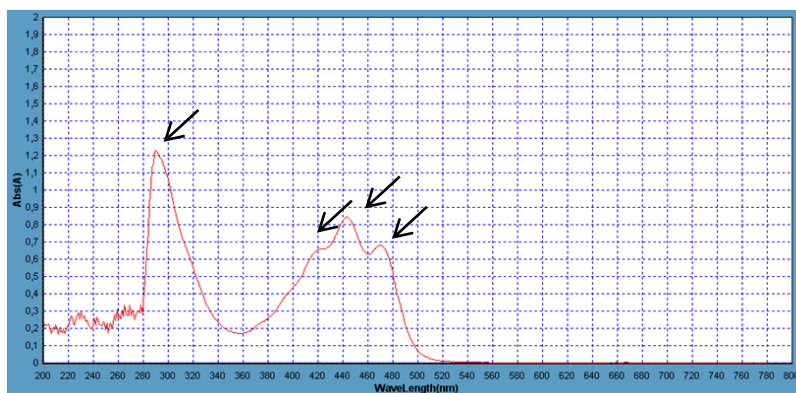


Figura 17. Perfil espectrofotométrico de varredura ($\lambda = 200 \text{ nm}$ - 800 nm) do extrato hexano: acetona (v/v – diluição 3x) de cascas de bananas secas à $45 \text{ }^\circ\text{C}$ ($n=3$). Setas indicativas dos compostos identificados.

A partir dos perfis espectrais de varredura UV-visível das amostras em estudo, comprovou-se a ocorrência de compostos fenólicos e carotenóidicos em quantidades apreciáveis, considerando-se os valores observados de máximas de absorvâncias típicas daquelas classes de metabólitos. Tal fato justificou a continuidade dos estudos de detalhamento do perfil químico daqueles extratos, conforme descrito na sequência.

3.2.2. Quantificação de compostos fenólicos totais por espectrofotometria UV-visível

A Figura 18 mostra a variação do conteúdo de compostos fenólicos totais no extrato bruto aquoso (EBA) de amostras de cascas de bananas seca à $45 \text{ }^\circ\text{C}$, coletadas no período de julho-2010 a fevereiro-

2013, determinado por espectrofotometria UV-visível. Nota-se que a concentração de compostos fenólicos totais no EBA variou entre $0,92 \pm 0,07$ a $34,53 \pm 3,89$ mg/g de casca seca ao longo do período analisado. A despeito de alguns valores bastante reduzidos de conteúdos daqueles metabólitos secundários, o genótipo em estudo caracteriza-se pela biossíntese/acumulação continuada dos compostos de interesse durante todos os meses do ano no tecido da casca do fruto, sugerindo a possibilidade de obtenção daqueles compostos bioativos independente da sazonalidade.

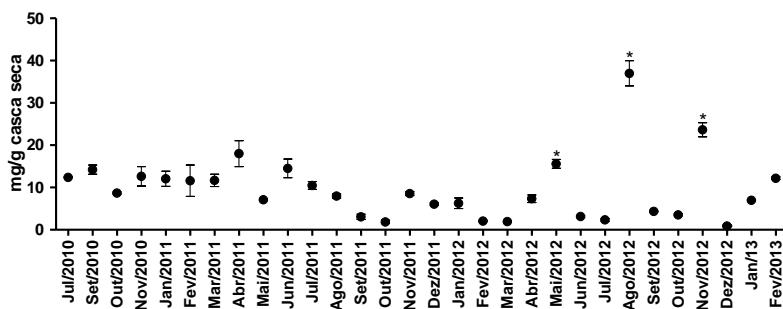


Figura 18. Conteúdo médio de compostos fenólicos totais em extrato bruto aquoso (EBA) de cascas de bananas secas à 45 °C, para o período amostral de Julho-2010 a Fevereiro-2013, determinado por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$.

De acordo com a fig.18, o mês de agosto de 2012 ($34,53 \pm 3,89$ mg/g de casca seca) foi estatisticamente o momento amostral com maior concentração de compostos fenólicos totais no EAB, seguido dos meses de novembro e maio de 2012 ($23,62 \pm 1,18$ e $15,61 \pm 0,74$ mg/g de casca seca, respectivamente). Nos meses de inverno do ano de 2011, principalmente, detectou-se uma queda significativa dos compostos fenólicos totais no EBA, enquanto que nos meses de março, abril e maio de 2012, i.e. no outono, uma tendência de reversão deste cenário foi observada. No entanto, o mesmo ocorreu no verão, entre os meses de dezembro de 2012, janeiro e fevereiro de 2013.

O conteúdo de compostos fenólicos totais de extratos MeOH-HCl 1% de cascas de bananas (45 °C) mostrou-se mais elevado (Fig. 19) em relação ao obtido com a extração em meio aquoso. As concentrações dos

analitos variaram de $3,47 \pm 0,25$ a $88,13 \pm 8,32$ mg/g de casca seca ao longo do período experimental. O mês de novembro de 2012 ($88,13 \pm 8,32$ mg/g de casca seca) foi estatisticamente o momento amostral com maior concentração de compostos fenólicos totais, seguido dos meses de junho e fevereiro de 2011 ($63,37 \pm 6,07$ e $55,91 \pm 10,45$ mg/g de casca seca, respectivamente). Em média, o extrato metanólico acidificado apresentou teores dos metabólitos em estudo superiores ao EBA em 2,5 ordens de magnitude.

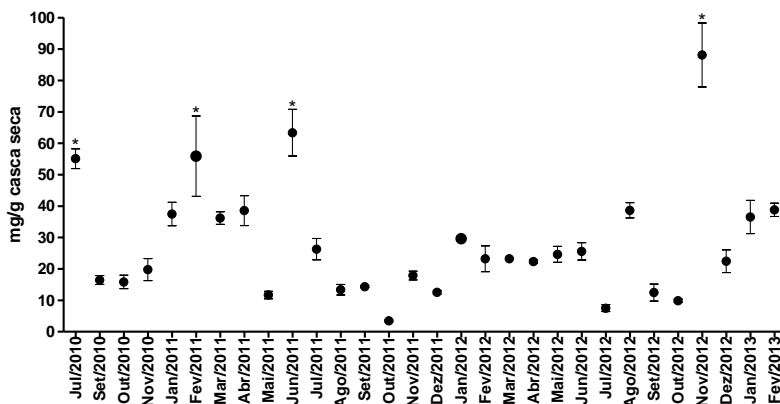


Figura 19. Conteúdo médio de compostos fenólicos totais em extrato metanólico acidificado (HCl 1%) de cascas de bananas secas à 45 °C, para o período amostral de Julho-2010 a Fevereiro-2013, determinado por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística ($p < 0,05$) foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais.

Diversos métodos e sistemas de solventes têm sido usados à extração de compostos fenólicos de biomassas vegetais (CHAVAN; SHAHIDI; NACZK, 2001). O tipo de solvente e a polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de prótons. O rendimento da extração depende tanto do solvente utilizado (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001; GRAY et al., 2002; YU et al., 2002; YILMAZ; TOLEDO, 2006), quanto do método aplicado, que pode ser baseado em mecanismos químicos diferentes. A solução acidificada tende a manter os compostos fenólicos protonados, evitando assim sua degradação durante o processo de extração e quantificação. Possivelmente, tal fato relaciona-se às concentrações mais elevadas destes compostos no

extrato metanólico acidificado. Além do rendimento, grande variação na composição dos extratos poderá ser observada, em função do sistema de solvente(s) utilizado (MOURE et al., 2001). Assim, as características físico-químicas dos sistemas solventes assemelham-se em maior grau às características da maioria dos compostos fenólicos presentes nas amostras avaliadas.

Um segundo resultado relevante refere-se a tendência observada de aumento de conteúdo dos compostos fenólicos totais, extraídos com solução metanólica acidificada, entre os meses de novembro de 2010 e junho de 2011, i.e., entre os meses de primavera, verão e outono. De outra forma, uma queda significativa e brusca do conteúdo foi detectada no mês de maio de 2011, porém sem razões plausíveis de caráter ambiental. Entre os meses de Janeiro-2012 a Junho-2012, i.e., verão e outono, a concentração de compostos fenólicos mostrou-se constante.

Bananas comumente consumidas no estado de Pernambuco, no Brasil, apresentam considerável conteúdo de compostos bioativos na polpa da fruta, como nas cultivares Pacovan e Comprida. Os conteúdos médios de compostos fenólicos totais detectados foram de $44,46 \pm 5,46$ e $52,02 \pm 4,22$ mg catequina equivalente/100 g de peso fresco, respectivamente (MÉLO et al., 2006). De acordo com Bravo (1998), a presença de compostos fenólicos em frutas e vegetais é bastante influenciada por fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação e tipo de cultivar.

A polpa e a casca da banana contêm várias substâncias antioxidantes como as vitaminas, os carotenoides e os compostos fenólicos (catequinas, epicatequina, lignina, taninos e antocianinas (SOMEYA et al., 2002; SEBRAE, 2008). Oito cultivares de banana, e.g., Mas, Kapas, Berangan, Tastali, Raja, Nangka, Awak e Nipah, da Malásia, sudeste da Ásia, foram escolhidas por Sulaiman e colaboradores (2011) para análise de acordo com o seu elevado consumo na comunidade e com sua disponibilidade no mercado local. O extrato aquoso da polpa de Awak apresentou o conteúdo de compostos fenólicos mais elevado ($0,36 \pm 0,01$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso fresco). A casca da cultivar Nangka revelou quantidades proeminentes desse metabólito secundário ($0,61 \pm 0,02$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso fresco). A extração aquosa de amostras secas apresentou um maior rendimento comparativamente à biomassa fresca (polpa de Raja: $76,37 \pm 1,79$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso seco e $0,20 \pm 0,02$ mg de equivalente de ácido gálico /g de peso seco; casca de Awak: $13,00 \pm 0,31$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso seco e $0,48 \pm 0,01$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso

fresco). A partir de um protocolo de extração sequencial utilizando organosolventes de diversas polaridades, em amostras de polpa seca, foram detectadas concentrações mais elevadas de compostos fenólicos totais em relação às amostras frescas. Na polpa de Kapas (extração com clorofórmio: $15,47 \pm 0,50$ mg de equivalente de ácido gálico/g peso seco e $5,48 \pm 0,13$ mg de equivalente de ácido gálico/g de peso fresco) (SULAIMAN et al., 2011).

Levando em consideração a grande variedade de conteúdos de compostos fenólicos totais entre as cultivares de banana da Malásia, tanto na polpa quanto nas casca das frutas, além dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se especular que tal heterogeneidade advém da condição da matéria-prima, i.e., fresca ou seca, da técnica de extração utilizada e/ou da cultivar em estudo.

Os compostos fenólicos estão localizados em estruturas subcelulares conhecidas como vacúolos (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990), os quais se rompem durante o processo de desidratação ou secagem, promovendo a liberação destes metabólitos (TOOR; SAVAGE, 2006). O teor residual de água permite que os solventes orgânicos, tais como o etanol e o metanol, por exemplo, possam interagir com a matriz da biomassa, aumentando a recuperação dos metabólitos secundários alvo (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990). Assim, enfatiza-se a importância da secagem do material vegetal utilizado no presente trabalho e os resultados obtidos em relação aos valores daquela variável oriundos de amostras *in natura*. As condições de extração com solução metanólica acidificada, a partir de cascas secas, proporcionaram a obtenção de teores mais elevados dos compostos de interesse em relação ao EBA e as demais biomassas citadas.

3.2.3. Análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Vários autores têm demonstrado não ser uma tarefa fácil encontrar um método único adequado à análise de um grupo diverso de compostos fenólicos devido à diversidade das estruturas químicas e variação de sensibilidade dos analitos às condições de extração (ANTOLOVICH et al., 2000; SOARES et al., 2013; KUKULA-KOCH et al., 2013; MENESES et al., 2013). A análise dos compostos fenólicos presentes de uma biomassa vegetal, via cromatografia líquida de alta eficiência, usualmente baseia-se na identificação destes compostos a partir de substâncias-padrão, submetidas às mesmas condições do ensaio.

De acordo com a Figura 20, temos o perfil cromatográfico típico do extrato metanólico acidificado das cascas secas de banana. Foram identificados o ácido gálico e as catequinas galocatequina e epigalocatequina, bem com o ácido clorogênico.

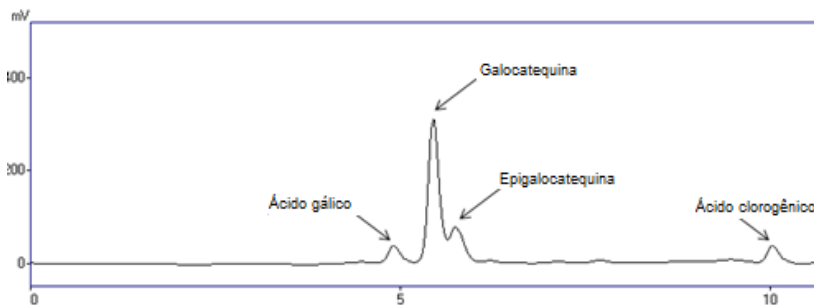


Figura 20. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (FR-CLAE-UV-Vis, 280nm) presentes no extrato metanólico acidificado e no extrato bruto aquoso da amostra de cascas de banana orgânica seca à 45 °C.

Nas Tabelas 2 e 3, são apresentados os conteúdos médios dos compostos fenólicos identificados nos extratos metanólico acidificado e bruto aquoso, respectivamente das amostras em estudo. Ao longo de todo o período analisado (julho/2010 a fevereiro/2013). Ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico foram os compostos fenólicos identificados e quantificados nas amostras de casca seca de banana.

Os valores dos teores médios de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico, determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, correspondem a $55,70 \pm 28,57$, $59,08 \pm 39,18$, $19,14 \pm 17,19$ e $6,60 \pm 4,69$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para o extrato metanólico acidificado (Tab. 2). Enquanto que os conteúdos médios dos compostos fenólicos, i e., ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico identificados no extrato bruto aquoso correspondem a $44,45 \pm 29,24$, $43,12 \pm 32,86$, $14,26 \pm 13,54$ e $3,38 \pm 2,45$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tab. 3).

A galocatequina é o composto fenólico majoritário presente em ambos os extratos provenientes de cascas secas de banana orgânica (extrato metanólico acidificado $59,08 \pm 39,18$ $\mu\text{g/mL}$ – Tab. 2; extrato bruto aquoso: $43,12 \pm 32,86$ $\mu\text{g/mL}$ – Tab. 3).

Tabela 2. Valores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 ηm), no extrato metanólico acidificado (HCl 1 %) de amostras de cascas de bananas secas à 45 °C.

	Ácido gálico		Galocatequina		Epigalocatequina		Ácido clorogênico	
Mês	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP
jul/10	31,22	5,23	173,13	0,91	47,80	1,42	15,98	3,71
set/10	91,38	4,43	47,04	3,94	22,48	1,24	4,10	0,67
out/10	91,95	7,00	20,24	1,98	27,45	2,02	4,57	0,93
nov/10	125,97	7,09	59,99	1,25	37,60	2,39	7,99	2,00
fev/11	30,49	0,66	153,93	8,51	52,09	2,00	19,17	0,68
mar/11	43,40	2,82	96,58	0,99	38,91	2,18	5,73	0,93
abr/11	102,15	2,41	103,55	0,63	38,70	0,61	9,53	0,94
mai/11	61,40	0,45	69,46	2,84	ND		2,46	0,20
jun/11	45,35	0,76	13,74	0,06	7,59	0,41	1,54	0,13
jul/11	24,86	2,37	45,90	1,27	1,95	0,10	1,05	0,91
ago/11	88,21	2,50	69,08	2,66	1,29	0,07	2,22	0,15
set/11	55,10	2,61	1,30	0,00	2,32	0,04	2,75	0,19
out/11	105,55	12,90	2,43	0,01	2,18	1,46	1,65	0,11
nov/11	30,86	2,31	8,42	0,79	4,74	0,45	5,60	0,82
dez/11	13,40	1,48	5,67	0,09	3,03	0,39	2,48	0,41
jan/12	17,74	0,25	9,94	0,22	7,34	0,30	8,31	0,20
fev/12	16,91	0,43	49,22	7,53	4,63	0,07	4,61	1,48
mar/12	ND		67,56	1,69	11,53	1,23	0,81	0,06
abr/12	29,54	1,77	58,87	4,15	12,13	1,56	1,33	0,23
mai/12	41,56	1,66	75,25	7,59	ND		15,75	1,94
jun/12	59,09	6,02	68,18	9,57	ND		11,71	1,31
jul/12	21,12	2,17	17,35	0,50	29,07	3,83	2,00	0,32
ago/12	91,34	3,17	75,53	3,22	1,57	0,09	2,41	0,02
set/12	61,77	0,74	1,52	0,10	3,48	0,23	3,03	0,19
out/12	133,88	7,63	2,87	0,13	1,57	0,13	2,48	0,15
nov/12	35,61	1,44	33,60	2,91	11,08	0,69	7,22	2,38

	Ácido gálico		Galocatequina		Epigalocatequina		Ácido clorogênico	
Mês	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP
dez/12	43,06	3,13	62,49	9,07	ND		15,33	1,90
jan/13	30,70	0,58	178,29	3,26	65,48	3,46	16,35	0,58
fev/13	36,01	0,42	142,27	2,87	49,52	2,14	13,22	0,31
Média	55,70	28,57	59,08	39,18	19,14	17,19	6,60	4,69

Tabela 3. Valores médios (µg/g de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina e ácido clorogênico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm), no extrato bruto aquoso (EBA) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.

	Ácido gálico		Galocatequina		Epigalocatequina		Ácido clorogênico	
Mês	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP
jul/10	10,09	1,25	109,27	2,08	24,09	0,31	2,42	0,25
set/10	81,03	1,87	38,23	0,78	12,28	0,60	3,15	0,61
out/10	76,56	0,99	10,79	0,66	5,01	0,78	2,01	0,20
nov/10	102,47	0,67	42,35	2,36	1,55	0,12	3,38	0,17
fev/11	60,51	0,81	86,04	3,12	87,75	1,59	17,06	0,23
mar/11	37,50	0,71	89,68	0,52	35,02	2,03	4,67	0,32
abr/11	18,30	3,23	39,51	11,63	29,79	0,26	1,84	0,18
mai/11	68,38	0,87	75,01	8,86	ND		1,87	0,37
jun/11	94,52	21,88	76,19	4,05	ND		1,11	0,25
jul/11	109,95	9,13	110,67	6,57	36,77	4,32	3,28	0,48
ago/11	10,07	2,32	54,90	7,76	1,21	0,86	1,06	0,15
set/11	80,22	5,01	0,63	0,29	2,40	0,09	1,18	0,22
out/11	87,90	0,71	16,22	1,77	1,60	0,66	1,97	0,67
nov/11	18,52	0,66	7,33	0,89	3,15	0,27	4,08	0,52
dez/11	5,94	0,90	5,06	0,91	2,07	0,92	1,37	0,66
jan/12	43,07	1,69	7,08	2,69	2,88	0,19	2,08	0,11
fev/12	31,50	1,42	16,02	3,79	4,27	0,87	1,99	0,73
mar/12	ND		12,24	1,22	7,43	0,84	1,92	0,02

Mês	Ácido gálico (µg/g)	DP	Galocatequina (µg/g)	DP	Epigalocatequina (µg/g)	DP	Ácido clorogênico (µg/g)	DP
abr/12	38,98	10,40	7,89	0,55	5,87	1,74	1,34	0,21
mai/12	13,36	0,51	45,36	1,62	14,63	3,42	0,77	0,05
jun/12	17,34	1,56	23,19	1,61	6,44	0,20	0,80	0,06
jul/12	4,37	0,13	16,12	2,67	32,38	3,38	5,15	0,06
ago/12	86,77	0,51	64,76	3,41	0,98	0,11	1,01	0,10
set/12	50,04	0,47	0,99	0,28	1,89	0,11	1,89	0,23
out/12	11,92	1,11	17,14	1,75	0,63	0,22	1,98	0,33
nov/12	9,98	3,60	9,52	0,08	32,80	9,30	1,70	0,09
dez/12	34,09	2,15	29,34	2,48	5,21	0,55	2,06	0,39
jan/13	21,27	0,94	120,08	0,56	8,93	1,73	13,09	0,12
fev/13	20,02	1,87	118,86	0,91	17,99	0,21	11,81	0,22
Média	44,45	29,24	43,12	32,86	14,26	13,54	3,38	2,45

Considerando os ensaios *in vivo*, descritos no Capítulo 2, é possível afirmar que o conteúdo de galocatequina presente no EBA proveniente de biomassa vegetal de cascas de bananas, no período amostral julho-2010 a fevereiro-2013 (Tab.), é suficiente para suprir as doses de tratamento utilizadas no modelo animal de cicatrização epitelial aplicado neste estudo.

O rendimento médio de extração foi de aproximadamente 85 mg de EBA/g de casca de banana seca (45 °C). Considerando-se que a dose de tratamento utilizada corresponde a 50 mg de EBA/kg/dia e o peso de um camundongo é de aproximadamente 20g, temos uma dose diária de tratamento equivalente a 1mg de EBA. De acordo com os resultados obtidos com a aplicação do EBA no tratamento de lesões epiteliais em camundongos, o período para cicatrização total da lesão é de 9 dias. Assim, são necessários 9mg de EBA/animal durante todo o tratamento da lesão epitelial. O extrato utilizado no tratamento dos animais foi obtido das cascas do mês de março de 2011 e contém 89,68 µg de galocatequina/g de casca seca. Sendo assim, tem-se:

85mg de extrato - 1 g de casca - 89,68 µg de galocatequina
 9 mg de extrato - X - Y

X = 0,106 g de casca de banana/animal/9dias

Y = 9,506 µg de galocatequina /animal/9dias

Supondo que os cálculos realizados para um camundongo de 20 g sejam extrapolados diretamente para um adulto de 70 kg, é possível inferir que os valores de X e Y ilustram a viabilidade de produção de um fitoterápico com potencial cicatrizante a partir de cascas de bananas secas à 45 °C. A dose diária de EBA necessária ao tratamento de uma lesão epitelial com dimensões equivalentes seria de 3,5 g de EBA/dia, i.e., aproximadamente 41 g de cascas de bananas secas e 3,68 mg de galocatequina. Além disso, seguindo esta linha de raciocínio e considerando que o peso da casca de uma banana, por exemplo, equivale a 30g (75 % de sua massa referem-se à água – dados não mostrados), seria necessário um total de 5,5 frutas, do mês de março/2011, à obtenção de uma dose para tratamento de um paciente adulto.

As amostras dos meses de setembro/2011, novembro/2011, dezembro/2011, janeiro/2012, abril/2012 e setembro/2012 apresentaram conteúdo de galocatequina inferior a 10 µg/g de casca seca. Entretanto, cabe ressaltar que um cacho de bananas da cultivar Prata Anã pesa em torno de 25 kg. Considerando o teor de umidade das frutas, a quantidade de biomassa vegetal necessária para os processos de extração e obtenção de compostos fenólicos de interesse, como exemplo a galocatequina, satisfaz a produção em larga escala de um possível fitomedicamento.

O consumo de frutas tem aumentado principalmente em decorrência do seu valor nutritivo e efeitos terapêuticos. As frutas contêm diferentes substâncias derivadas do seu metabolismo secundário, como exemplo os compostos fenólicos, que apresentam propriedades antioxidantes, além de outras atividades biológicas relacionadas ao retardo do envelhecimento e a prevenção de certas doenças, como o câncer (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; WANG et al., 1997). Estudos têm demonstrado que compostos fenólicos provenientes de casca de banana (*Musa acuminata* Colla AAA) apresentam atividade como inibidores da peroxidação lipídica, conforme descrito por González-Montelongo, Lobo e González (2010). As bananas têm sido recomendadas em dietas para indivíduos com distúrbios no sistema digestivo. A propriedades antiulcerogênicas atribuída à fruta foi descrita, pela primeira vez, por Elliot e Heward (1976), e confirmada por outros pesquisadores (BEST; LEWIS; NASSER, 1984; GOEL; TAVARES; BENNETT, 1989; DUNJIC et al., 1993). Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos conhecidos pelas suas atividades anti-inflamatória, antitumoral e hepatoprotetora (HAVSTEEN, 1983), além

de ter demonstrado atividade ao reduzir a secreção de ácido a partir das células parietais gástricas (BEIL; BIRKHOLZ; SEWING, 1995). Assim, se destaca a importância da composição química, em termos de compostos fenólicos das cascas de banana ora estudadas, atribuindo a estas atividades relacionadas ao aumento da proliferação celular em processo de regeneração, por exemplo.

3.2.4. Quantificação de carotenoides totais por espectrofotometria UV-visível

Os animais são incapazes de sintetizar os compostos retinóicos, obtendo-os a partir da dieta na forma de vitamina A ou seus precursores. A vitamina A tem características lipossolúveis e ocorre majoritariamente em duas formas na natureza, i.e., na forma de ésteres de retinol, a partir de fontes de alimentos de origem animal, ou sob a forma de pró-vitamina A em diversas plantas. Neste último caso, o exemplo mais comum é o carotenoide β -caroteno, um precursor da vitamina A, também denominado provitamina A, pois sua atividade como vitamina A somente é observada após sua conversão nos organismo humano a retinol (CHICHILI et al., 2005).

A determinação do teor total de compostos carotenóidicos em casca de banana por espectrometria UV-visível mostrou que as amostras coletadas nos meses de abril de 2011, novembro de 2011, julho de 2012, setembro de 2010 e maio de 2012 ($321,38 \pm 1,74$; $313,00 \pm 0,93$; $278,11 \pm 29,65$; $256,26 \pm 7,61$ e $239,58 \pm 0,29$, respectivamente) apresentaram os conteúdos significativamente mais elevados destes metabólitos secundários (Fig. 21).

Em dois momentos amostrais constatou-se uma tendência de aumento do conteúdo de carotenoides nas cascas de banana, respectivamente nos meses de abril, maio e junho de 2011, assim como abril e maio de 2012 (outono), e nos meses de dezembro de 2011, janeiro e fevereiro de 2012 (verão).

Há vários relatos na literatura a respeito da existência de genótipos de banana ricos em pigmentos carotenóidicos. Setiawan e colaboradores (2001) determinaram o conteúdo de carotenoides totais de 18 frutas, incluindo a banana (*Musa paradisiaca*), comumente consumida em West Java, na Indonésia. Os autores detectaram uma elevada amplitude de conteúdos entre amostras quanto ao conteúdo de β -criptoxantina, licopeno e β -caroteno, corroborando os achados do presente trabalho, conforme descrito no próximo item.

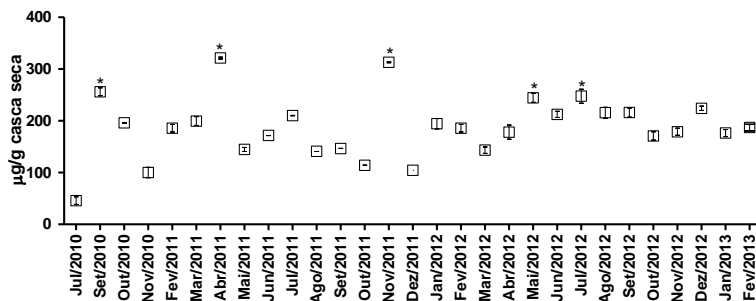


Figura 21. Conteúdo médio de carotenoides totais ($\mu\text{g/g}$ casca seca) em extrato hexano: acetona (1: 1,v/v) de cascas de bananas secas à 45 °C, das amostras de Julho de 2010 a Fevereiro de 2013, por espectrofotometria UV-visível. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$.

3.2.5. Análise de compostos carotenóidicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

No perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos de cascas de bananas (Fig. 22), extraídos com o sistema de solventes orgânicos hexano: acetona (v/v), se destacam os compostos luteína, zeaxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno. Nas Tabelas 4 e 5 são apresentados os conteúdos médios dos carotenoides identificados no extrato organosolvente das amostras em estudo. Ao longo de todo o período analisado (julho/2010 a fevereiro/2013), luteína, zeaxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno foram identificados em todos os meses.

Os valores médios de luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno correspondem a $40,70 \pm 5,41$, $7,08 \pm 0,99$, $1,16 \pm 0,39$, $140,52 \pm 7,34$, $141,60 \pm 6,43$ e $85,55 \pm 5,55$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Somente o carotenoide β -criptoxantina não foi detectado em todas as amostras. Os carotenoides majoritários presentes na casca de banana pertencem à classe dos carotenos, e.g., *trans*- β -caroteno ($260,81 \pm 3,53$ $\mu\text{g/mL}$), α -caroteno ($245,73 \pm 7,25$ $\mu\text{g/mL}$) e *cis*- β -caroteno ($160,59 \pm 5,37$ $\mu\text{g/mL}$) (Tab. 4 e 5).

O β -caroteno é o principal carotenoide pró-vitamina A à contribuir para manutenção de níveis adequados de vitamina A no organismo humano e sua conversão, nas células da mucosa intestinal, envolve uma reação de clivagem central gerando duas moléculas de

retinal (GOODMAN; HUANG, 1965), seguida de uma reação de redução que converte retinal em retinol (FIDGE et al., 1968). A molécula de retinol é esterificada, principalmente, com uma longa cadeia de ácidos graxos e absorvida via sistema linfático em associação com os quilomicrons (GOODMAN; HUANG, 1965).

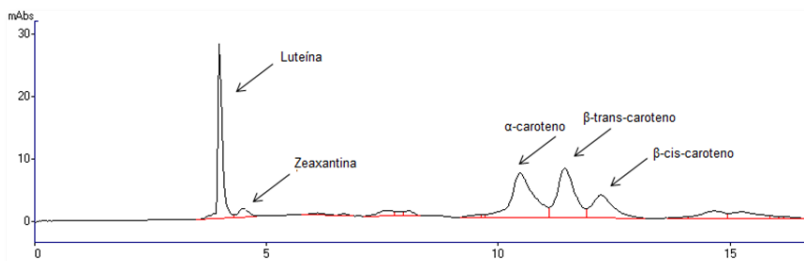


Figura 22. Perfil cromatográfico de carotenoides (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) no extrato hexano: acetona (1: 1, v/v) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.

Tabela 4. Valores médios ($\mu\text{g/g}$ de casca seca) e desvios-padrão (DP) dos conteúdos de luteína, zeaxantina e β -criptoxantina (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm), no extrato organosolvente (hexano: acetona, 1:1, v/v) de amostras de cascas de bananas seca à 45 °C.

	Luteína		Zeaxantina		β -Criptoxantina	
Mês	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP
jul/10	38,15	4,55	15,24	1,12	nd	nd
set/10	36,39	3,51	4,76	0,20	nd	nd
out/10	26,42	2,91	3,75	0,37	nd	nd
nov/10	27,46	1,96	4,39	0,27	nd	nd
fev/11	62,37	10,83	11,74	2,96	2,18	0,62
mar/11	33,21	11,31	5,98	3,92	0,41	0,84
abr/11	45,81	7,54	6,75	1,56	nd	nd
mai/11	41,11	8,09	5,93	0,52	0,50	0,19
jun/11	40,29	24,44	13,07	3,93	1,56	0,95
jul/11	57,40	11,87	9,58	2,65	2,79	0,61
ago/11	31,83	1,54	3,77	0,26	0,71	0,05

	Luteína		Zeaxantina		β -Criptoxantina	
Mês	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP
set/11	28,57	0,76	6,28	1,05	1,43	0,21
out/11	23,76	1,82	3,73	0,66	0,65	0,37
nov/11	30,71	2,38	4,43	0,65	1,03	0,28
dez/11	21,08	3,89	3,15	0,80	0,65	0,25
jan/12	38,77	4,04	4,35	0,49	0,56	0,07
fev/12	69,83	7,07	8,05	0,96	0,34	0,13
mar/12	53,09	7,98	4,64	0,16	0,68	0,25
abr/12	55,01	7,68	7,85	0,77	4,37	1,25
mai/12	78,45	1,07	10,94	0,14	0,32	0,03
jun/12	45,28	1,76	6,17	0,59	nd	nd
jul/12	43,43	6,32	5,34	0,88	nd	nd
ago/12	32,81	0,09	3,48	0,38	nd	nd
set/12	17,11	1,77	4,81	0,49	nd	nd
out/12	18,38	1,08	7,00	0,37	nd	nd
nov/12	27,05	1,87	10,72	0,11	nd	nd
dez/12	48,12	7,59	16,01	1,12	nd	nd
jan/13	39,51	3,99	4,45	0,50	nd	nd
fev/13	68,76	7,17	9,07	0,99	0,44	0,20

Além disso, os carotenoides pró-vitamina A apresentam diferentes tipos de atividade vitamina A, consoante as suas estruturas químicas. Para que apresente atividade vitamina A, a molécula de carotenoide deve ter pelo menos um anel ionona não-substituído, o número correto e a posição de grupos metila na cadeia polieno (WIRTZ et al., 2001). Assim, consoante às características estruturais químicas dos carotenoides, surgiu o conceito de equivalente de atividade de retinol (EAR), o qual considera que 1 μg de retinol equivale a 12 μg de *trans*- β -caroteno (YEUM; RUSSEL, 2002). Os fatores de conversão para outros possíveis isômeros de *cis*- β -caroteno e α -caroteno não são conhecidos, entretanto, para estes compostos é utilizado o fator de conversão de 24:1 por μg de carotenoide ingerido (DAVEY et al., 2009a). Com base nesses fatores de conversão é possível calcular o

valor de EAR e, então, o valor nutricional de vitamina A dos genótipos de banana. Considerando o conteúdo médio dos compostos carotenóidicos pró-vitamina A, a EAR para os extratos organosolventes das amostras de cascas de banana da cultivar Prata Anã correspondeu a 21,21 µg/g de casca seca.

Tabela 5. Teores médios (µg/g de casca seca) e desvios-padrão (DP) de α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm), conteúdo médio de carotenoides totais e EAR (Equivalente de Atividade de Retinol - µg/g de casca seca) em extrato organosolvente (hexano: acetona, 1:1, v/v) de cascas de bananas seca à 45 °C.

Mês	α -Caroteno		<i>trans</i> - β -caroteno		<i>cis</i> - β -caroteno	
	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP	(µg/g)	DP
jul/10	163,00	2,17	186,05	0,38	98,89	0,78
set/10	163,25	15,85	175,21	6,52	89,74	3,32
out/10	216,62	3,26	184,07	15,57	103,96	8,69
nov/10	180,74	4,75	199,02	12,57	93,42	6,67
fev/11	224,55	22,74	224,52	22,79	69,20	4,68
mar/11	95,66	52,85	47,97	2,87	48,14	9,50
abr/11	nd	nd	79,81	14,90	78,01	15,97
mai/11	124,16	13,22	67,74	11,31	56,71	11,42
jun/11	130,82	12,77	76,91	9,97	29,63	11,80
jul/11	194,64	16,21	227,38	37,03	122,87	25,46
ago/11	172,22	6,40	196,81	3,57	106,21	2,83
set/11	245,73	7,25	238,97	7,33	122,21	5,08
out/11	209,98	3,77	165,47	1,58	81,61	5,13
nov/11	213,70	1,08	159,58	0,58	72,64	2,23
dez/11	129,86	5,88	151,71	1,32	35,42	1,12
jan/12	101,24	4,29	120,25	7,54	80,90	5,03
fev/12	80,10	4,42	91,82	5,03	49,80	3,02
mar/12	69,81	1,12	80,15	2,40	94,56	10,22
abr/12	113,88	2,97	109,52	2,18	125,51	7,56
mai/12	209,06	4,33	201,66	0,75	115,55	4,16

	α -Caroteno		<i>trans</i> - β -caroteno		<i>cis</i> - β -caroteno	
Mês	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP	($\mu\text{g/g}$)	DP
jun/12	179,27	3,46	209,15	0,55	115,17	2,37
jul/12	181,67	2,31	260,81	3,35	128,27	3,53
ago/12	199,07	1,12	231,93	4,31	127,37	0,97
set/12	216,93	0,09	345,23	8,05	160,59	5,37
out/12	154,52	2,57	216,00	5,98	99,66	1,50
nov/12	154,08	5,14	232,18	9,05	92,65	3,68
dez/12	162,01	4,49	241,67	8,69	91,00	0,69
jan/13	181,48	5,69	212,34	9,60	100,88	4,71
fev/13	180,36	4,01	111,17	5,23	58,88	3,21
Média	140,52	36,84	141,60	56,93	85,55	23,86
EAR	5,85	-	11,8	-	3,56	-

As amostras de polpas de bananas e plátano analisadas por Davey e colaboradores (2006) quanto ao conteúdo de carotenoides pró-vitamina A apresentaram somente dois compostos, α -caroteno (8 – 35 pmol/g de matéria seca) e *trans*- β -caroteno (5 – 36 pmol/g de matéria seca), com pequenas quantidades adicionais de luteína e β -*cis*-caroteno. Os autores especularam que os resultados estão relacionados aos fatores ecológicos dos locais de cultivo da banana e a sua variabilidade genômica. Os resultados reportados por esses autores mostraram que alguns genótipos possuem conteúdos de carotenoides substancialmente elevados em relação a polpa da fruta. Além disto, o carotenoide pró-vitamina A presente nestas matrizes vegetais consistiu primordialmente de *trans*- β -caroteno, com amplitude de valores de EAR entre 0,47 e 2,51 ng/g. No presente estudo, as cascas de banana da cultivar Prata Anã apresentaram EAR (21,21 $\mu\text{g/g}$ de casca seca), bastante superior à polpa das frutas analisadas por Davey e colaboradores (2006).

Davey e colaboradores (2007) demonstraram que o conteúdo de carotenoides pró-vitamina A varia significativamente entre os grupos amostrais, i.e., frutos, pencas e também entre as cultivares de bananas. A casca da fruta da cultivar Jari Buaya, da Malásia, apresentou o conteúdo mais elevado de α -caroteno (415 $\mu\text{g/g}$ de peso seco – BORGES et al., 2014), enquanto *Musa troglodytarum* (localmente denominada Uht em yap – Micronésia), apresentou elevado teor de α -caroteno na casca

(1472 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de peso fresco - ENGLBERGER et al., 2003). Quantidades elevadas de *trans*- β -caroteno foram também detectadas na polpa dos genótipos Jari Buaya (525 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso seco – BORGES et al., 2014) e de *Musa troglodytarum* (Uht en yap), i. e., 6360 $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso seco (DAVEY et al., 2009b). Quanto aos teores de β -*cis*-caroteno, as cascas da cultivar Jari Buaya apresentaram valores superiores (224 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso seco – BORGES et al., 2014), e 2,6 vezes maiores ao teor médio obtido no presente estudo (85,55 $\mu\text{g}/\text{g}$ de casca seca).

Os genótipos da coleção de germoplasma de banana do Instituto Internacional de Agricultura Tropical, em Uganda, foram analisados quanto aos conteúdos de carotenoides e os resultados à intensidade de cor da polpa da fruta, ocorrendo uma correlação positiva. De forma similar, genótipos de banana de Papua Nova Guiné apresentaram quantidades elevadas de β -caroteno e uma correlação positiva entre esta variável e a intensidade de cor da polpa. Estes achados corroboram resultados anteriores reportados para bananas brasileiras e da Micronésia, os quais demonstraram que o conteúdo de β -caroteno é maior em bananas com polpa de coloração amarela e alaranjada em relação as frutas com polpa branca ou bege (FUNGO; PILLAY, 2010, ENGLBERGER et al. 2003).

Uma questão importante a ser mencionada na comparação entre os conteúdos de carotenoides nas cultivares refere-se ao protocolo analítico utilizado na extração, quantificação e identificação desses compostos do metabolismo secundário. De fato, uma série de metodologias tem sido descritas na literatura, diferindo em qualquer extensão sobre um ou mais procedimentos e/ou técnicas analíticas. Por exemplo, um importante aspecto na análise de carotenoides, porém frequentemente ignorado, é o impacto do processamento pós-colheita e a estocagem das amostras. A liofilização continua sendo amplamente considerada a técnica de desidratação amostral mais apropriada para preservar a biomassa. Contudo, neste estudo, foi adotado como processamento pós-colheita economicamente mais viável o procedimento de secagem em estufa à 45 °C.

3.2.6. Estabelecimento de protocolo de extração e quantificação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para determinação do teor das catecolaminas nos extratos em estudo, primeiramente, construiu-se uma curva-padrão externa de dopamina (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Fig. 23) em cromatógrafo líquido

(Shimzadu LC-10A). Em seguida, foram obtidos os extratos aquosos de amostras de cascas de bananas *in natura* totalmente verde, parcialmente madura (biomassa com coloração verde e amarela) e madura (casca totalmente amarela), assim como casca de banana madura seca à 45 °C e liofilizada. Os resultados observados estão dispostos na Tabela 6. O conteúdo de dopamina foi superior nas amostras de cascas de frutas maduras, comparativamente às cascas verdes de frutas verdes.

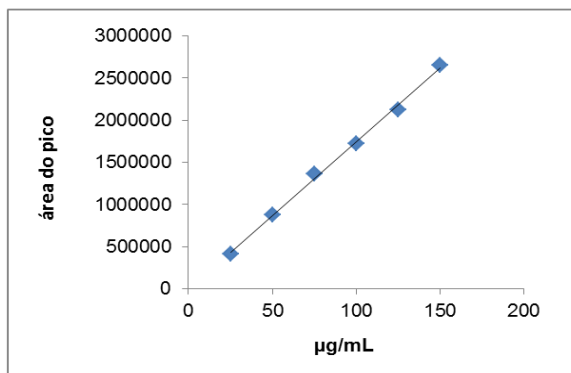


Figura 23. Curva padrão de dopamina, cuja equação corresponde a $y = 17446.x$ ($r^2 = 0,99$).

Explorando a composição da banana quanto ao seu conteúdo de compostos antioxidantes, primeiramente, Kanazawa e Sakakibara (2000) examinaram a casca da fruta e identificaram a dopamina como um forte antioxidante solúvel em água. O conteúdo de dopamina foi determinado na polpa da fruta em oito estádios de maturação, definidos pela cor da casca, a qual variou de totalmente verde até o amarelo, conforme descrito por Loeseck (1950). De acordo com os estádios de maturação, o conteúdo de dopamina nas cascas de banana (1290 ± 420 mg/100g - estádios 1-3, 430 ± 210 mg/100g - estádios 4-6, 380 ± 160 mg/100g - estádios 6-7, e 500 ± 270 mg/100g - estádios 7-8) foram maiores quando comparados ao conteúdos determinados na polpa das frutas maduras ($7,0 \pm 2,0$ mg/100g - estádios 1-3, $9,1 \pm 3,1$ mg/100g - estádios 4-6, $7,3 \pm 2,4$ mg/100g - estádios 6-7, e $3,4 \pm 2,2$ mg/100g - estádios 7-8) (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000). Além disso, aqueles autores observaram que o conteúdo de dopamina mostrou-se mais elevado nas cascas verdes de banana da cultivar *Cavendishii*, proveniente de duas plantações nas Filipinas.

Tabela 6. Conteúdo de dopamina de amostras de cascas de banana *in natura* em três estágios de maturação, cascas secas à 45 °C e cascas liofilizadas.

Cascas de bananas	Conteúdo de dopamina (mg/g casca de banana)
totalmente verde	35,18 ± 1,19 ^{β,δ,ε}
parcialmente madura	37,01 ± 0,58 ^{γ,δ,ε}
madura	135,61 ± 3,69 ^{α,β,δ,ε}
madura seca a 45 °C	69,92 ± 1,85 ^{α,β,γ,ε}
madura liofilizada	113,0 ± 5,6 ^{α,β,γ,ο}

Nota: Diferença estatística considerando $p < 0,05$ e simbolizada por $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ e ϵ , onde: α = totalmente verde, β = parcialmente madura, γ = madura, δ = seca a 45 °C e ϵ = liofilizada.

Embora tipicamente encontradas em mamíferos, as catecolaminas têm sido isoladas de material vegetal. As catecolaminas são precursores do alcaloide fenantridina benzóica (KUKLIN; CONGER, 1995). A dopamina é um precursor para outros tipos de alcalóides, tais como o alucinógeno mescalina (alcalóide fenetilamina) identificado em várias espécies cactos e o alcaloide tetra-hidroisoquinolina (ROSHCHINA, 2001). A dopamina tem elevada capacidade antioxidante, comparável aos potentes antioxidantes naturais como o ácido ascórbico, a glutatona reduzida e uma série de compostos fenólicos (KANAZAWA; SAKAKIBARA, 2000).

Entretanto, devido à rápida degradação da dopamina observada nos extratos de casca de banana utilizando somente água destilada (dados não mostrados), foi realizada uma busca na literatura a respeito de outros solventes extratores. Entre as possibilidades de solventes extratores testados, foi escolhida a solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Esta solução mantém as catecolaminas de interesse em estado reduzido, i.e., protonadas, evitando desta maneira a geração de produtos de degradação (MOURE et al., 2001).

Em um segundo momento, os extratos acidificados das cascas de bananas foram submetidos à análise cromatográfica para a separação e quantificação de L-dopa (Fig. 24A) e dopamina (Fig. 24B). Para a obtenção de cromatogramas bem resolvidos, o cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A) foi equipado com coluna C18 de fase reversa (NST 033003, 30 mm x 3 mm x 0,3 μm \varnothing interno) e com um detector espectrofotométrico UV-visível, operando em 280 nm. Além da

substituição da fase estacionária previamente selecionada, outro sistema de eluição contendo tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano) 50mM pH7: metanol : acetonitrila (8:1:1, v/v/v), em fluxo de 0,5 mL/min, foi adotado.

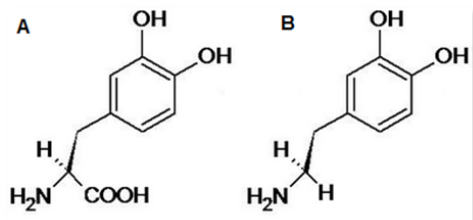


Figura 24. Estrutura química de L-dopa (A) e dopamina (B) em suas formas protonadas.

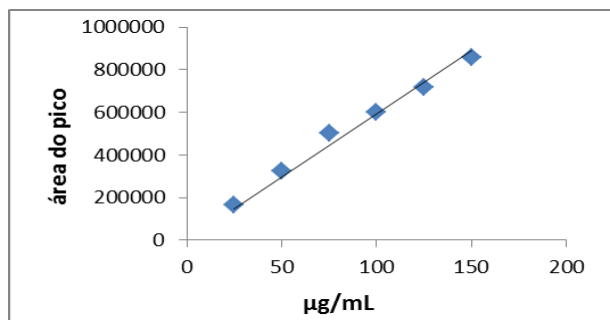


Figura 25. Curva-padrão de L-dopa, cuja equação da reta corresponde à $y = 5930,2b.x$ ($r^2 = 0,9816$).

Nestas condições experimentais foi possível separar e quantificar L-dopa e dopamina, com o auxílio das curvas-padrão mostradas nas Figuras 25 e 26. Todo o sistema foi alterado porque as condições descritas anteriormente (vide material e métodos) não proporcionaram a separação de L-dopa e dopamina, bem como a resolução dos picos não foi satisfatória.

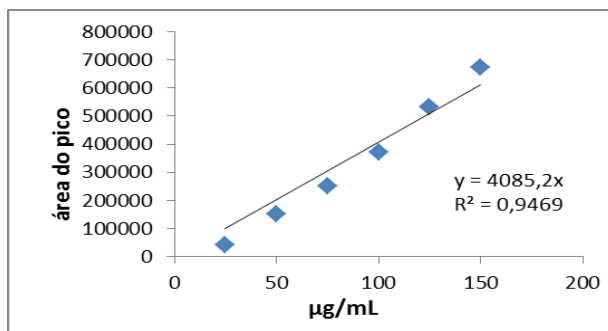


Figura 26. Curva-padrão de dopamina e sua correspondente equação de reta $y = 4085,2x$ ($r^2 = 0,9469$).

Tabela 7. Conteúdo (mg/g casca de banana seca) de L-dopa e dopamina em amostras de cascas de bananas secas à 45 °C, nos tempos de sonicação de 0 min e 60 min.

Tempo de sonicação (min)	Conteúdo de L-dopa (mg/g casca de banana seca)	Conteúdo de dopamina (mg/g casca de banana seca)
0	26,93 ± 5,80	4,29 ± 0,82*
60	23,71 ± 1,22	0,81 ± 0,19

Nota: A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os tempos de sonicação, considerando $p < 0,05$.

Com as condições cromatográficas padronizadas à análise daqueles metabólitos, avaliou-se o método de extração de catecolaminas a partir das amostras de cascas de bananas expostas ao ultrassom e solução extratora de HCl 0,1M. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 7. Não foi detectada diferença estatística no conteúdo de L-dopa com o uso de ultrassom no processo de extração. De forma contrária, o teor de dopamina diminuiu aproximadamente 5 vezes, com a introdução daquela técnica no processo de extração, durante um período de 60 minutos. Todavia, as catecolaminas de interesse, L-dopa e dopamina, foram separadas e quantificadas de maneira satisfatória nestas condições cromatográficas.

Dando continuidade às análises, o monitoramento das catecolaminas em cascas de bananas colhidas durante o ano de 2012 foi realizado nos extratos acidificados (HCl 0,1M) (Figs. 13 e 15).

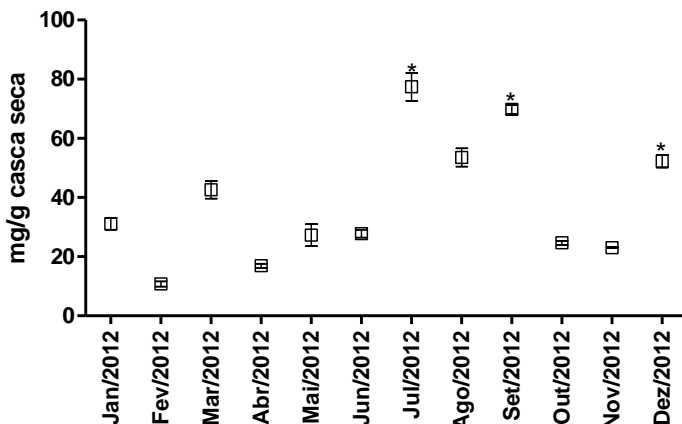


Figura 27. Conteúdo médio de dopamina (mg/casca seca) em extrato acidificado (HCl 0,1M) de amostras de cascas de bananas secas à 45 °C, coletadas no período de Janeiro-2012 a Dezembro-2012, por FR-CLAE-UV-Vis. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$.

A partir da Figura 27, pode-se observar que a amplitude de concentrações de dopamina foi de $10,77 \pm 0,85$ a $77,42 \pm 4,67$ mg/g de casca seca, através de cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE-UV-Vis). Há uma tendência de aumento na concentração de dopamina entre os meses de abril e setembro de 2012, i.e., durante o outono, conforme também detectado aos compostos fenólicos totais e carotenoidicos. Destaque para os meses de julho, setembro e dezembro de 2012 ($77,42 \pm 4,70$, $69,78 \pm 1,49$ e $52,29 \pm 2,14$, respectivamente), os quais apresentaram os conteúdos mais elevados de dopamina nas amostras de casca de banana. Na Fig. 16 é mostrado um típico perfil de catecolaminas do extrato de casca de banana.

As catecolaminas, i.e., dopamina, norepinefrina (noradrenalina) e epinefrina (adrenalina), são um grupo de aminas biogênicas que possuem um anel fenil 3,4-dihidroxi substituído (Fig. 28). L-fenilalanina, L-tirosina e tiramina são os precursores na via biossintética desses amino compostos que se mostra similar tanto em plantas quanto em mamíferos em suas primeiras reações (STEINER; SCHLIEMANN; STRACK, 1996). Provavelmente, a atividade neurotransmissora é o

melhor exemplo de atividade das aminas biogênicas em mamíferos, além de atuarem na regulação hormonal do metabolismo do glicogênio (KIMURA, 1968). No reino vegetal, contudo, há um maior número de vias biossintéticas que favorecem a obtenção de diferentes catecolaminas (SMITH, 1980), i.e., quimiodiversidade, comparativamente ao metabolismo de mamíferos.

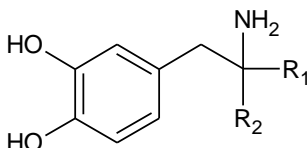


Figura 28. Estrutura geral de catecolaminas. L-dopa: R1 = COOH e R2 = H; dopamina: R1 = R2 = H; norepinefrina: R1 = H e R2 = OH; e epinefrina: R1 = H, R2 = OH, e CH₃ substituindo um dos hidrogênios do grupamento amino.

As catecolaminas fazem com que as plantas regulem com precisão a resposta a condições de estresse através da oxidação da dopamina e produção de melanina, uma substância com elevado potencial *scavanger* de radicais livres (KULMA; SZOPA, 2007). As aminas biogênicas são importantes nas vias metabólicas das plantas quanto aos mecanismos de resistência a patógenos (NEWMAN et al., 2001; ROEPENACK-LAHAYE et al., 2003), influenciam o desenvolvimento via interação com fitohormônios, e.g., oxidação de auxina (KUKLIN; CONGER, 1995), a floração (KHURANA et al., 1987) e o metabolismo de açúcares (SZOPA et al., 2001). De fato, as catecolaminas tanto na forma metilada ou não metilada são necessárias em baixas concentrações (KULMA; SZOPA, 2007) e possuem funções regulatórias importantes (KULMA; SZOPA, 2007), apresentando uma rápida elevação intracelular nas folhas de plantas submetidas a lesões (BRUHN; LUNDSTROM, 1976), ou estresse hídrico (SWIEDRYCH et al., 2004). Além da abordagem fisiológica vegetal às catecolaminas, de interesse ao presente estudo, a biomassa de cascas de bananas pode ser considerada como fonte de aminas biogênicas ao desenvolvimento de formulações farmacêuticas. Especialmente a casca de banana, que possui teor elevado de dopamina quando comparada a polpa, conforme estudos de Kanazawa e Sakakibara (2000).

Desde que foi introduzida em 1960, a L-dopa tem sido largamente utilizada e é considerada um fármaco efetivo na terapia sintomática da doença de Parkinson (OLANOW; JENNER; BEAL,

2006). De acordo com Obeso e colaboradores (2000), uma concentração estável de dopamina e a contínua ativação de receptores estriais dopaminérgicos são essenciais ao funcionamento normal dos gânglios basais (BÉDARD et al., 1986; GRONDIN et al., 1996; JENNER, 2000).

L-dopa, o precursor da síntese de dopamina em matrizes vegetais, foi também quantificada nas amostras de extratos acidificados (HCl 0,1M) das biomassas em estudo, secas à 45 °C. De acordo com a Fig. 29, o conteúdo de L-dopa variou entre $21,99 \pm 1,37$ e $133,48 \pm 3,93$ mg/g de casca seca.

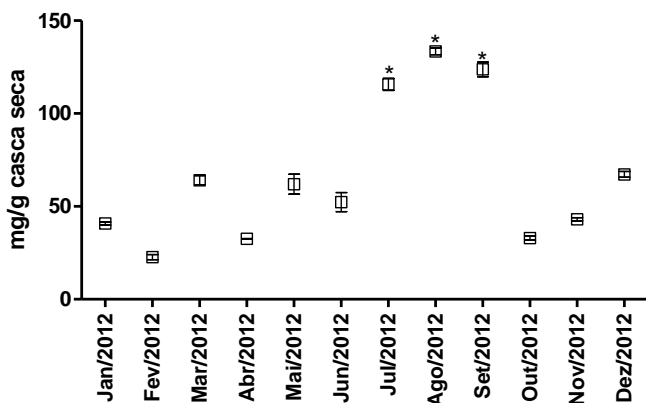


Figura 29. Conteúdo médio de L-dopa (mg/g cascas secas) em extrato acidificado (HCl 0,1M) de cascas de bananas secas à 45 °C, coletadas no período de Janeiro-2012 a Dezembro-2012, por FR-CLAE-UV-Vis. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os meses amostrais, considerando $p < 0,05$.

Conforme demonstrado na Fig. 29, a determinação do teor de L-dopa em casca de banana por FR-CLAE-UV-visível mostrou que as amostras coletadas nos meses de julho, agosto e setembro de 2012 ($115,64 \pm 3,25$; $133,48 \pm 1,78$ e $123,80 \pm 3,93$, respectivamente). O perfil cromatográfico de separação das catecolaminas L-dopa e dopamina pode ser observado na Figura 30.

No estudo de González-Montelongo, Lobo e González (2010), extratos metanólicos de cascas de bananas de duas cultivares das Ilhas Canárias, Espanha, apresentaram elevado conteúdo de dopamina (Grande Naine: $3,81 \pm 0,36$ mg/g de matéria seca e Gruesa: $3,39 \pm 0,20$ mg/g de matéria seca), comparativamente ao observado aos extratos

etanólicos e acetona. No presente estudo, foi utilizada como solução extratora uma solução acidificada (HCl 0,1M), a qual se mostrou bastante eficiente na obtenção das catecolaminas a partir da matriz vegetal de cascas de bananas. De outra forma, o interesse em padronizar uma metodologia de extração aquosa visou possíveis experimentos futuros com animais, além de ser uma tecnologia mais limpa na obtenção de compostos por não utilizar solventes orgânicos, i.e., *green chemistry*.

González-Montelongo, Lobo e González (2010), também observaram que o conteúdo de dopamina aumentou significativamente com aumento do tempo de exposição as ondas de ultrassom durante o processo de extração de 1 para 120 min, utilizando como solvente extrator metanol p.a. Todavia, no presente trabalho, o uso de ondas de ultrassom no processo de extração não apresentou um efeito satisfatório na obtenção das catecolaminas, uma vez que a concentração de dopamina diminuiu significativamente com a utilização deste procedimento (Tab. 7).

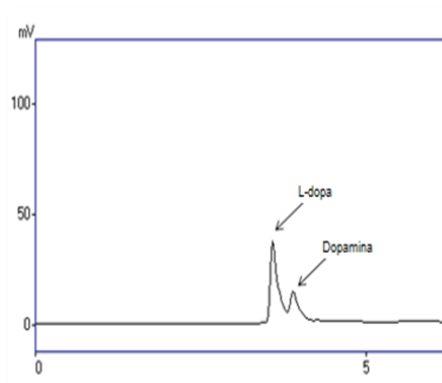


Figura 30. Perfil cromatográfico típico de catecolaminas (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm) em extrato aquoso acidificado (HCl 0,1M) da amostra de cascas de bananas, seca à 45 °C.

É sabido que as catecolaminas são metabolizadas no organismo de mamíferos pelas enzimas catecol-*O*-metil transferase (COMT), monoamina oxidase (MAO) e sulfotransferase (SFT). Murata e colaboradores (1988) estudaram a biodisponibilidade e a farmacocinética da administração de dopamina por via intravenosa e oral em cachorros. Na administração intravenosa de solução aquosa de 10 mg de dopamina detectou-se um decréscimo rápido na concentração

plasmática de dopamina, resultando em dois metabólitos principais: dopamina-30-SO₄ (2,7 %) e 3,4-dihidroxifenil ácido acético (4,9%). A administração por via oral de solução aquosa de 100 mg de ¹⁴C dopamina em cachorro revelou a baixa biodisponibilidade daquele metabólito (aproximadamente 3%). Isto reflete o metabolismo de primeira passagem, através do intestino, e também no fígado durante o processo de absorção, que resultou na excreção urinária, predominantemente, de ¹⁴C dopamina-30-SO₄. (MURATA et al., 1988).

Se considerarmos que a polpa de uma banana pesa aproximadamente 100g, os níveis de dopamina em uma banana madura são equivalentes a $9,1 \pm 3,1$ mg, conforme descrito por Kanazawa e Sakakibara (2000). Considerando os achados do presente estudo, em 100g de amostras de cascas secas (de fruta madura, safra 2012) teríamos, em média, $381,1 \pm 210,6$ mg de dopamina. Não é interessante considerar a ingestão de frutas, ou a administração via oral de cápsulas contendo estes compostos extraídos de cascas de banana e que contém dopamina ao tratamento da doença de Parkinson devido, principalmente, ao metabolismo de primeira passagem e, conseqüente, à baixa disponibilidade do composto ativo. Entretanto, uma alternativa interessante seria utilizar a biomassa de casca de banana como fonte de matéria prima de catecolaminas e aplica-lás em formulações farmacêuticas que utilizam vias de administração distinta da via oral.

A via de administração intranasal, por exemplo, parece bastante relevante, por oferecer a vantagem de o fármaco não sofrer metabolização de primeira passagem, como ocorre na administração por via oral, além de apresentar condições favoráveis a maior permeabilidade a moléculas polares (GERVASI et al., 1991). Dahlin, Janssone e Björk (2001) investigaram os níveis de dopamina marcada radioativamente (³H]dopamina) no sangue, no fluido cerebrospinal, e no cérebro de ratos, com o intuito de elucidar se esta substância é transferida ao sistema nervoso central, através da mucosa nasal. De acordo com os resultados obtidos por Dahlin, Janssone e Björk (2001), a absorção nasal de ³H]dopamina à circulação sistêmica foi rápida, com um pico máximo de concentração em 15 min após a administração. A sua biodisponibilidade por esta via foi de $68 \pm 30\%$. Após 30 min da administração por via intranasal, a concentração de ³H]dopamina que chegou ao cérebro foi significativamente elevada ($p < 0.01$), quando comparada à via intravenosa. Os níveis de ³H]dopamina no fluido cerebrospinal após a administração por via intranasal foram 2,3 vezes superiores em relação à administração intravenosa (75 ± 19 dpm e 32 ± 4 dpm, respectivamente) e 6,8 vezes maiores (184 ± 68 dpm e 27 ± 10

dpm, respectivamente) no bulbo olfatório direito, quando comparadas as duas vias. O metabolismo foi mais pronunciado nas amostras de fluido cerebrospinal (14% de [^3H]dopamina). Estes resultados mostram quantidades significativamente elevadas de dopamina presente nas amostras de cérebro de ratos após a administração de [^3H]dopamina por via intranasal em relação à administração intravenosa. Este é, portanto, um indício de que quando administrada por via intranasal a [^3H]dopamina alcança diretamente o cérebro dos animais de forma eficiente.

Chemuturi e Donovan (2006) também estudaram o metabolismo da dopamina administrada por via intranasal. Ácido dihidroxifenil acético (menos que 0,5% da quantidade inicial de dopamina administrada) foi o único metabólito detectado em ensaio *in vitro*. Contudo, a administração de baixas concentrações de dopamina reduzem o transporte e o metabolismo daquele composto. Alguns autores têm demonstrado que o transporte nasal de dopamina, através da camada epitelial, é mediado por proteínas carreadoras (AMENTA et al., 2001; EISENHOFER, 2001). A elevada biodisponibilidade da dopamina em concentrações adequadas e seu transporte ao sistema nervoso central, através da mucosa nasal, é uma combinação da diluição limitada da solução de dopamina, da atividade de vários transportadores protéicos e da rápida saturação da enzima monoamina oxidase (MAO) no tecido nasal (DAHLIN; JANSSENE; BJÖRK, 2001). Chemuturi e Donovan (2006), assim como Dahlin, Janssone e Björk (2001), sugerem a mucosa intranasal como uma via promissora à administração daquele neurotransmissor, que através de neurônios olfatórios, será diretamente levada ao cérebro, i.e., seu local de ação.

Uma alternativa recentemente proposta por Wang e colaboradores (2013) foi o pró-fármaco de dopamina denominado D-fenilglicina-L-dopa, que apresentou, em ratos e por via oral, biodisponibilidade 31 vezes maior em relação à L-dopa. Após a administração por via intravenosa, D-fenilglicina-L-dopa foi detectada em concentração sistêmica superior comparativamente à L-dopa (23,79 mmol.min/mL e 12,09 mmol.min/mL, respectivamente). Isso significa que D-fenilglicina-L-dopa apresentou uma biodisponibilidade 1,97 vez maior que L-dopa, provavelmente devido ao seu menor nível de metabolização. O tempo de meia-vida da dopamina no cérebro após administração de D-fenilglicina-L-dopa foi 2,51 vezes superior, após a administração de L-dopa (112,51 min vs. 44,85 min). D-fenilglicina-L-dopa, como um pró-fármaco de dopamina, pode prevenir e prolongar o processo de descarboxilação de L-dopa. Além disso, pode funcionar

como um sistema de liberação sustentável de dopamina e, por isso, considerado muito útil ao tratamento da doença de Parkinson (WANG et al., 2013).

3.2.7. Perfil espectral de ^1H -RMN dos extratos de casca de banana

A Figura 31 representa o perfil espectral de ^1H -RMN de extrato bruto aquoso (EBA) de cascas de bananas secas à 45 °C e os deslocamentos químicos (ppm) atribuídos aos compostos identificados estão disposto na Tabela 8.

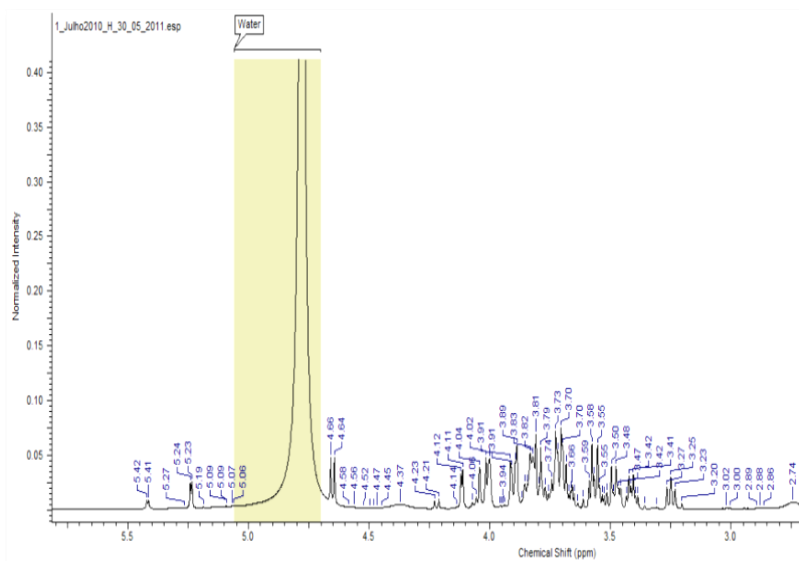


Figura 31. Espectro de ressonância magnética nuclear de ^1H do extrato aquoso bruto (EBA) de cascas de bananas secas à 45 °C (Inova Varian, 500 MHz, δ ppm, TSP).

Análise preliminar do perfil espectral das amostras de EBA revelou a presença de ressonâncias típicas de compostos com estruturas químicas alifáticas (0,00-3,00 ppm) e anoméricas 3,00-5,50 ppm). Neste contexto, de forma relacionada ao metabolismo de L-dopa e a dopamina, foram identificados (Tab. 8) os aminoácidos glicina, fenilalanina, triptofano e tirosina, os quais são precursores daquelas

catecolaminas nas amostras de casca de banana coletadas ao longo do período experimental, que compreende os meses de julho de 2010 a fevereiro de 2013. Adicionalmente, na região anomérica, ressonâncias foram atribuídas à sacarose, melibiose, frutose e galactose. Além disso, a presença de flavonoides é tentativamente considerada, com destaque à epicatequina (3.94 ppm). O perfil espectral das amostras de EBA, provenientes de bananas coletadas em momentos distintos, i.e. mês a mês, não apresentou diferenças (dados não apresentados).

Tabela 8. Deslocamentos químicos (ppm) atribuídos a compostos identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H -RMN do extrato aquoso bruto de cascas de bananas, secas à 45 °C.

Composto químico	Deslocamento químico (ppm)
L-fenilalanina	7.43; 7.42; 7.41; 7.40; 4.00; 3.31; 3.14; 3.13
2-hidroxi-DL-fenilalanina	7.10; 7.06; 7.05
L-triptofano	7.06; 6.96; 6.92; 6.90; 6.86; 3.55; 3.51; 3.14
D-(+)-sucrose	5.42; 4.23; 4.22; 4.21; 4.07; 4.06
Melibiose	4.04; 4.00; 3.94; 3.96; 3.83; 3.76; 3.74; 3.72; 3.66; 3.57; 3.51; 3.48
alfa-D-frutose	4.04; 4.00; 3.66; 3.64
alfa-D-galactose	4.07; 3.91; 3.77; 3.73
alfa-D-glucose	5.24; 3.85; 3.79; 3.73; 3.53; 3.42
alfa-celobiose	3.94; 3.85; 3.81; 3.64; 3.57
beta-D-glucose	4.65; 3.85; 3.50; 3.25
beta-D-frutose-6-PO4	4.12; 3.58
beta-D-frutose	3.83; 3.79; 3.64; 3.57 3.96; 3.91; 3.73; 3.81; 3.66; 3.65; 3.64; 3.58;
beta-celobiose	3.50; 3.48; 3.41; 3.31 3.94; 3.76; 3.70; 3.65;
beta-D-galactose	3.48

Composto químico	Deslocamento químico (ppm)
	3.91; 3.89; 3.85; 3.83; 3.81; 3.79; 3.76; 3.74; 3.68; 3.58; 3.57; 3.55
sucrose	3.81; 3.77; 3.74; 3.73; 3.72; 3.65; 3.64
6-deoxi-D-galactose	3.55; 3.20
L-glicina	3.55; 3.53; 3.25; 2.95
5-hidroxi-L-triptofano	3.48; 3.42
6-deoxi-D-galactose	3.43; 3.42; 3.41; 3.40;
2-hidroxi-DL-fenilalanina	3.39; 2.74
3,5-dinitro_L-tirosina	4.21; 3.16; 3.13
(-)-epicatequina	3.94

Várias abordagens experimentais são comumente utilizadas a fim de se determinar a identidade química dos metabólitos derivados de plantas. A necessidade de utilizar diversas tecnologias reflete a dificuldade técnica em identificar e quantificar os metabólitos devido as largas variações nas suas concentrações relativas e a complexidade química de extratos das biomassas vegetais (STITT; FERNIE, 2003; SUMNER; MENDES; DIXON, 2003). Em função deste cenário, a metabolômica de plantas é ainda limitada quanto a sua compreensão. Normalmente, os metabólitos são identificados através da comparação de espectros de compostos isolados provenientes de bibliotecas como a NIST (<http://www.nist.gov>), a Wiley (<http://www.wileyregistry.com/>) ou a

Sigma-Adrich (http://www.sigmaldrich.com/Area_of_Interest/Equip____Supplies_Home/Spectral_Viewer/FT_NMR_Library.html), por exemplo. Embora essas bibliotecas contenham mais de 350 mil espectros das mais variadas substâncias, a maioria deles é de compostos sintéticos isolados, sendo carentes de informação quanto ao perfil espectral químico dos compostos em conjunto, considerando suas interações químicas em uma amostra como um todo (WAGNER; SEFKOW; KOPKA, 2003). Diante deste cenário, surgiu a ideia de estudar a metabolômica das cascas de banana no intuito de elucidar a sua composição química através de diferentes abordagens analíticas e considerando a possibilidade de uma atividade biológica, i.e., o potencial de regeneração tecidual atribuído a

esta biomassa, conforme descrito na medicina popular brasileira (BALBACH, 1945).

Uma razão importante que dificulta a troca de informações está relacionada a complexidade dos dados gerados no estudo da metabolômica, devido aos diferentes delineamentos experimentais que geram resultados em unidades e formatos variados. Para entender o experimento e interpretar os resultados, é imprescindível que se tenha informação precisa no que diz respeito ao delineamento experimental, a preparação da amostra e metodologia analítica utilizada. Entretanto, a dificuldade está em padronizar todos esses detalhes de forma que a informação fique claramente descrita e, assim, seja compreendida de maneira globalizada (BINO et al., 2004). Sendo assim, no presente estudo se fez necessária a análise de substâncias padrão, nas mesmas condições de análise das amostras, a fim de construir um banco de dados próprio.

4. Conclusão

Antes de dar início à análise do perfil fitoquímico da casca de banana (*Musa* sp., cultivar Prata Anã), foi selecionado o processamento prévio das amostras e o solvente extrator. Como processamento amostral prévio selecionou-se a secagem em estufa, à 45 °C. Este é um procedimento simples, rápido e de baixo custo à desidratação do material, visando a estocagem em condição adequada da matéria prima vegetal. O solvente extrator selecionado foi a solução de metanol p.a. acidificada (HCl 1%, v/v), uma vez que o conteúdo de compostos fenólicos totais foi estatisticamente mais elevado e diversificado nesta condição de extração. O solvente extrator água destilada também foi selecionado, pois diante dos resultados descritos no Capítulo 2, há interesse em avançar na sua análise fitoquímica e correlacioná-la com a atividade cicatrizante atribuída ao EBA.

Foi observada uma diferença significativa entre as concentrações de compostos fenólicos totais, determinados por espectrofotometria UV-visível, quando comparados os solventes extratores água destilada e solução metanólica acidificada. A solução acidificada tende a manter os compostos fenólicos protonados, evitando assim sua degradação durante o processo de extração e quantificação. Portanto, as concentrações de compostos fenólicos totais presentes no extrato metanólico acidificado foram mais elevadas comparativamente ao EBA de cascas de bananas. O perfil de compostos fenólicos foi determinado através da CLAE, tendo como constituinte majoritário a galocatequina.

A determinação de carotenoides através da RF-CLAE-UV-Vis apresentou teores mais elevados destes compostos, quando comparados os resultados obtidos por espectrofotometria, indicando que a separação cromatográfica é importante à qualidade e precisão dos dados observados à matriz complexa em estudo. Além disso, a RF-CLAE-UV-Vis revelou o perfil de compostos carotenídicos das cascas de bananas cv. Prata Anã, a saber: luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno. .

A análise das catecolaminas L-dopa e dopamina, a partir de extratos aquosos acidificados (HCl 0,1M) de cascas de bananas, mostrou-se eficiente em sistema cromatográfico equipado com coluna cromatográfica C18 de fase reversa (NST 033003, 30 mm x 3 mm x 0,3 μ m \varnothing interno) e sistema de eluição composto por tampão Tris (tris-hidroximetilaminometano - 50mM, pH7): metanol: acetonitrila (8: 1: 1, v/v/v). A análise da metabolômica de uma matriz complexa como os extratos de casca de banana permitiu a identificação simultânea de compostos de baixo peso molecular pertencentes a diversas classes químicas entre as amostras de cascas de banana, coletadas ao longo de julho de 2010 a fevereiro de 2013. Um destaque para os aminoácidos da via de síntese das catecolaminas, entre os quais estão o triptofano, a fenilalanina e a tirosina. E que não foram identificadas através de outras técnicas analíticas rotineiras em laboratórios de pesquisa, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De fato, no atual estágio do estudo, a não seletividade típica da RMN constituiu um vantagem analítica ao entendimento do metaboloma da casca de *Musa* sp..

A análise fitoquímica dos extratos de casca de banana permitiu identificar e quantificar, através de técnicas espectrofotométrica, cromatográfica e espectroscópica compostos bioativos relevantes, entre eles compostos fenólicos, carotenoides, catecolaminas, flavonoides, aminoácidos e carboidratos. Além disso, permitiu a padronização do EBA, o mais promissor quanto ao potencial cicatrizante, conforme descrito no Capítulo 2.

5. Referências bibliográficas

AMAN, R.; CARLE, R.; CONRAD, J.; BEIFUSS, U.; SCHIEBER, A. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1074, p. 99-105, 2005.

AMENTA, F.; BRONZETTI, E.; CANTALAMESSA, F.; EL-ASSOUAD, D.; FELICI, L.; RICCI, A.; TAYEBATI, S.K. Identification of dopamine plasma membrane and vesicular transporters in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 117, p. 133–142, 2001.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, v. 125, p. 989–1009, 2000.

BALBACH, A. **As frutas na medicina doméstica**. 21. ed. São Paulo: Editora M.V.P., 1945. 374p.

BACHEREAU, F.; MARIGO, G.; ASTA, J. Effects of solar radiation (UV and visible) at high altitude on CAM-cycling and phenolic compound biosynthesis in *Sedum album*. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 203–210, 1998.

BÉDARD, P.J.; DI PAOLO, T.; FALARDEAU, P.; BOUCHER, R. Chronic treatment with L-dopa, but not bromocriptine induces dyskinesia in MPTPparkinsonian monkeys; correlation with [3H]spiperone binding. **Brain Research**, v. 379, p. 294–99, 1986.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K-FR. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Drug Research**, v. 45, p. 697–700, 1995.

BINO, R.J.; HALL, R.D.; FIEHN, O.; KOPKA, J.; SAITO, K.; DRAPER, J.; NIKOLAU, B.J.; MENDES, P.; ROESSNER-TUNALI, U.; BEALE, M.H.; TRETHERWEY, R.N.; LANGE, B.M.; WURTELE, E.V.; SUMNER, L.W. Potential of metabolomics as a functional genomics tool. **TRENDS in Plant Science**, v. 9, p. 418–425, 2004.

BORGES, C.V.; AMORIM, V.B.O.; RAMLOV, F.; LEDO, C.A.S.; DONATO, M.; MARASCHIN, M.; AMORIM, E.P. Characterisation of metabolic profile of banana genotypes, aiming at biofortified *Musa* spp. cultivars. **Food Chemistry**, v. 145, p. 496–504, 2014.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRUHN, J.; LUNDSTROM, J. Alkaloids of *Carnegiea gigantea*. Arizonine, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. **Lloydia**, v. 39, p. 197–203, 1976.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Proceedings National Academy of Science of the United States**, v. 100, p. 14555-14561, 2003.

CHARRIER, A.; JACQUOT, M.; SERGE, H.; NICOLAS, D. L'amélioration des plantes tropicales. In: CIRAD-Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. France: **CIRAD ORSTOM**, 109-139, 2004.

CHAVAN, U.D.; SHAHIDI, F.; NACZK, M. Extraction of condensed tannins from beach pea (*Lathyrus maritimus* L.) as affected by different solvents. **Food Chemistry**, v. 75, p.509-512, 2001.

CHEMUTURI, N.V.; DONOVAN, M.D. Metabolism of dopamine by the nasal mucosa. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, p. 2507-2515, 2006.

CHICHILI, G.R.; NOHR, D.; SCHÄFFER, M.; LINTIG, J.; BIESALSKI, H.K. β -Carotene conversion into vitamin A in human retinal pigment epithelial cells. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, p. 3562–3569, 2005.

DAHLIN, M.; JANSSON, B.; BJÖRK, E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, p. 75–80, 2001.

DAVEY, M.W.; KEULEMANS, J.; SWENNEN R. Methods for the efficient quantification of fruit provitamin A contents. **Journal of Chromatography A**, v. 1136, p. 176-184, 2006.

DAVEY, M.W.; MELLIDOU, I.; KEULEMANS, W. Considerations to prevent the breakdown and loss of fruit carotenoids during extraction and analysis in *Musa*. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5759-5762, 2009a.

- DAVEY, M.W.; BERGH, I.V.; MARKHAM, R.; SWENNEN, R.; KEULEMANS, J. Genetic variability in *Musa* fruit pro-vitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. **Food Chemistry**, v. 115, p. 806-813, 2009b.
- DAVEY, M.W.; STALS, E.; NGOH-NEWILAH, G.; TOMEKPE, K.; LUSTY, C.; MARKHAM, R.; SWENNEN, R.; KEULEMANS, J. Sampling strategies and variability in fruit pulp micronutrient contents of west and central African bananas and plantains (*Musa* species). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 55, p. 2633-2644, 2007.
- DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, p. 843-847, 2001.
- DORTA, E.; LOBO, M.G.; GONZALEZ, M. Reutilization of mango by-products: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, v. 77, p. C80–C88, 2012.
- DUNJIC, B.S.; SVENSSON, I.; AXELSON, J.; ADLERCREUTZ, P.; AR'RAJAB, A.; LARSSON, K.; BENGMARK, S. Green banana protection of gastric mucosa against aspirin induced injuries in rats. A Multicomponent Mechanism? **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 28, p. 894-898, 1993.
- EISENHOFER, G. The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 91, p. 35–62, 2001.
- ENGEL, S.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, p. 1971-1985, 2003.
- ENGLBERGER, L.; AALBERSBERG, W.; RAVI, P.; BONNIN, E.; MARKS, G.C.; FITZGERALD, M.H.; ELYMORE, J. Further analyses on Micronesian banana, taro, breadfruit and other foods for provitamin A carotenoids and minerals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 219–236, 2003.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora da UFSC, 2001. 257p.

FAN, T.W.M. Metabolite profiling by one- and two-dimensional NMR analysis of complex mixtures. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 28, p. 161-219, 1996.

FAN, T.W.M.; LANE, A.N. Structure-based profiling of metabolites and isotopomers by NMR. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 52, p. 69–117, 2008.

FIDGE, N.H.; SMITH, F.R.; GOODMAN, D.S. Vitamin A and carotenoids. **Biochemical Journal**, v. 114, p. 689-694, 1969.

GERVASI, P.G.; LONGO, V.; NALDI, F.; PANATTONI, G.; URSINO, F. Xenobiotic-metabolizing enzymes in human respiratory nasal mucosa. **Biochemical Pharmacology**, v. 41, p. 177–184, 1991.

GOEL, R.K.; TAVARES, I.A.; BENNETT, A. Stimulation of gastric and colonic mucosal eicosonoid synthesis by plantain banana. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 41, p. 747-750, 1989.

GOODMAN, D.; HUANG, H. Biosynthesis of vitamin A with rat intestinal enzymes. **Science**, v. 149, p. 879–880, 1965.

GONZÁLEZ-MONTELONGO, R.; LOBO, M.G.; GONZÁLEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, v. 71, p. 347–355, 2010.

GRAY, D.A.; CLARKE, M.J.; BAUX, C.; BUNTING, J.P.; SALTER, A.M. Antioxidant activity of oat extracts added to human LDL particles and in free radical trapping assays. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 209-218, 2002.

GRONDIN, R.; GOULET, M.; DI PAOLO, T.; BEDARD, P.J. Cabergoline, a longacting dopamine D2-like receptor agonist, produces a sustained antiparkinsonian effect with transient dyskinesias in

parkinsonian drug-naïve primates. **Brain Research**, v. 735, p. 298–306, 1996.

HALL, R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, p. 453-468, 2006.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural compounds of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, p. 1141-1148, 1983.

INIBAP - International Network for the Improvement of Banana and Plantain. **Net Working Banana and Plantain: Annual Report 2001**. France, 2002. 73p.

JENNER, P. Factors influencing the onset and persistence of dyskinesia in MPTP-treated primates. **Annals of Neurology**, v. 47, p. S90–99, 2000.

KANAZAWA, K.; SAKAKIBARA, H. High content of dopamine, a strong antioxidant, in cavendish banana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 844-848, 2000.

KIMURA, M. Fluorescence histochemical study on serotonin and catecholamin in some plants. **Journal of Pharmacology**, v. 18, p. 162-168, 1968.

KUKLIN, A.I.; CONGER, B.V. Cathecolamines in plants. **Journal of Plant Growth Regulators**, v. 14, p. 91-97, 1995.

KUKULA-KOCH, W.; ALIGIANNIS, N.; HALABALAKI, M.; SKALTSOUNIS, A.; GLOWNIAK, K.; KALPOUTZAKIS, E. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb. **Food Chemistry**, v. 138, p. 406–413, 2013.

KULMA, A.; SZOPA, J. Catecholamines are active compounds in plants. **Plant Science**, v. 172, p. 433–440, 2007.

KHURANA, J.P.; TAMOT, B.K.; MAHESHWARI, N.; MAHESHWARI, S.C. Role of catecholamines in promotion of flowering

in a short-day duckweed, *Lemna paucicostata* 6746. **Plant Physiology**, v. 85, p. 10–12, 1987.

LAY, J.O.; BORGMANN, S.; LIYANAGE, R.; WILKINS, C.L. Problems with the omics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, p. 1046-1056, 2006.

LINDLEY, M.G. The impact of food processing and antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, p. 336–340, 1998.

LOESECK, J. Chemical changes during ripening bananas. **Chemistry Physiology and Technology**, v. 4, p. 67–11, 1950.

MARASCHIN, R.P.; IANSEN, C.; OGLIARI, J.B.; DIAS, P.F.; MARASCHIN, M.; CIMADON, A.M.A.; ZANUS, C.; CAROET, M.S.B. Flash-chromatography and ¹H-NMR analysis of Brazilian Cabernet Sauvignon wines - A chemical composition similarity study. In: VII JORNADA BRASILEIRA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR, Maringá, 2002. **Anais**. Rio de Janeiro, 2002.

MÉLO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 639-644, 2006.

MENESES, N.G.T.; MARTINS, S.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATTO, S.I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. **Separation and Purification Technology**, v. 108, p. 152–158, 2013.

MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NUNEZ, J.M.; PARAJO, C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171. 2001.

MURATA, K.; NODAK, K.; KOHNO, E.; SAMEJIMA, M. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Dopamine in Dogs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, p. 565-568, 1988.

NAMIKI, M. Antioxidant/antimutagens in food. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, p. 272–300, 1990.

NEWMAN, M.; ROEPENACK-LAHAYE, E.; PARR, A.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. Induction of hydroxycinnamoyl-tyramine conjugates in pepper by *Xanthomonas campestris*, a plant defense response activated by hrp gene-dependent and hrp gene-independent mechanisms. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, p. 785–792, 2001.

OLANOW, C.W.; JENNER, P.; BEAL, M.F. Cell death and neuroprotection in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 44, p. S1-S196, 1998.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543-555, 2000.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PAPAS, A.M. Diet and antioxidant status. In A.M. Papas (Ed.), **Antioxidant status, diet, nutrition and health**. London/New York/Washington, DC: CRC Press, 1999. 672 p.

PAPOTTI, G.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; ROSSI, M.C. Use of HR-NMR to classify propolis obtained using different harvesting methods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1610–1618, 2010.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp.*)** 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1247-1256, 2002.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological Sciences**, v. 85, p. 809-822, 2005.

ROCHFORT, S. Metabolomics Reviewed: A new omics platform technology for systems biology and implications for natural products research. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1813-1820, 2005.

ROEPENACK-LAHAYE, E.; NEWMAN, M.A.; SCHORNACK, S.; HAMMOND-KOSACK, K.E.; LAHAYE, T., JONES, J.D.G.; DANIELS, M.J.; DOW, J.M. *p*-Coumaroylnoradrenaline, a novel plant metabolite implicated in tomato defence against pathogens. **The Journal of Chemical Biology**, v. 278, p. 43373-43383, 2003.

ROSHCHINA, V.V. Neuromediators, their synthesis and metabolism. In **Neurotransmitters in plant life**. Science Publishers, 2001. 17-39 p.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudos de mercado SEBRAE/ESPM: Banana relatório completo**, 2008. 88p.

SETIAWAN, B.; SULAEMAN, A.; GIRAUD, D.W.; DRISKELL, J.A. Carotenoid content of selected Indonesian fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 169-176, 2001.

SMITH, T. Secondary plant products, in: E.A. Bell, B.V. Charlwood (Eds.), **Encyclopedia of Plant Physiology New Series**, v. 8, p. 433-440, 1980.

SOARES, M.A.; ALVES, R.C.; PIRES, P.C.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; VINHA, A. F. Angolan *Cymbopogon citratus* used for therapeutic benefits: Nutritional composition and influence of solvents in phytochemicals content and antioxidant activity of leaf extracts. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 413-418, 2013.

SOMEYA, S.; YOSHIKI, Y.; OKUBO, K. Antioxidant compounds from bananas (*Musa cavendish*). **Food Chemistry**, v. 79, p. 351-354, 2002.

STEINER, U., SCHLIEMANN, W., STRACK, D. Assay for tyrosine hydroxylation activity of tyrosinase from betalain-forming plants and cell cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 238, p. 72–75, 1996.

STITT, M.; FERNIE, A.R. From measurement of metabolites to metabolomics an ‘on the fly’ perspective illustrated by recent studies of carbon–nitrogen interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, p. 136–144, 2003.

STRAUS, S.K. Recent developments in solid-state magic-angle spinning, nuclear magnetic resonance of fully and significantly isotopically labelled peptides and proteins. **Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences**, v. 359, p. 997-1008, 2004.

SULAIMAN, S.F.; YUSOFF, N.A.M.; ELDEN, I.M.; SEOW, E.M.; SUPRIATNO, A.A.B.S.; OOI, K.L. Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight alaysian bananas (*Musa sp.*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1-10, 2011.

SUMNER, L.W.; MENDES, P.; DIXON, R.A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, p.817–836, 2003.

SWIEDRYCH, A.; LORENC-KUKULA, K.; SKIRY CZ, A.; SZOPA, J. The catecholamine biosynthesis route in potato is affected by stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, p. 593–600, 2004.

SZOPA, J.; WILCZYNSKI, G.; FIEHN, O.; WENCZEL, A.; WILLMITZER, L. Identification and quantification of catecholamines in potato plants (*Solanum tuberosum*) by GC–MS. **Phytochemistry**, v. 58, p. 315–320, 2001.

TOOR, R.K.; SAVAGE, G.P. Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. **Food Chemistry**, v. 99, p. 724–727, 2006.

TSAO, R.; DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 85–99, 2004.

VALDÉS, H.; LEYES, E.R.; REGO, H.P.L.; SANABIA, M.L.G. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v. 5, p. 17-22. 2000.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113–4117, 1998.

WAGNER, C.; SEFKOW, M.; KOPKA, J. Construction and application of a mass spectral and retention time index database generated from plant GC/EI-TOF-MS metabolite profiles. **Phytochemistry**, v. 62, p. 887–900, 2003.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, C.; FAN, Y.; LEE, S.; LIAN, J.; LIOU, J.; WANG, H. Systemic and brain bioavailabilities of D-Phenylglycine-LDopa, a sustained dopamine-releasing prodrug. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, p. 136-141, 2013.

WIRTZ, G.M.; BONEMANN, C.; GIGER, A.; MÜLLER, R.K.; SCHNEIDER, H.; SCHLOTTERBECK, G.; SCHIEFER, G.; WOGGON, W.D. The substrate specificity of β -carotene 15,15'-monooxygenase. **Helvetica Chimica Acta**, v. 84, p. 2301-2315, 2001.

YEUM, K.J.; RUSSEL, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 483–504, 2002.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R.T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 41-48, 2006.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M. Antioxidant properties of hard winter wheat extracts. **Food Chemistry**, 78, 457-461, 2002.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais**: sob a ótica da química medicinal moderna. Editora: Argos, 2001. 500p.

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

ZHANG, P.; WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N.; HAMAKER, B.R. Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility - a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 59, p. 443-458, 2005.

Capítulo 2: Potencial cicatrizante de extratos supercrítico e convencional de casca de banana e seus perfis de composição química

1. Introdução

1.1. Cicatrização de lesões

A cicatrização de lesões é um processo complexo que requer a participação de diversos tecidos e linhagens celulares. O maior objetivo da biologia da cicatrização é compreender como a pele pode ser induzida a reconstruir-se da forma mais perfeita, i.e., sem que seja formada uma cicatriz, após ter sofrido um dano em sua estrutura. Por isso, considera-se estudar o processo cicatricial a nível embrionário, em que o reparo ocorre de forma rápida e eficiente e resulta em uma regeneração tecidual perfeita, sem a perda de características originais do tecido regenerado (MARTIN, 1997).

O primeiro evento que ocorre após uma lesão é a formação de um coágulo (Fig. 32a), i.e., um agregado de plaquetas que convertem o fibrinogênio em fibrina. Neste ambiente há citocinas e fatores de crescimento secretados devido à degranulação das plaquetas. O início de toda essa mobilização do organismo se dá a partir da lesão, a qual atinge também os vasos sanguíneos. Tem por objetivo conter o extravasamento de sangue, recrutar células circulantes para o leito da lesão, dar início aos processos de reepitelização e estimular a angiogênese característica do processo cicatricial. Portanto, logo após uma lesão várias rotas metabólicas são imediatamente ativadas e sincronizadas a fim de restabelecer a homeostase tissular que foi perturbada (MARTIN, 1997; CLARK, 1993).

Acredita-se que as plaquetas são células de suma importância à cicatrização de lesões, sendo responsáveis por iniciar o evento de coagulação através da liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e do fator de crescimento transformador β no leito da lesão, iniciando assim a ativação de fibroblastos e demais células mesenquimais (MARTIN, 1997).

Os monócitos (denominados de macrófagos quando saem dos vasos e instalam-se nos tecidos) são recrutados da circulação sanguínea em resposta a eventos moleculares na superfície das células endoteliais, direcionando capilares ao leito da lesão (SPRINGER, 1994). Os macrófagos são células do sistema imune que aparecem na sequência no leito da lesão e sua função primordial é fagocitar componentes da matriz

e debris celulares, limpando a área lesionada. Todas estas células do sistema imune liberam de maneira contínua citocinas, fatores de crescimento e radicais livres, os quais são responsáveis pela sinalização celular destinada ao reparo tecidual, além de amplificarem os sinais inflamatórios (Fig. 32b) (FRENCH-CONSTANT et al., 1989).

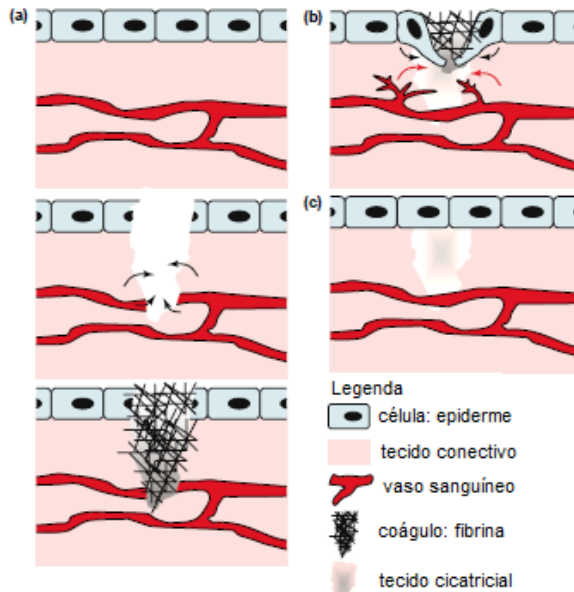


Figura 32. Esquema do leito da lesão durante o processo de cicatrização de tecido epitelial (a) minutos antes da camada de células epidermais (azul) ser rompida e o tecido conectivo (cor de rosa) ser danificado. Vasos sanguíneos (vermelho); (b) horas após a lesão: a resposta angiogênica já foi acionada e as células da borda da epiderme começam a migrar uma em direção a outra; (c) Quando a epiderme cicatriza, os brotamentos dos vasos sofrem apoptose, há contração do tecido conectivo, restando a cicatriz dérmica. Os leucócitos são ativados e migram ao leito da lesão (a) e seu pico de atividade é observado no estágio (b). Geralmente a inflamação é resolvida no estágio (c). Adaptado de Martin e Leibovich (2005).

Pesquisas recentes identificaram que o oxigênio e radicais livres derivados não são requeridos somente para desinfetar as lesões. Essa sinalização sensível às condições de oxirredução relacionadas ao oxigênio representam um componente integral da cascata de eventos

envolvidos na cicatrização. O conhecimento de que radicais livres são necessariamente agentes de destruição para o hospedeiro está agora enfrentando algumas mudanças (LINNANE; KIOS; VITETTA, 2007). Há mais de uma década, foi proposto que em sistemas biológicos oxidantes que oxidantes como H_2O_2 atuam como sinalizadores às células, regulando diversos eventos metabólicos (SEN; PACKER, 1996).

De acordo com Martin e Leibovich (2005), uma série de experimentos na década de 1970 mostrou que, desde que as condições de esterilidade fossem mantidas, a depleção de neutrófilos, surpreendentemente, não parecia interferir no reparo tecidual. Entretanto, a depleção de macrófagos impediu a limpeza do leito da lesão e o processo cicatricial não ocorreu de forma desejada. Devido a estes resultados, considera-se que a resposta inflamatória está diretamente relacionada ao processo de reparação. E somente ao final do processo cicatricial que essas células inflamatórias deixam o leito da lesão, sendo consideradas essenciais à cicatrização.

Em um tecido epitelial que não sofreu lesão, os queratinócitos estão ancorados na matriz extracelular através de hemidesmossos. Os hemidesmossos estão ligados à laminina na lâmina basal através de integrinas, e possuem ligações intracelulares com o citoesqueleto de queratina. Quando ocorre uma lesão, toda essa rede de ligações entre moléculas, que tem por função dar suporte aos queratinócitos e permitir sua migração, é desestruturada. O rearranjo desta matriz pode contribuir retardando o processo cicatricial, pois impede a migração de células epidérmicas (CAVANI et al. 1993; BREUSS et al. 1995).

1.2. Estudo fitoquímico: aspectos relacionados à extração de compostos bioativos

É relevante o volume de investigações fitoquímicas em organismos terrestres, além de outras fontes como organismos marinhos, insetos e microorganismos. Isso se deve à diversidade molecular dessas fontes de matéria-prima, um fator importante na procura de novos compostos com propriedades físico-químicas e atividades biológicas relevantes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Uma das maneiras de se extrair valor econômico da biodiversidade é a bioprospecção. Bioprospecção é definida como sendo a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos, que tenham potencial econômico e, possivelmente, levem ao desenvolvimento de um produto

(SACCARO; JÚNIOR, 2011). Em 2003, estimava-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica eram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Atualmente, esse valor está em torno de 50% (SACCARO; JÚNIOR, 2011). A respeito dos medicamentos anticâncer, aproximadamente dois terços destes são de origem natural, provenientes de organismos marinhos e terrestres (UNU-IAS, 2005). Portanto, o papel da bioprospecção no setor farmacêutico é bastante relevante, uma vez que diversos fármacos estão sendo desenvolvidos a partir de produtos naturais.

Tem sido crescente a importância dos estudos químicos e farmacológicos envolvendo extratos de produtos naturais devido, especialmente, à caracterização de novos compostos com atividade terapêutica e aos custos elevados da pesquisa e da elaboração de medicamentos sintéticos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001). Neste contexto, observa-se também uma ênfase considerável na recuperação, reciclagem e melhoramento de resíduos de biomassas vegetais, os quais, consoante aos seus volumes residuais e tecnologia empregada, podem ser convertidos a produtos comerciais e/ou matéria-prima para processos secundários (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003). A casca de banana (*Musa* sp., cultivar Prata Anã) insere-se neste cenário, devido à elevada quantidade de resíduo e também por possuir histórico de uso popular como agente cicatrizante.

A fim de elucidar a composição química de biomassas vegetais, as quais podem ser a base de novos medicamentos, os extratos de plantas medicinais devem ser analisados quanto ao seu perfil químico, utilizando-se diversas abordagens analíticas, tais como as cromatografias líquida e gasosa, a espectrometria de massa, a espectrofotometria UV-visível e as espectroscopias de ressonância magnética nuclear (RMN) e infravermelho (IV), por exemplo (WOLFENDER; NDJOKO; HOSTETTMANN, 2003).

Além da correta identificação dos compostos com propriedades funcionais presentes na casca de banana, é importante que este potencial seja preservado durante a extração. Aspectos como qualidade e composição de fitoterápicos estão relacionados fundamentalmente com a técnica de extração empregada na preparação dos extratos de produtos naturais. As extrações com solventes orgânicos podem utilizar uma ampla variedade de (organo)solventes, e.g., álcoois metílico e etílico, hexano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, água, éter de petróleo. São técnicas comumente aplicadas nas indústrias química, farmacêutica

e de alimentos para a produção de extratos diversos (MEZZOMO, 2008).

Dentre os métodos tradicionais de extração com solvente orgânico mencionam-se a extração utilizando soxhlet e a maceração. Em ambos, o principal inconveniente é a necessidade de eliminação do solvente após a extração, o que dependendo da metodologia utilizada pode causar a degradação dos compostos obtidos, além da presença residual de solventes (MEZZOMO, 2008).

Acoplado à extração convencional, é possível utilizar artifícios a fim de otimizar o processo como, por exemplo, as técnicas de tratamento amostral com radiações na faixa do microondas e o ultrassom.

Durante o processo de extração, a sonicação ou ultrassom provoca o rompimento celular e a redução do tamanho das partículas, proporcionando uma área de contato maior entre as fases sólida e líquida, melhorando o acesso do solvente e o rendimento da extração, comparativamente aos métodos tradicionais (ZHOU; LI; ZHANG, 2009).

As microondas são um tipo de energia radiante e, assim como as ondas de rádio, a luz visível, o infravermelho e a eletricidade, fazem parte do espectro eletromagnético, ou seja, constituem uma forma de radiação eletromagnética. A radiação na faixa de microondas é não-ionizante pois, diferentemente dos raios-X, α , β e γ , seus efeitos são estritamente térmicos e, portanto, não alteram a estrutura molecular dos analitos irradiados (CARVALHO, 2005).

O princípio básico da radiação microondas é o aquecimento por vibração molecular. As radiações penetram superficialmente no material vegetal (2 a 4 cm) fazendo vibrar as moléculas na frequência de 2,45 GHz, por exemplo. Os quanta de energia são fracamente absorvidos por moléculas polares como água e açúcares, através do fenômeno de ressonância. Moléculas polares são capazes de se alinhar com o campo elétrico das ondas e este muda de direção de acordo com a frequência, cada molécula tende a acompanhar essas mudanças, arrastando moléculas vizinhas. Essa agitação resulta no aumento da energia cinética das moléculas e, como consequência, ocorre o aumento da temperatura. O calor é transmitido às moléculas mais profundas por condução, ou seja, as moléculas que vibram, chocam-se com as outras, fazendo-as vibrar também. Somente moléculas de água, gordura e açúcar entram em ressonância quando expostas à radiação microondas (CARVALHO, 2005).

Em escala laboratorial, a preparação de extratos vegetais é bastante diversificada considerando, por exemplo, o uso de técnicas convencionais de extração como a maceração adicionada de procedimentos que aumentam a interação entre a matéria-prima e o solvente. Além disso, os extratos vegetais também podem ser obtidos através de técnicas mais elaboradas como a extração supercrítica (ESC) que emprega gases pressurizados como o dióxido de carbono (CO_2), por exemplo. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso na obtenção de compostos naturais biologicamente ativos (MEZZOMO, 2008) e destaca-se por ser de baixo impacto ambiental e pela qualidade dos extratos obtidos (KHAJEH et al. 2004). A ESC mostra-se adequada especialmente às substâncias termicamente ou quimicamente instáveis e de baixa polaridade, além de ser um método de extração rápido e eficiente quanto ao uso de solventes (CALIXTO; YUNES, 2001).

De fato, a ESC diferencia-se das outras técnicas pela produção de extratos isentos de solvente, além de permitir o fácil controle da seletividade do processo. Esta técnica destaca-se como processo alternativo de extração, que emprega gases densos como solventes de extração, em operações à alta pressão. Um fluido submetido à pressão e temperatura acima de seu ponto crítico torna-se supercrítico. Várias propriedades dos fluidos são alteradas sob essas condições, e.g., a densidade do fluido supercrítico é similar a dos líquidos, sua viscosidade assemelha-se a dos gases e sua capacidade de difusão é intermediária entre os dois estados. Portanto, o estado supercrítico de fluidos pode ser definido como o estado no qual líquido e gás são indistinguíveis entre si (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006). Devido à sua baixa viscosidade e alta capacidade de difusão, os fluidos supercríticos apresentam propriedades de transporte melhores que os líquidos. Podem se difundir facilmente através de materiais sólidos, resultando em melhores rendimentos nas extrações (DEL VALLE; AGUILLERA, 1999; RAVENTÓS; DUARTE; ALARCÓN, 2002).

O CO_2 é o solvente supercrítico mais empregado no processo de extração por ESC que, por sua natureza apolar, dissolve preferencialmente compostos apolares. Substâncias de alta polaridade também podem ser extraídas com CO_2 supercrítico em altas densidades (altas pressões de operação) e/ou mediante o emprego de co-solventes, como o etanol e o metanol, com os quais é possível aumentar o espectro de substâncias solúveis ao CO_2 . Estes co-solventes, normalmente compostos orgânicos, são adicionados ao CO_2 em baixas concentrações para aumentar o rendimento do processo e a seletividade dos extratos (PASQUEL et al. 2000; POKORNY; KORCZAC, 2001).

Conforme representado na Figura 33, na extração supercrítica de matrizes sólidas, como a farinha das cascas de banana, o solvente supercrítico, usualmente o CO₂, escoo através do leito fixo dessas partículas sólidas, solubilizando parte de seus constituintes químicos. O esgotamento do sólido ocorre na direção do escoamento, enquanto a massa de extrato na fase solvente aumenta na mesma direção. O solvente flui através do leito fixo e arrasta consigo os solutos. Na saída do extrator, encontra uma válvula de expansão e retorna ao estado gasoso e, finalmente, o soluto é coletado (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

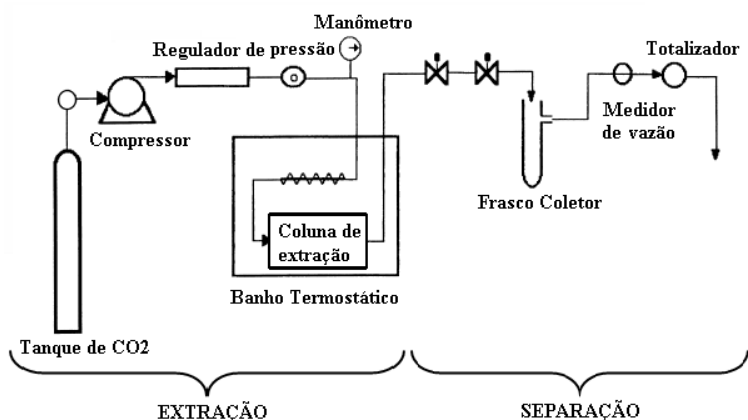


Figura 33. Diagrama esquemático da extração supercrítica de matrizes sólidas (FERREIRA et al. 1999).

A intervenção no processo de regeneração do tecido lesionado visa tanto condicionar este local à repavimentação celular, quanto acelerar o processo como um todo até que seja atingida a homeostasia tecidual sem nenhum prejuízo ou formação de cicatriz. É sabido que ambos os extratos bruto aquoso e bruto hidroetanólico de cascas de banana apresentam potencial cicatrizante eficaz, quando aplicados ao modelo de excisão tecidual em camundongos (PEREIRA, 2010). Desta forma, os extratos de cascas de banana utilizados no modelo de lesão tecidual por excisão do presente estudo foram desenvolvidos considerando a diferença de polaridade e o tamanho das moléculas que os compõe, na tentativa de isolar classes de composto e, possivelmente, relacioná-las ao potencial cicatrizante de seu respectivo extrato.

Portanto, através de métodos convencionais de extração e da extração supercrítica foram obtidos 8 extratos de cascas de banana (*Musa* sp., cultivar Prata Anã). E estes extratos foram submetidos ao modelo de cicatrização por excisão tecidual em camundongos isogênicos Balb/C a fim de se dimensionar o seu potencial cicatrizante. Concomitantemente, os extratos obtidos foram submetidos as análises fitoquímicas para determinação do perfil de compostos fenólicos e/ou perfil carotenóidico.

Os extratos de casca de banana da cultivar Prata Anã (*Musa* sp.) apresentam ação cicatrizante, consoante ao seu perfil de composição química. Assume-se que conhecendo a composição química dos extratos de casca de banana, será possível relacioná-la a sua ação terapêutica, i.e., capaz de promover a regeneração tecidual.

2. Material e métodos

2.1. Pré-processamento do material vegetal

Conforme descrito no Capítulo 1, item 2.1.

2.2. Procedimentos de extração

Amostras de cascas de banana seca foram trituradas em moinho de laboratório para a obtenção de uma farinha (60 *mesh*). Os experimentos de extração supercrítica ocorreram junto ao Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC/UFSC), sob a orientação da professora Dra. Sandra Regina Salvador Ferreira. Os experimentos utilizando métodos de extração convencional foram realizados no Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV/UFSC).

2.2.1. Extração supercrítica (ESC)

Os experimentos de extração supercrítica para obtenção do ESC foram realizados empregando-se o método dinâmico de extração que se caracteriza pela passagem contínua do solvente supercrítico pela matriz sólida. O extrator supercrítico (Thermische Verfahrenstechnik da Technische Universität Hamburg-Harburg, Germany) operou à pressão máxima de 300 bar, com vazões de solvente de 1,67 g/min a 13,33 g/min. A unidade de ESC é apresentada com algum detalhamento na Figura 34.

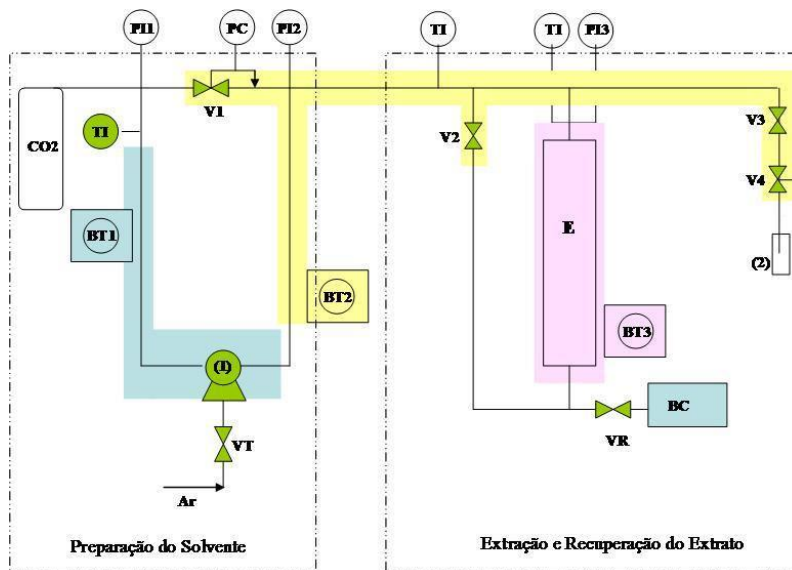


Figura 34. Diagrama esquemático do equipamento de ESC (LATESC-UFSC) utilizado nos experimentos, onde E: Extrator; VT: Válvula de controle da frequência da bomba; V1: Válvula reguladora de pressão; V2, V3 e V4: Válvulas da entrada, saída e micrométrica do extrator, respectivamente; PI1: Manômetro de controle do cilindro cilindro de CO₂ com 99,9 % de pureza; PI2: Manômetro de controle da bomba; PI3: Manômetro de controle do extrator; TI: Controladores de temperatura (ZETZL; BRUNNER; MEIRELESS, 2003).

2.2.1.1. ESC com CO₂

As condições de operação à extração supercrítica utilizando CO₂ foram:

1) 20g de casca de banana pré-processada (seca à 45 °C e triturada, 60 *mesh*) constituindo o leito fixo de partículas, pressão de extração de 300 bar, 40°C e dióxido de carbono (CO₂) como solvente supercrítico na condição de densidade de 840 kg/m³ (ZHOU; LI; ZHANG, 2009). O extrato derivado de extração supercrítica I denominou-se ESC I. O tempo de extração foi de 4 horas para uma vazão de solvente de 3,0 g/min, conforme os resultados de ROSSO (2009);

2) Com a mesma condição de vazão de solvente e massa de matéria-prima para formar o leito de sólidos foi realizado o fracionamento de ESC I: (a) ESC II, obtido sob condições de pressão de 100 bar, 40 °C e 1h de extração, constituindo por compostos de baixo peso molecular; e (b) ESC III, obtido na condição de 300 bar, 40 °C, 3h de extração, aplicada na mesma matriz após a separação do extrato ESC II. Nesta etapa foram obtidos os compostos de alto peso molecular (ROSSO, 2009).

2.2.1.2. ESC com CO₂ e co-solvente

A adição de co-solvente (CS) à extração supercrítica utilizou uma bomba de CS acoplada ao equipamento de extração supercrítica, com vazão entre 0,1 e 10 ml/min. Nesta etapa, buscou-se aumentar o rendimento do processo extrativo, sem comprometer extensivamente a seletividade da operação. Etanol (p.a.) foi utilizado como co-solvente, em duas concentrações (m/m), calculado com base na massa de dióxido de carbono (ROSSO, 2009).

Os experimentos com co-solvente foram realizados nas condições de pressão de 300 bar, temperatura de 40°C, vazão média de 0,3 kg/h de CO₂ e tempo de extração de 4 h. O etanol foi empregado como co-solvente devido a seu grau alimentício e potencial cicatrizante do extrato bruto hidroetanólico de casca de banana, obtido por maceração daquela biomassa no referido organosolvente (PEREIRA, 2010). A quantidade de solvente necessária à obtenção da concentração desejada foi calculada com base na vazão de CO₂ e no tempo total de extração (PASQUEL et al. 1999). A obtenção dos extratos ESC IV e ESC V implicou em duas concentrações do co-solvente utilizado neste processo, a saber 2% e 5% (m/m), respectivamente.

2.2.2. Extração utilizando métodos convencionais

2.2.2.1. Extração assistida por ultrassom

No procedimento de sonicação das amostras, 15 mL de água destilada foram adicionados a 1g de farinha de cascas de banana seca, seguido de exposição ao ultrassom (150 W, 40 kHz) a 25°C por 10, 20, 30, 40 50 ou 60 min. O extrato obtido foi filtrado em suporte de celulose sob vácuo e o sobrenadante recuperado denominou-se extrato ultrassom (EU).

A eficiência do processo de extração dos compostos de interesse foi monitorada por espectrofotometria UV-visível (UV-Vis). O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado nas amostras dos extratos conforme metodologia descrita por Randhir e colaboradores (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão (epigalocatequina galato - 50 µg/mL - 1250 µg/mL - $y = 0,0002x$, $r^2 = 0,99$) e os resultados foram expressos em equivalentes de epigalocatequina galato/g de biomassa seca. As análises foram realizadas em triplicata. Os conteúdos médios de compostos fenólicos totais foram comparados através da análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad Instat® 3.

2.2.2.2. Extração assistida por micro-ondas

O procedimento de extração utilizando radiação microondas foi testado irradiando-se as amostras (1g) de farinha de casca de banana seca na presença de 3 volumes de água destilada, em forno de microondas nos tempos de 10, 30 e 60 segundos na frequência de 2,45 GHz. O extrato obtido foi denominado extrato de microondas (EM). A eficiência do processo de extração dos compostos de interesse foi monitorada por espectrofotometria UV-Vis e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito subsequentemente.

2.2.2.3. Extrato bruto aquoso

Para a obtenção do extrato bruto aquoso (EBA), a 1 g de farinha de cascas de banana seca a 45°C foram adicionados 15 mL de água destilada. O conteúdo foi incubado em banho-maria (37°C, 30min), seguido de centrifugação (4.000 rpm, 15 min) e recuperação do sobrenadante, i.e., extrato bruto aquoso.

2.3. Monitoramento do perfil químico de extratos de casca de banana por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, acoplada a espectrofotometria UV-Vis (FR –CLAE-UV-Vis)

2.3.1. Compostos fenólicos

Alíquotas (10 µL) de amostras dos extratos de casca de banana foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna de fase reversa C18 (Shim-Pack CLC-ODS, 25 cm x 4,6 mm Ø interno, 5 µm partícula) e detector espectrofotométrico UV-

visível (280 nm). A eluição utilizou H₂O: AcOH: η -BuOH (350: 1: 10, v/v/v) como fase móvel, com fluxo de 0,8 mL/min e a identificação dos compostos de interesse (i.e., ácidos gálico, ferúlico, caféico, cinâmico, clorogênico, p-cumárico, quercetina, epicatequina, epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina galato) foi efetuada via comparação com os tempos de retenção e co-cromatografia de amostras padrões (Sigma - 100 μ g/mL), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos ácidos fenólicos utilizou uma curva padrão externa de ácido gálico (5 μ g/mL – 300 μ g/mL, $y = 35158x$, $r^2 = 0,99$), tendo como referencial a integral da área dos picos correspondentes. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 injeções consecutivas.

2.3.2. Carotenoides

Alíquotas (10 μ L) de extratos de casca de banana foram analisadas em um cromatógrafo líquido (Shimzadu LC-10A), equipado com coluna C18 de fase reversa (Vydac 201TP54, 250 mm x 4,6 mm \varnothing interno, 5 μ m partícula), pré-coluna (Vydac 218GK54, 5 μ m) e detector espectrofotométrico UV-visível operando em 450 nm. A eluição utilizou MeOH: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, em fluxo de 1 mL/min. A identificação dos compostos de interesse (i.e., α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina) considerou os tempos de retenção determinados a partir da análise de amostras de padrões analíticos (Sigma – 100 μ g/mL), sob as mesmas condições experimentais.

Para efeitos de cálculo do conteúdo dos compostos carotenóidicos, foi utilizada curva-padrão externa (1 μ g/mL – 50 μ g/mL, $y = 0,055207x$, $r^2 = 0,99$) e a integral dos picos correspondentes. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão de 3 injeções consecutivas. Os conteúdos médios de compostos carotenóidicos foram comparados através da análise de variância (ANOVA), com o auxílio do software GraphPad Instat® 3.

2.4. Padronização do extrato bruto aquoso

A fim de padronizar a composição química do extrato bruto aquoso (EBA) de casca de banana seca a 45°C, referente ao mês de Março de 2011, o qual apresentou o melhor desempenho nos ensaios de cicatrização *in vivo*, foram realizados todos os procedimentos referentes

à *Determinação do perfil químico de extratos de casca de banana* (Capítulo 1, item 2.3). Considerando a característica polar do extrato aquoso, esta não é satisfatória à obtenção de compostos apolares, conforme observado na química dos compostos carotenóidicos.

2.4.1. Quantificação de taninos

O processo de extração e quantificação de taninos das amostras baseou-se nas propriedades de precipitação de proteínas, i.e., gelatina, daqueles compostos, conforme descrito por Valdés e colaboradores (2000) e adaptado para análise de cascas de banana. O método utilizado consta de duas etapas, sendo a primeira relativa à quantificação de compostos fenólicos totais e a segunda de quantificação dos compostos fenólicos residuais, após a adsorção dos taninos em matriz proteica, i.e., gelatina.

A primeira etapa constitui-se da obtenção do extrato aquoso de casca de banana seca a 45 °C, conforme descrito no Capítulo 1, item 2.2.

Na segunda etapa desta metodologia, uma alíquota de 2 mL de extrato aquoso foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL com tampa. Em seguida, foram adicionados 8 mL de água destilada, 5 mL de solução de gelatina 25 %, 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio acidificado (ácido clorídrico 1%) e 1 g de Caolin. O meio de reação foi submetido a agitação durante 30 min e, em seguida, foi deixado em repouso por no mínimo 5 min e filtrado sob vácuo. O branco desta etapa constituiu-se de 10 mL de água destilada, 5 mL de solução de gelatina 25 %, 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio acidificado (HCl 1 %, v/v) e 1 g de Caolin, adicionados em balões volumétricos de 25 mL, conforme os procedimentos utilizados para as amostras.

Alíquotas de amostras da primeira e da segunda etapa tiveram o conteúdo de compostos fenólicos totais determinado conforme descrito no item 2.3.2.

O cálculo do conteúdo de taninos presente no extrato corresponde a diferença entre a concentração do conteúdo de compostos fenólicos totais da primeira etapa e a concentração de compostos fenólicos residuais da segunda etapa da metodologia. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso em média \pm desvio padrão.

2.4.2. Antibiograma

O antibiograma é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos,

também conhecido por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA). A metodologia de Kirby e Bauer para antibiograma é a mais difundida e utilizada até hoje na rotina de análises clínicas, devido a sua praticidade de execução, baixo custo e confiabilidade de seus resultados.

O procedimento consistiu no preparo da suspensão de cultivo recente de 3 espécies bacterianas da coleção bacteriológica ATCC, a saber: *Escherichia coli* (bactéria bacilar gram-negativa), *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria bacilar gram-negativa) e *Staphylococcus aureus* (bactéria esférica gram-positiva). Após a inoculação bacteriana em placa de ágar Mueller & Hinton, procedeu-se à adição dos discos de papel filtro impregnados com água destilada e extrato bruto aquoso de casca de banana nas concentrações de 30 µg/mL e 60 µg/mL. Após a incubação em estufa (36 °C, 24 h), analisou-se o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco através da medição do diâmetro do halo observado. Os resultados foram comparados com dados de inibição de halo de crescimento de antimicrobianos de uso clínico corrente, como auxílio de tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise (OLPLUSTIL et al. 2010).

2.5. Estratégia experimental

Inicialmente, na etapa I, os extratos da casca de banana seca a 45 °C (ESC II, ESC III, ESC IV, ESC V, EU, EM e EBA) foram avaliados quanto ao seu potencial cicatrizante, através do parâmetro denominado período de epitelização da lesão, relacionado à morfometria da lesão.

Dentre os oito extratos analisados, foram selecionados quatro deles, i.e., aqueles que proporcionaram o menor período de epitelização da lesão.

Na etapa II, os quatro extratos selecionados foram submetidos à avaliação do potencial cicatrizante, via estudos de quantificação de hidroxiprolina. Este parâmetro foi avaliado no dia zero (t_{zero}), sendo este o referencial basal dos animais, bem como ao final do período de cicatrização. Concomitantemente, e em intervalos de tempo de três dias, estabelecidos a partir do período de epitelização, foi determinada a porcentagem de redução da lesão ao longo do processo de cicatrização.

Na etapa III, foi selecionado o extrato que apresentou os melhores resultados na etapa II. Também foi realizado o estudo da metabolômica do processo cicatricial.

Além disso, foi determinado e analisado o perfil químico de todos os extratos de cascas de banana, através das técnicas espectrofotométrica, cromatográfica e espectroscópica, sendo

consideradas as suas características químicas conforme as condições de obtenção dos extratos.

2.6. Estudo da atividade cicatrizante dos extratos derivados de extração supercrítica e de extração por métodos convencionais

Previamente ao início dos experimentos, o plano de trabalho foi submetido (protocolo PP00515) ao Comitê de Ética na Pesquisa com Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina para aprovação (nº processo: 23080.040941/2010-19).

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos de linhagem isogênica Balb/C (*Mus musculus*), machos (20 ± 2 g de peso), com aproximadamente 60 dias, obtidos a partir de reprodução controlada realizada no biotério setorial do Laboratório de Bioquímica experimental (LABIOEX), no Centro de Ciências Biológicas, sob responsabilidade da professora. Dra. Rozangela Curi Pedrosa.

Os animais foram mantidos conforme recomendações de *guidelines* reconhecidos internacionalmente e destinados à criação e ao manejo de animais para a pesquisa. Assim, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas sob condições controladas (ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura $25 \pm 2^\circ$ C e 60% de umidade do ar), recebendo ração comercial autoclavada e água *ad libitum* para adaptação (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Os ensaios que caracterizam o potencial cicatrizante foram desenvolvidos no biotério Neonatal Experimental, no Centro de Ciências Biológicas, sob responsabilidade do professor Dr. Paulo Fernando Dias.

2.6.1. Animais e tratamento

Camundongos isogênicos Balb/C foram submetidos a procedimento anestésico (solução de quetamina 90 mg/kg e xilazina 15 mg/kg), seguido da tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear, assepsia do local (álcool 70%) e delimitação da área de um cm². Posteriormente, foi realizada a excisão de um cm² de tecido epitelial dorsal (FRANK, KÄMPFER, 2003). Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e sem maravalha. A maravalha foi substituída por folhas de papel toalha, no intuito de não interferir no processo cicatricial, evitando o contato com a área da lesão

e possível contaminação. Limpezas diárias das gaiolas foram realizadas durante o período experimental.

Estando os camundongos devidamente acondicionados, estes foram distribuídos entre os grupos experimentais (n = seis animais/grupo):

- *grupo Ia*: grupo controle negativo, em que os animais receberam aplicação tópica de água (veículo para diluição dos extratos), com início imediatamente após o procedimento cirúrgico;

- *grupo Ib*: grupo controle negativo, em que os animais não receberam tratamento (grupo controle para efeito de comparação com os animais tratados com extrato derivado da extração supercrítica);

- *grupo II*: grupo controle positivo, em que os animais receberam aplicação tópica de solução de alantoína (50 mg/kg/dia);

- *grupos III a X*: correspondente aos grupos testes, em que os animais de cada grupo receberam aplicação tópica dos oito extratos de cascas de banana seca (50 mg/kg/dia): ESC I, ESC II, ESC III, ESC IV, ESC V, EU, EM e EBA, respectivamente.

A aplicação tópica da solução de tratamento, tanto de alantoína quanto dos extratos de casca de banana (50 mg/kg/dia), foi realizada através da pipetagem de 100 µL, volume suficiente para cobrir a área da lesão inicial (um cm²). Os extratos derivados de ESC foram aplicados na forma sólida. O material foi aplicado de acordo com o peso de cada animal submetido ao tratamento, considerando a dose correspondente a 50 mg/kg/dia.

Todos os animais receberam solução de paracetamol (110 mg/kg – via oral, duas vezes ao dia) como tratamento pós-operatório, 24h após o procedimento cirúrgico, e durante todo o período experimental.

Neste estudo, o processo de reparação tecidual de lesões cutâneas, experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos Balb/C, foi avaliado do ponto de vista da cinética de regressão da área da lesão ao longo do tempo, a nível macroscópico, abordando parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato vegetal.

A dose escolhida para o tratamento das lesões deste estudo, em um primeiro momento e durante a análise do período de epitelização, foi de 50 mg/kg/dia de extrato bruto aquoso de casca de banana *Musa* sp., cultivar Prata Anã, considerando resultados prévios obtidos por Pereira (2010). Como os resultados foram semelhantes aos de Pereira (2010), convencionou-se a dose de 50 mg/kg/dia para a análise dos demais extratos a fim de comparar as diversas metodologias de extração propostas para este estudo.

A alantoína, controle positivo no modelo experimental em estudo, foi isolada e caracterizada quimicamente por Vanquelin e Buniva, em 1800, e posteriormente sintetizada por Grimax, em 1876 (SHESTOPALOV et al., 2006). Este composto é o produto final da metabolização da purina e está amplamente disseminada nos vegetais. É um produto de extração obtido a partir da raiz do confrei (*Symphitum officinale* Linn.), utilizado por suas propriedades cicatrizantes, mesmo antes de se ter comprovado experimentalmente suas propriedades queratolítica, hidratante e epitelizante, ou seja, promotora da proliferação celular e cicatrizante (PEREIRA, 2003). Atualmente, a alantoína utilizada na composição de produtos para cuidado da pele é de fonte sintética. Segundo relatos de vários pesquisadores (SHESTOPALOV et al. 2006; DRAELOS, 2001; MARTINDALE, 1993; JOANNE, 1988), este composto pode induzir a proliferação celular e, além disso, possui atividade antiinflamatória, antipéptica, antipsoríase, antiúlceras, imunoestimulante, queratolítica e analgésica, sendo amplamente utilizado em dermatologia.

2.6.2. Parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato vegetal

2.6.2.1. Morfometria da lesão

Esse parâmetro inclui a porcentagem de redução da lesão, que se dá através da comparação da área lesionada no dia do procedimento cirúrgico com a área cicatrizada a cada três dias, e o período de epitelização.

Para determinar a porcentagem de redução da lesão, as lesões foram fotografadas (Câmera Digital Sony Cyber-Shot 12.1), com distância padronizada, imediatamente após a cirurgia para retirada de tecido epitelial (área de 1 cm^2) e em intervalos de tempo de três dias, até a cicatrização total da lesão (FRANK; KÄMPFER, 2003). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software Image J, a partir das fotografias obtidas. A porcentagem de redução da lesão (%) foi calculada utilizando a fórmula: $\% = [(área\ cicatrizada) \times 100] / \text{área da lesão realizada no procedimento cirúrgico inicial}$.

As lesões localizadas no dorso dos animais foram observadas diariamente após o procedimento cirúrgico inicial para a determinação do período de epitelização. Esse período correspondeu ao número de dias necessários à completa cicatrização da lesão, ou seja, ausência de

indícios do processo cicatricial (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

2.6.2.2. Conteúdo de hidroxiprolina

A hidroxiprolina é um marcador bioquímico da cicatrização de feridas, pois é o principal aminoácido da constituição do colágeno. Para essa determinação, alíquotas de padrão de hidroxiprolina e de amostras de tecido epitelial cicatricial (20 mg) foram adicionadas de 500 µL de solução de NaOH 2N e incubadas em banho de areia, a 120 °C, durante 1 hora. As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 min) e uma alíquota (20 µL) do hidrolisado foi adicionado a 30 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2N e a 450 µL do reagente cloramina T, seguido de incubação por 25 minutos a temperatura ambiente. Após a adição de 500 µL do reagente de Ehrlich, as amostras foram incubadas em banho-maria a temperatura de 65 °C por 40 minutos. Na sequência, as amostras passaram por um ciclo de resfriamento de 10 min a temperatura ambiente, 15 min a 4 °C e, novamente, 10 min a temperatura ambiente a fim de estabilizar o cromóforo formado. A absorbância (550 nm) das soluções amostrais foi determinada em leitora de ELISA. Para a quantificação de hidroxiprolina foi utilizada uma curva-padrão externa (0 µg/mL - 500 µg/mL de N-acetil-L-hidroxiprolina > 99 %, Sigma 01192). As análises foram realizadas em triplicata, conforme metodologia adaptada de Reddy e Enwemeka (1996) e Ignat'eva e colaboradores (2007).

2.7. Análise estatística

Os dados experimentais foram coletados, sumarizados e submetidos à análise estatística univariada, i.e., análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste *t*, quando necessário, admitindo-se um nível de significância mínimo de 5%. Os resultados foram expressos em média ± erro padrão da média ou em média ± desvio padrão da média.

3. Resultados e discussão

A fim de estabelecer uma relação entre os resultados da determinação do potencial cicatrizante dos extratos de cascas de banana e a sua composição química, foi realizado o estudo da fitoquímica destas amostras complexas.

Em relação às técnicas empregadas para a obtenção dos extratos, foram utilizadas técnicas convencionais e a extração supercrítica. Entre as técnicas tradicionais, utilizaram-se a extração assistida por ultrassom, a extração assistida por microondas e o extrato obtido por maceração, à 37°C. Alternativamente aos métodos convencionais de extração de compostos de biomassas vegetais a extração supercrítica (ESC) utilizando o gás carbônico como solvente foi adotada.

A cicatrização é um processo complexo e dinâmico de restabelecimento das camadas de tecido epitelial e estruturas celulares, em uma área lesionada, o mais próximo possível ao seu estado normal. A contração da lesão é um processo que ocorre durante todo o período cicatricial (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

Ressalta-se que este estudo não utilizou fármacos para evitar a infecção das lesões, uma vez que estes, eventualmente, interferirem no processo de cicatrização. Entretanto, observaram-se técnicas antissépticas e assépticas visando manter o leito das lesões sem qualquer contaminação. Assim, os animais foram mantidos em gaiolas isoladas higienizadas diariamente.

Nesta estratégia experimental, o processo de reparação tecidual de lesões cutâneas por excisão tecidual, as quais foram experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos Balb/C, foi avaliado, num primeiro momento (etapa I), do ponto de vista da cinética temporal de regressão da área da lesão. A análise foi realizada a nível macroscópico, considerando uma das variáveis que caracteriza o potencial cicatrizante de um extrato: o período de epitelização.

3.1. Período de epitelização e perfis de composição química dos extratos de casca de banana

O período de epitelização foi determinado a partir da observação diária dos animais, sendo os resultados mostrados na Tabela 9. Um intervalo médio de quinze dias foi necessário à completa cicatrização dos tecidos cutâneos nos animais do grupo controle negativo, i.e., aonde animais tratados apenas com água (veículo utilizado à diluição dos extratos). Enquanto isso, o tratamento com solução de alantoína (controle positivo) reduziu o período médio à total regeneração tissular para 12 dias.

Tabela 9. Período de epitelização (dias) à conclusão do processo cicatricial determinado via modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com extrato de casca de banana (n=6, por grupo de tratamento).

Grupos de Tratamento	Período de Epitelização (dias)
CN	15
CP	12
ESC I	14,5 α
ESC II	12 α
ESC III	12 α
ESC IV	12,5 α
ESC V	12,5 α
EU	11 α,β
EM	13 α
EBA	9 α,β^*

Nota: Grupos de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo; ESC I, ESC II, ESC III, ESC IV, ESC V, EU, EM e EAB = grupos testes. A diferença estatística foi simbolizada por α,β $p<0,05$, onde α : CN e β : CP.

Os animais tratados com extrato aquoso diferiram ($p<0,05$) quanto à variável em estudo – período de epitelização - em relação aos grupos controle positivo e negativo, independente do método de extração utilizado (EU, EM e EBA). O grupo de animais tratados com EBA apresentou, estatisticamente, o menor período de re-epitelização (9 dias) do processo cicatricial, seguido do grupo de animais tratados com o EU (11 dias) e do grupo de tratamento utilizando EM (13 dias). O conteúdo de compostos fenólicos totais do EBA ($11,040 \pm 1,240$ mg/g de matéria seca – Tab.13) foi superior ao observado para o EU ($3,518 \pm 0,005$ mg/g de matéria seca – Tab. 10) e para o EM ($3,266 \pm 0,022$ mg/g de matéria seca – Tab. 11), sugerindo uma relação direta com o intervalo temporal necessário à completa cicatrização das lesões.

O ultrassom é uma tecnologia interessante e conhecida por acelerar o processo de extração de compostos a partir de biomassas

vegetais. Os efeitos mecânicos do ultrassom podem proporcionar maior penetração do solvente na matéria-prima vegetal, aumentando a transferência de massa. As ondas de ultrassom geram uma perturbação que pode romper as paredes celulares e facilitar a liberação dos componentes desta matriz (ZHOU; LI; ZHANG, 2009). Entretanto, O EBA, obtido através de maceração a 37°C, apresentou uma concentração, aproximadamente três vezes maior, quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, em relação ao EU. Acredita-se que a elevação da temperatura de 25°C (EU) - para 37°C (EBA) tenha proporcionado uma maior agitação molecular, comprometendo a estabilidade de membranas celulares e facilitando a extração e recuperação dos metabólitos de interesse.

O tempo de extração também afeta consideravelmente a recuperação dos polifenóis de matrizes complexas. O período de extração pode variar entre minutos a horas, no entanto, períodos mais longos de extração aumentam a possibilidade de oxidação daqueles metabólitos secundários (SHAIJI; NACZK, 1995). Em estudo realizado por Lapornik, Prosek e Wondra (2005) com resíduos de frutas vermelhas, extratos etanólicos, metanólicos e aquosos foram obtidos em tempos de incubação de 1, 12 e 24 horas. O conteúdo de polifenóis diminuiu no extrato aquoso com maior tempo de extração, enquanto nos extratos metanólicos e etanólicos detectou-se o efeito inverso, tipicamente demonstrando o efeito da natureza do solvente sobre a variável em estudo.

Os dados da Tabela 10 revelam o efeito do tempo de extração utilizando ultrassom em relação ao conteúdo de compostos fenólicos das cascas de banana em estudo. Aos 20 min do período de extração assistida por ultrassom detectou-se a maior concentração estatisticamente significativa de compostos fenólicos nos extratos das cascas de banana ($3,518 \pm 0,005$ mg/g casca seca). Entretanto, o procedimento de extração utilizando ultrassom reduziu o conteúdo de compostos fenólicos a partir de 30min do período experimental até o final deste (Tab. 10).

Comparando os valores de conteúdos totais de compostos fenólicos dos extratos aquosos de casca de banana seca obtidos com auxílio de ultrassom (Tab. 10) e microondas (Tab. 11), detectaram-se diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$) em favor do tratamento com ultrassom em relação à metodologia assistida por microondas.

Tabela 10. Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca) de extratos aquosos de casca de banana (março/2011) conforme o tempo de exposição da biomassa ao ultrassom, à 25 °C, utilizando espectrofotometria UV-visível.

Tempo (min)	Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca)
10	2,810 ± 0,005
20	3,518 ± 0,005*
30	2,453 ± 0,003
40	2,162 ± 0,007
50	2,085 ± 0,009
60	1,788 ± 0,008

Nota: A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os tempos de extração, considerando $p < 0,05$.

Na Tabela 12, estão dispostos os resultados da identificação e quantificação dos compostos fenólicos, presentes nos extratos das amostras de cascas de banana orgânica, através de cromatografia líquida de alta eficiência (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm). O conteúdo de ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina foi estatisticamente mais elevado no EBA em relação aos demais extratos (EU e EM). O conteúdo de compostos fenólicos em ESC II e ESC III foi irrelevante e, por isso, não foi adicionado à Tabela 12. Além disso, o conteúdo de ácido clorogênico foi estatisticamente mais elevado em EM, sendo que o EBA apresentou a menor concentração deste composto.

A solubilidade dos compostos fenólicos é atribuída à polaridade do solvente utilizado, seu grau de polimerização, sua interação com outros constituintes da biomassa aonde está inserido e à formação de complexos insolúveis. Assim, fatores como composição do solvente, tempo e temperatura de extração e relação solvente:amostra influenciam no rendimento de extração (WU et al. 2004; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005; NAM et al. 2005; SU et al. 2007).

A extração supercrítica tem sido empregada à obtenção de extratos de alto valor agregado tanto na área acadêmica como industrial, especialmente nos setores de alimentos, fármacos e cosméticos (ZANCAN et al. 2002; QUISPE-CONDORI et al. 2005; DANIELSKI; MICHIELIN; FERREIRA, 2007). A obtenção de compostos antioxidantes mediante extração com gases, como o dióxido de carbono, sob condições críticas de pressão e temperatura constitui método moderno e eficiente (POKORNY; KORCZAC, 2001). A ESC emprega

gases pressurizados como solventes e se diferencia das outras técnicas pela produção de extratos isentos de solvente e sem degradação térmica, além de permitir o fácil controle da seletividade do processo, aspecto relevante para sua utilização industrial (ZANCAN et al. 2002; DANIELSKI; MICHIELI; FERREIRA, 2007). Em função de suas propriedades relevantes, a ESC foi aplicada no presente estudo no intuito de se obter um extrato de casca de banana livre de solventes orgânicos que pudessem eventualmente interferir nos efeitos biológicos pretendidos e contendo em sua composição química compostos de natureza apolar.

Tabela 11. Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca) de extratos aquosos de casca de banana (março/2011), consoante ao tempo de exposição da biomassa à radiação microondas, utilizando espectrofotometria UV-visível.

Tempo (s)	Conteúdo de compostos fenólicos totais (mg/g de matéria seca)
10	0,991 ± 0,006
30	2,129 ± 0,013
60	3,266 ± 0,022*

Nota: A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparados os tempos de extração, considerando $p < 0,05$.

Tabela 12. Perfil químico de compostos fenólicos ($\mu\text{g/g}$ de matéria seca) de extratos de casca de banana (EBA, EU e EM – amostra de março/2011), utilizando FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm.

Extrato	Ácido gálico ($\mu\text{g/g}$)	Galocatequina ($\mu\text{g/g}$)	Epigalocatequina ($\mu\text{g/g}$)	Ácido clorogênico ($\mu\text{g/g}$)
EBA	37,50 ± 0,71	89,68 ± 0,52*	35,02 ± 2,03*	4,67 ± 0,32
EU	34,60 ± 2,51	51,65 ± 5,43	6,31 ± 0,34	7,44 ± 1,93
EM	31,45 ± 2,03	70,04 ± 3,64	16,24 ± 12,12	13,10 ± 0,49*

Nota: O conteúdo de compostos fenólicos de ESCII e ESC III foi irrelevante. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparado o EBA aos demais extratos, considerando $p < 0,05$.

As frações derivadas da ESC I, denominadas ESC II e III, são caracterizadas pela alta concentração de compostos de baixo e alto peso molecular, respectivamente. Os ESC II e III apresentaram períodos de

epitelização similares ao grupo controle positivo, cujo tratamento foi realizado com solução de alantoína, apesar da diferença entre as propriedades químicas dessas substâncias. Conforme a Figura 35, o perfil de compostos carotenóidicos de ESC II e ESC III apresentou como composto majoritário a luteína. Além disso, foram identificados os compostos zeaxantina, α -caroteno, *trans*- β -caroteno e *cis*- β -caroteno em ESC II e III.

Os produtos derivados da extração supercrítica (ESC II e ESC III) apresentam características apolares, tendo em sua composição química uma variedade de compostos carotenóidicos (Fig. 35), os quais estão possivelmente relacionados ao potencial cicatrizante. Entretanto, é possível afirmar que os compostos com características polares, i.e., os compostos fenólicos presentes nos extratos de casca de banana induzem a cicatrização de lesão por excisão tecidual de forma estatisticamente mais rápida. Este potencial está diretamente relacionado ao conteúdo destes compostos nos extratos ora estudados (Tab. 12). Acredita-se que o sinergismo entre os compostos fenólicos ácido gálico, galocatequina e epigallocatequina, está diretamente relacionado ao potencial cicatrizante evidenciado pelo tratamento com EBA das lesões *in vivo*.

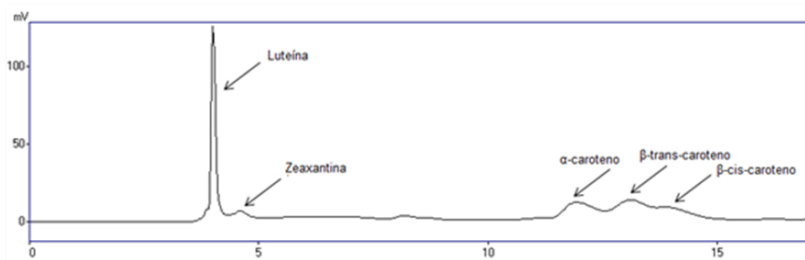


Figura 35. Perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) presentes em ESC II e ESC III da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.

Considerando o período de epitelização de nove dias descrito por Pereira (2010) no tratamento de lesões por excisão tecidual com extrato hidroetanólico de cascas de banana, propôs-se a extração supercrítica utilizando como co-solvente o etanol p.a., para obtenção de extrato com perfil de compostos polares e apolares. No presente estudo, o uso de etanol como co-solvente nas concentrações de 2% e 5% (m/m) gerou os extratos ESC IV e ESC V (Figs. 36 e 37). Os extratos derivados de extração supercrítica utilizando co-solvente polar proporcionaram um

período de epitelização de 12,5 dias, um dado estatisticamente relevante ($p < 0,05$) em relação aos grupos controle negativo e positivo (Tab. 9).

O etanol tem se mostrado um co-solvente muito útil na extração supercrítica. O extrato final pode ser utilizado em alimentos ou formulações farmacêuticas sem a preocupação de separar o extrato de um co-solvente que não possa ser consumido por humanos (LI; HARTLAND, 1992). Devido ao aumento no rendimento de extração de polifenóis, com a inclusão do etanol como co-solvente, alguns estudos foram direcionados exclusivamente à extração de determinados flavanóides. Isto porque, a solubilidade das catequinas em CO_2 em estado supercrítico cresce com o aumento da porcentagem de etanol adicionado ao sistema, devido a polaridade do co-solvente (BERNA et al. 2001). Todavia, o uso de co-solvente etanol nas concentrações de 2% (ESC IV) e 5%, (ESC V), não otimizou o processo cicatricial (12,5 dias para total cicatrização) comparativamente à aplicação do extrato hidroetanólico derivado da maceração das cascas de banana, i.e., nove dias à total cicatrização - PEREIRA, 2010).

Conforme a Figura 36, o perfil de compostos carotenóidicos de ESC IV e ESC V apresentou como composto majoritário a luteína. Além disso, foram identificados os compostos zeaxantina, α -caroteno e *trans*- β -caroteno em ESC IV e V. O perfil de compostos carotenóidicos de ESC II e III, quando comparado ao perfil de ESC IV e V, difere apenas quanto a presença de *cis*- β -caroteno. O carotenoide *cis*- β -caroteno está presente em ESC II e III, porém ausente em ESC IV e V.

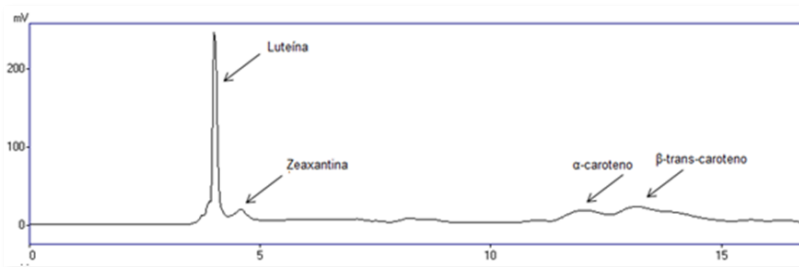


Figura 36. Perfil cromatográfico de compostos carotenóidicos (FR-CLAE-UV-Vis, 450 nm) presentes em ESC IV e ESC V da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.

Compostos fenólicos não foram detectados em ESC II e III por CLAE conforme esperado, devido às características do processo de extração. O perfil de compostos fenólicos de ESC IV e V (Fig. 37)

revela os compostos majoritários galocatequina e ácido gálico. Os demais sinais não foram identificados. O conteúdo de compostos fenólicos presente em ESC IV e V foi três vezes menor em relação ao EBA, que apresentou o melhor desempenho nos experimentos *in vivo* para avaliação do período de epitelização. Conforme os resultados expostos nas Tabelas 9 e 12, a presença concomitante de compostos carotenóidicos e fenólicos em ESC IV e V não é satisfatória para acelerar o processo de cicatrização, uma vez que o período observado à conclusão deste processo foi estatisticamente maior em relação aos animais tratados com ESC II e III ($p < 0,001$).

O uso de produtos naturais no tratamento de lesões vem ganhando importância devido à redução no tempo de cicatrização e nas complicações concomitantes decorrentes de processos infecciosos (HART, 2002). As plantas possuem um potencial considerável como fonte de compostos ao tratamento de lesões e seu uso é observado na prática da medicina popular de muitos países (KORPENWAR, 2012; BALBACH, 1945). Os compostos bioativos interagem de maneira positiva na fisiologia do organismo, a fim de restaurar a condição estrutural e funcional do tecido lesionado (SINGH et al., 2006). Estes constituintes incluem diversos metabólitos secundários e óleos essenciais, por exemplo (EDEOGA et al., 2005).

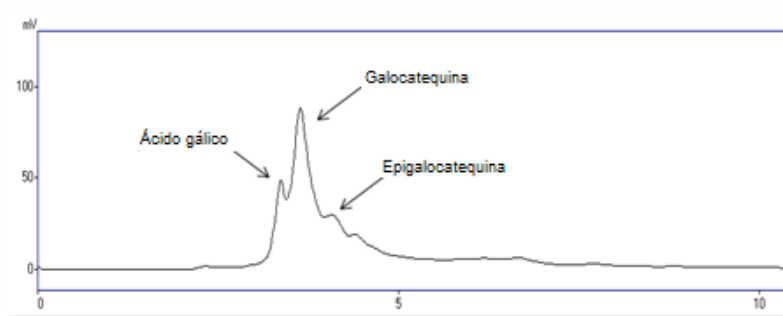


Figura 37. Perfil cromatográfico de compostos fenólicos (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm) presentes em ESC IV e ESC V da amostra de cascas de banana seca a 45 °C.

O potencial cicatrizante dos extratos de cascas de banana, principalmente ao atribuído ao EBA, constatado em apenas nove dias de tratamento, é ainda mais evidente quando comparado a estudos apresentados na literatura. Rashed, Afifi e Disi (2003) demonstraram o

efeito cicatrizante de extratos de *Portulaca oleracea* em modelo de lesão por excisão de 14 dias. Estudos fitoquímicos com essa planta revelaram que os flavonóides campferol, apigenina, miricetina, quercetina e luteolina são os componentes biologicamente ativos (XU; YU; CHEN, 2006). De acordo com o estudo de Mukherjee e colaboradores (2013), o período de epitelização necessário à cicatrização de lesões por excisão tecidual em ratos tratados com extratos, frações e compostos isolados de *Shorea robusta*, planta utilizada na medicina popular indiana aplicada em lesões e queimaduras, variou entre $16,01 \pm 0,33$ e $19,00 \pm 0,76$ dias.

Seguindo a estratégia experimental descrita anteriormente, os quatro extratos selecionados à segunda etapa deste estudo foram ESC II, ESC III, EU e EBA.

3.2. Porcentagem de redução da lesão

Na etapa II, os extratos selecionados ESC II, ESC III, EU e EAB, foram avaliados quanto ao potencial cicatrizante através da determinação da redução área da lesão (%). A progressão da cicatrização das lesões, por excisão de uma área tecidual correspondente a um cm², foi monitorada em intervalos de tempo estabelecidos a partir do período total de epitelização. O tempo de cicatrização dos animais do controle negativo estendeu-se por 15 dias. Portanto, esse foi o período de tempo máximo padronizado para efeitos de comparação do potencial cicatrizante de um extrato. A porcentagem de redução da lesão foi determinada ao longo do processo de cicatrização através de registros de imagens, coletadas em intervalos de três dias até total cicatrização da lesão.

Analisando a porcentagem de redução da área da lesão é possível afirmar que animais tratados com os extratos de cascas de bananas evidenciaram aceleração do processo de regeneração tecidual, comparativamente aos grupos controle positivo e negativo. Os animais tratados com os extratos derivados de extração convencional (Fig. 38 – C e D) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) da lesão desde o dia três até o dia nove de tratamento, em relação aos animais do controle positivo. Tal fato também foi observado no período entre o 3º e 12º dias de tratamento, em relação ao controle negativo.

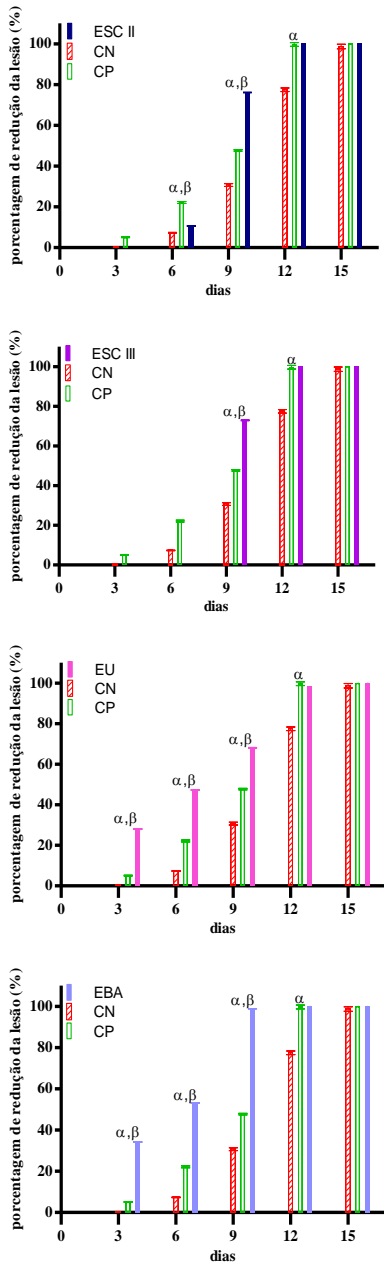


Figura 38. Porcentagem de redução da área de lesão tissular cutânea de camundongos tratados com extratos de casca de banana, ESC II, ESC III, EU e EAB, comparativamente aos grupos controles. As medidas da variável em estudo foram coletadas em intervalos regulares (3 dias), durante 15 dias, em modelo experimental de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média \pm erro padrão da média ($n=6$ /dia/grupo de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo. A diferença estatística foi simbolizada por α, β , onde α : em relação ao CN, β : em relação ao CP, considerando $p < 0,05$.

A regeneração tecidual ou cicatrização é um processo complexo e dinâmico de restabelecimento das camadas de tecido epitelial e estruturas celulares, em uma área lesionada, o mais próximo possível ao seu estado de normalidade, ou seja, anterior a lesão. A contração da lesão pode ser definida como o movimento das bordas do tecido adjacente em direção ao centro da área lesionada com o objetivo de restaurá-la (JAGETIA; RAJANIKANT, 2012). A contração é um mecanismo que ocorre imediatamente após a lesão, culminando em um conjunto de processos bioquímicos, entre os quais podemos citar a inflamação, a proliferação celular e a migração de fibroblastos para o leito da lesão. Na fase final do processo cicatricial, i.e., maturação, a lesão continua sofrendo contração, resultando em menor quantidade de tecido cicatricial aparente. O tecido de granulação formado na parte final da fase proliferativa é primariamente composto por fibroblastos, colágeno, edema e pequenos e novos vasos sanguíneos (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007).

Quando comparados os extratos entre si (Fig. 38 – A, B, C E D), aos três dias do processo de cicatrização foi observada diferença estatística ($p < 0,05$), exceto para os animais tratados com ESC II e ESC III. Os tratamentos com EBA e EU propiciaram as maiores reduções de área lesionada neste período, i.e., $34,16 \pm 0,14 \%$ e $27,99 \pm 0,18\%$, respectivamente.

Os três primeiros dias do processo cicatricial compreendem a primeira fase da cicatrização de uma lesão, caracterizada pela inflamação. Como primeira resposta à lesão, o fluxo de sangue ao leito lesionado aumenta, determinando o conseqüente incremento de neutrófilos, plaquetas e proteínas antibacterianas (GORLACH, 2005). As espécies reativas de oxigênio e o estado redox são importantes no controle da coagulação sanguínea e da infecção da lesão. Além disso, a lesão vascular endotelial desencadeia a excitose de uma série de grânulos que liberam mediadores pró-inflamatórios e pró-trombóticos para o sangue, via mecanismos de sinalização celular sensíveis a condição redox (LOWENSTEIN; TSUDA, 2006). Considerando que o tratamento com EBA proporcionou a maior porcentagem de redução da área lesionada aos três dias do processo cicatricial e os resultados previamente obtidos por Pereira (2010) em relação ao estresse oxidativo no tecido cicatricial, provavelmente, o reestabelecimento da homeostase redox no leito da lesão foi atingido devido à ação de compostos bioativos dos extratos de cascas de banana.



Figura 39. Fotografias da lesão observada aos 6 dias do período cicatricial. Tratamento: aplicação tópica de ESC II (à esquerda) e de ESC III (à direita). Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo.

Aos seis dias de cicatrização, o tratamento com EBA apresentou $53,08 \pm 0,10$ % de redução da área da lesão (Fig. 38). Este dado foi estatisticamente significativo em relação aos tratamentos EU ($47,33 \pm 0,14$ %), ESC II ($10,66 \pm 0,13$ %) e ESC III (0 %) (Fig. 38). O aspecto visual da lesão dos animais tratados com ESC II e ESC III chamou bastante atenção devido à deposição de células mortas sob o tecido granulomatoso, o que confere a lesão um aspecto rugoso e característico do processo de desidratação da área lesionada (Fig. 39). Possivelmente, este fato está relacionado à característica apolar dos extratos supercríticos, ou seja, a hidrofobicidade destes pode ter contribuído ao ressecamento tecidual observado. Adicionalmente, constatou-se que o granuloma estava fracamente aderido à lesão e com rupturas na sua estrutura, o que facilitou ainda mais o seu desprendimento da lesão. Tal fato contribuiu à fragilização e ao dano do tecido neoformado subjacente, determinando uma menor contração da lesão e, conseqüentemente, um retardo no processo de regeneração tecidual, principalmente nos primeiros dias após o procedimento cirúrgico.

Aos nove dias do período experimental, novamente detectou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre todos os grupos de tratamentos. O tratamento com EBA causou a maior redução de área de lesão, i.e., $98,72 \pm 0,01$ %, seguido dos tratamentos com ESC II ($76,11 \pm 0,10$ %), ESC III ($72,91 \pm 0,19$ %) e EU ($68,10 \pm 0,12$ %). Aos 11 dias

ocorreu a conclusão do processo cicatricial dos animais do grupo tratado com EU e aos 12 dias dos animais tratados com ESC II e ESC III (Fig. 38).

Os resultados ora obtidos, principalmente com o EBA, quando comparados a relatos na literatura, tornam evidente o potencial cicatrizante dos extratos de cascas de banana quanto ao efeito redutor de área lesionada durante o período de regeneração tecidual.

A fim de avaliar a atividade de cicatrizante de *Colutea cilicica*, Süntar e colaboradores (2009) aplicaram extratos aquosos de flores e frutos em modelo de excisão tecidual em camundongos até a completa cicatrização. O extrato dos frutos de *C. cilicica* reduziu em 78,1 % a área da lesão aos 12 dias de tratamento, enquanto que os animais do grupo controle positivo tratados com Madecassol apresentaram total cicatrização no mesmo período. Uma análise preliminar dos extratos aquosos dos frutos e das partes aéreas daquela espécie vegetal indicou elevado conteúdo de flavonóides e alguns taninos em sua composição. Segundo aqueles autores, os flavonóides são conhecidos por promover a cicatrização de lesões, principalmente devido à sua propriedade antimicrobiana, e parecem ser responsáveis pela contração da lesão e pela elevada taxa de epitelização (SÜNTAR et al. 2009).

Khalil, Afifi e Al-Hussaini (2007) avaliaram o potencial cicatrizante de extratos aquosos de *Inula viscosa*, *Ajuga chia*, *Rubia taenifolia* e *Parietaria diffusa* e do óleo essencial de *Laurus nobilis*. Os camundongos foram submetidos ao modelo de excisão dorsal e tratados com as preparações, em intervalos de 12 horas, quatro vezes, em dois dias sucessivos de tratamento. Durante 16 dias, as feridas foram visualmente observadas, documentadas fotograficamente e a área da lesão medida. A melhor atividade cicatrizante foi observada nos extratos de *I. viscosa*, seguido por *P. diffusa*, *L. nobilis* e *A. chia*, sendo que todos os extratos apresentaram compostos fenólicos/flavonóides em suas composições. O extrato menos ativo foi o de *R. taenifolia*, cuja análise fitoquímica não identificou tais compostos.

Svobodová, Walterová e Psotová (2006) investigaram o efeito protetor do extrato de *Silybum marianum*, contendo silimarina, silibina e dehidrosilibina, além de quercetina e taxifolina contra o dano induzido por peróxido de hidrogênio em queratinócitos e fibroblastos de camundongos. O pré-tratamento com os compostos testados diminuiu o dano oxidativo, sendo dehidrosilibina e quercetina os compostos protetores mais eficientes. De acordo com aqueles autores, a administração de antioxidantes é importante no reparo e na resolução de processos cicatriciais do tecido cutâneo. Portanto, os autores sugerem

que a silimarina, as flavonolignanas (silibina e dehidrosilibina) e os flavonóides (quercetina e taxifolina) podem ser agentes úteis no processo de regeneração tecidual, possivelmente como os compostos fenólicos e carotenoidicos presentes nas cascas de banana.

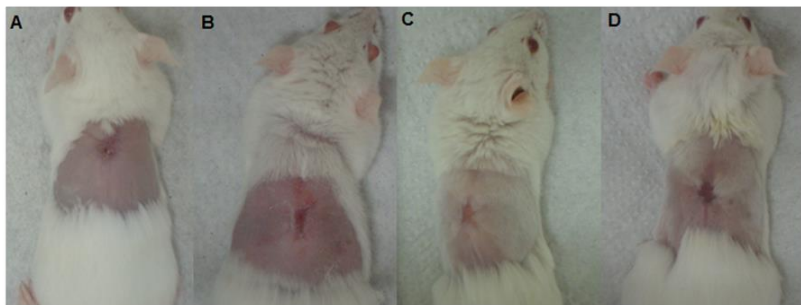


Figura 40. Imagens da lesão tissular cutânea de camundongos aos 15 dias do período cicatricial, consoante aos tratamentos tópicos de A. EAB; B. EU; C. ESC II e D. ESC III. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo.

Cabe ressaltar que aos 15 dias do período experimental, foi constatada macroscopicamente uma cicatriz grosseira como resultado do processo de regeneração tecidual do grupo de animais tratados com ESC II (Fig. 40 C) e ESC III (Fig. 40 D). Por sua vez, nos animais tratados com EBA (Figura 40 A) e EU (Fig. 40 B) uma cicatrização mais uniforme foi observada, finalizando com o crescimento de pêlos em toda a área lesionada. Na fase final do processo cicatricial (i.e., remodelação) mantem-se a contração do tecido lesionado, sendo característica a deposição de colágeno do tipo III (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001), o que confere o aspecto visual típico da deposição desordenada de colágeno, i.e. a cicatriz.

3.3. Conteúdo de hidroxiprolina

Concomitantemente aos ensaios de cicatrização acima referidos, procedeu-se à padronização do ensaio bioquímico à quantificação de hidroxiprolina nos tecidos em processo de regeneração. Este parâmetro foi avaliado no t_{zero} , sendo este o referencial basal dos animais, bem como ao longo do período de cicatrização, como uma ferramenta de

acompanhamento da resolução do processo de regeneração tecidual (Fig. 41).

A hidroxiprolina é um aminoácido essencial à síntese das fibras de colágeno, as quais são produzidas, principalmente, em processos cicatriciais. Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina é utilizado, normalmente, como um indicador do teor de colágeno (REDDY; ENWEMEKA, 1996). Uma concentração elevada de hidroxiprolina indica que o conteúdo de colágeno é abundante e que o reparo da lesão ocorreu de maneira mais rápida (NAYAK; UDUPA; UDUPA, 1999). O conteúdo de colágeno no tecido de granulação aumenta com a progressão da cicatrização e, portanto, é um parâmetro importante para avaliar o processo de cicatrização (CHITHRA et al., 1998). O colágeno tem um papel crucial no processo de cicatrização de lesões, por ser o principal componente dos tecidos conectivos e responsável pela formação de uma matriz que oferece suporte estrutural à regeneração tecidual. É produzido pelos fibroblastos e tem participação no leito da lesão no ganho de força de tensão durante o processo de reparo (MARTIN, 1997).

De acordo com a Figura 42, todos os tratamentos com extratos de casca de banana, comparativamente aos grupos controles positivo e negativo, estimularam a produção de colágeno, detectada via aumento da concentração de hidroxiprolina ao longo do período experimental. Destaca-se o tratamento utilizando EBA, em que o aumento da concentração daquele aminoácido foi estatisticamente significativo quando comparado aos grupos controles. A partir desses resultados, infere-se que houve um conseqüente aumento da proliferação celular e da síntese de colágeno em relação aos demais tratamentos, corroborando achados referentes ao período de epitelização das lesões (item 3.1) e a porcentagem de redução da lesão (item 3.2).

Aos seis dias do período experimental, a concentração de hidroxiprolina mostrou-se estatisticamente diminuída nas amostras de tecidos tratados com ESC II (Fig. 41 A) e ESC III (Fig. 41 B), em relação ao controle positivo. Possivelmente, o retardo no processo de regeneração tecidual ocorreu devido à desidratação da área lesionada causada pelos tratamentos com os extratos supercríticos (Fig. 43). Em seu conjunto, estas informações corroboram os demais resultados que caracterizam o potencial cicatrizante e dão suporte aos achados relacionados aos perfis químicos dos extratos de casca de banana e seus potenciais como agentes cicatrizantes (itens 3.1, 3.2 e 3.3), conforme descrito anteriormente.

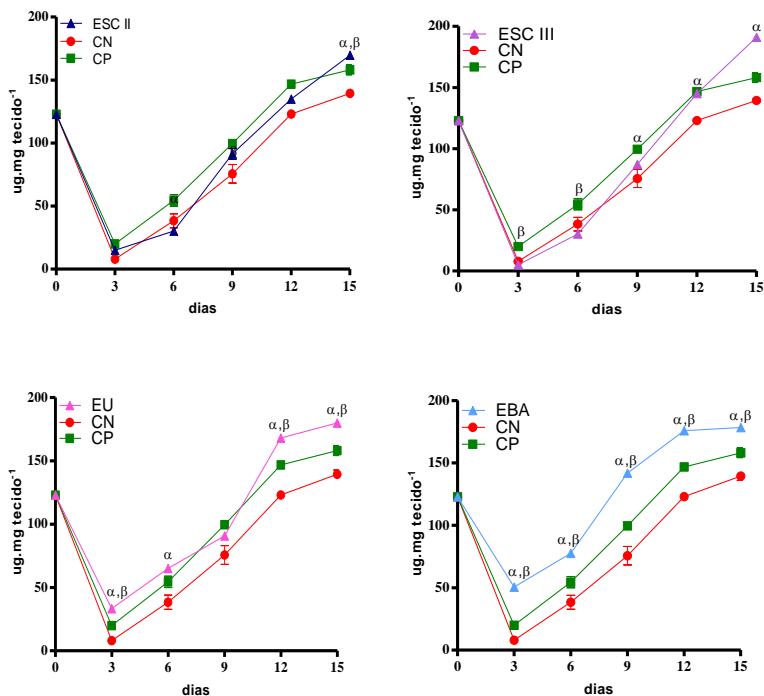


Figura 41. Conteúdo de hidroxiprolina ($\mu\text{g.mg}$ de tecido⁻¹) de amostras de tecidos cutâneos tratados com extratos de casca de banana ESC II, ESC III, EU e EBA, em relação aos grupos controles positivo e negativo. As amostras foram coletadas periodicamente, i.e, a cada 3 dias, durante 15 dias de tratamento, em modelo experimental de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada ponto representa a média \pm desvio padrão ($n=6/\text{dia}/\text{grupo}$ de tratamento: CN = controle negativo; CP = controle positivo). A diferença estatística foi simbolizada por α, β , onde α : em relação ao CN, β : em relação ao CP, considerando $p < 0,05$.

Estudos prévios (PEREIRA, 2010), utilizando extratos aquoso e hidroetanólico de cascas de banana em modelo de cicatrização *in vivo*, revelaram o aumento do teor de hidroxiprolina em processo cicatricial cutâneo como um reflexo do aumento da proliferação celular e, conseqüentemente, da síntese de colágeno, conforme já descrito por Nayak, Udupa e Udupa (1999).

A hidroxiprolina não é codificada pelo DNA. A prolina é uma aminoácido sintetizado a partir do ácido glutâmico, antes da sua incorporação no pró-colágeno durante a tradução do RNAm. Após a síntese de pró-colágeno, a prolina é modificada pós-traducionalmente via hidroxilação, resultando no constituinte majoritário da proteína colágeno e responsável por sua estabilidade. A elastina e o colágeno são as únicas proteínas de mamíferos que contém hidroxiprolina em sua constituição. Por essa razão, o conteúdo de hidroxiprolina tem sido utilizado com um indicador do conteúdo de colágeno, uma proteína que não apenas confere força e integridade à matriz tecidual, como também desempenha um papel importante na homeostase e na epitelização, ao final do processo de regeneração tissular (PATTANAYAK; SUNITA, 2008). O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conectivo em um processo de cicatrização e já foram descritas 19 isoformas daquela macromolécula. O colágeno tipo I, sintetizado pelos fibroblastos, é predominante em ossos e tendões, enquanto o colágeno tipo III é mais comumente encontrado em tecidos moles, como nos vasos sanguíneos e na derme. A derme contém aproximadamente 80% de colágeno tipo I e 20 % de colágeno tipo III. Durante a regeneração tecidual, o tecido de granulação apresenta entre 30 a 40 % de colágeno do tipo III, sendo considerado colágeno imaturo (ROBSON; STEED; FRANZ, 2001). Por isso, fica implícita a importância da síntese aumentada de hidroxiprolina no processo cicatricial, a qual está intimamente relacionada à diminuição do período de epitelização e ao aumento da porcentagem de redução da lesão.

Ao final do processo de regeneração tecidual, detectou-se um aumento significativo na concentração de hidroxiprolina em relação aos níveis basais deste marcador bioquímico para todos os tratamentos, sugerindo um aumento relevante na reposição de colágeno durante a fase proliferativa da cicatrização.

Em síntese, observou-se que o EBA apresentou potencial cicatrizante estatisticamente relevante em relação aos demais tratamentos, sendo por isto selecionado na etapa II da estratégia experimental adotada. A principal diferença estatística deste tratamento foi observada aos três dias do período experimental, tanto para o grupo de animais tratados com EBA ($p < 0,001$), quanto para o grupo tratado com EU ($p < 0,001$), em relação aos grupos ESC II e ESC III. Porém, a maior concentração de hidroxiprolina foi detectada no tratamento com EBA ($p < 0,001$). Aos nove dias do período experimental, o tratamento das lesões com EBA apresentaram total regeneração tecidual (Tab. 9; Figs. 38 D e 40 A). Estes resultados, associados aos elevados conteúdos

de hidroxiprolina e a maior produção de colágeno culminaram na repavimentação da área lesionada em um menor intervalo de tempo nas amostras tratadas com EBA (Fig. 41 - EBA: $141,86 \pm 3,10$; ESC II: $91,49 \pm 4,22$; EM: $90,80 \pm 1,87$; ESC III: $87,21 \pm 2,40$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ tecido epitelial, considerando $p < 0,001$).

Assim, na etapa III da estratégia experimental em curso realizou-se a padronização da composição do EBA, seguido dos estudos da metabolômica do processo cicatricial afim, em modelo animal de excisão tecidual (Capítulo 3).

3.4. Padronização do extrato bruto aquoso

A composição do extrato bruto aquoso (EBA – amostra de março/2011) de casca de banana (*Musa* sp., cultivar Prata Anã), previamente processada via secagem em estufa à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, está resumidamente descrita na Tabela 13.

Tabela 13. Composição química padronizada do extrato bruto aquoso de casca de banana seca à $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EBA – amostra de março/2011).

Substância	Concentração
L-dopa	$21,99 \pm 1,37$ a $133,48 \pm 3,93$ mg/g matéria seca
Dopamina	$10,77 \pm 0,85$ a $77,42 \pm 4,67$ mg/g matéria seca
Ácido gálico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm)	$37,50 \pm 0,71$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de matéria seca
Galocatequina (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm)	$89,68 \pm 0,52$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de matéria seca
Epigalocatequina (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm)	$35,02 \pm 2,03$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de matéria seca
Ácido clorogênico (FR-CLAE-UV-Vis, 280 nm)	$4,67 \pm 0,32$ $\mu\text{g}/\text{g}$ de matéria seca
Compostos carotenóidicos	Não detectados
Taninos	$1,013 \pm 0,068$ mg/ g matéria seca

Nota: A amostra de casca de banana seca a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ referente ao mês Março de 2011 foi utilizada na obtenção do EBA utilizado no tratamento *in vivo*. Aminoácidos (fenilalanina, glicina, tirosina e triptofano), carboidratos (sucrose, melibiose, frutose, glucose, galactose e celobiose) e epicatequina foram identificados por Ressonância Magnética Nuclear ($^1\text{H-RMN}$).

O interesse em padronizar a composição química do EBA relaciona-se à atividade cicatrizante descrita neste capítulo. Acredita-se

que o potencial do EBA em promover a regeneração tecidual da lesão por excisão tecidual em camundongos resulta da presença de moléculas polares, principalmente os compostos fenólicos. A identificação dos aminoácidos descritos na *Nota* da Tabela 13, bem como a presença de L-dopa caracterizam a via de síntese da dopamina presente na matriz vegetal das cascas de banana. Além disso, a identificação dos açúcares e de taninos esclarece a característica da superfície da lesão com a aplicação tópica do EBA nas lesões dos animais, possivelmente devido a presença destas substâncias. Dessa maneira, o extrato funcionou como uma matriz que cobriu a superfície da lesão, protegendo o tecido novo em formação do contato direto com o ambiente externo.

3.4.1. Antibiograma

Os antibiogramas demonstraram que nas concentrações de 30 µg/mL e 60 µg/mL, valores semelhantes aos utilizados em laboratório de análises clínicas à seleção de antibióticos conhecidos quanto a sua aplicação e eficácia, o EBA de casca de banana não apresentou atividade inibitória do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Assim, conclui-se que o mecanismo de ação cicatrizante do EBA não está associado à atividade antimicrobiana, conforme observado para diversos produtos cicatrizantes disponíveis no mercado.

O mecanismo de ação cicatrizante do EBA de casca de banana orgânica pode estar relacionado ao seu efeito antioxidante. Resultados prévios (Pereira, 2010) de determinação de marcadores bioquímicos de estresse oxidativo (enzimáticos e não enzimáticos) comprovaram o potencial antioxidante do EBA de cascas de banana, porém de cultivos convencionais aonde o uso de agrotóxicos é permitido. Os resultados atuais, i.e. oriundos de amostras de cultivo orgânico, se aplicam neste contexto, pois nos ensaios *in vivo* para avaliação do potencial cicatrizante não foram observados sinais de citotoxicidade para os extratos supercríticos, outrora observados por Pereira (2010).

4. Conclusão

No primeiro momento da estratégia experimental, os quatro extratos selecionados à segunda etapa deste estudo, e.g., ESC II, ESC III, EU e EBA, apresentaram período de epitelização correspondente a 12, 12, 11 e nove dias, respectivamente. Estes resultados demonstraram

o maior efeito redutor da área lesionada do EBA, corroborando os achados do período de epitelização e do conteúdo de hidroxiprolina. Em função disto, procedeu-se à padronização do EBA, sendo que sua composição química resumiu-se a compostos fenólicos (ácido gálico, taninos e flavonoides, i.e., catequinas), catecolaminas, aminoácidos e carboidratos.

Através do modelo animal de excisão tecidual, e com base nas variáveis analisadas à determinação do potencial cicatrizante dos extrato de interesse, é possível afirmar que um maior conteúdo de compostos fenólicos, em alguma extensão, acelera o processo cicatricial. Além disto, a ausência de atividade antibacteriana do EBA pode ser considerada mais uma evidência de que a ação desta matriz complexa ocorre via modulação do ambiente redox no leito da lesão, conforme sugerido por Pereira (2010).

Os extratos de cascas de banana, notadamente o EBA, demonstraram potente atividade cicatrizante, sugerindo que a abordagem etnofarmacológica à seleção de espécies ao desenvolvimento de fitofármacos é bastante útil, podendo inclusive agregar valor a um resíduo da indústria de alimentos conforme descrito.

5. Referências bibliográficas

BALBACH, A. **As frutas na medicina doméstica**. 21. ed. São Paulo: Editora M. V. P., 1945, 374 p.

BERNA, A.; CHÁFER, A.; MONTÓN, J.B.; SUBIRATS, S. High-pressure solubility data of system ethanol (1) +catechin (2) +CO₂ (3). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 20,p. 157–162, 2001.

BEST, R.; LEWIS, D.A.; NASSER, N. The antiulcerogenic activity of the unripe plantain banana. **British Journal of Pharmacology**, v. 82, p. 107-116, 1984.

BREUSS, J.M.; GALLO, J.; DELISSER, H.M.; KLIMANSKAYA, I.V.; FOLKESSON, H.G.; PITTET, J.F.; NISHIMURA, S.L.; ALDAPE, K.; LANDERS, D.V.; CARPENTER, W. Expression of the beta 6 integrin subunit in development, neoplasia and tissue repair suggests a role in epithelial remodeling. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2241–2251 1995.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J.B.; YUNES, R.A. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. 1. ed. Chapecó-SC: Argus, 2001. 523 p.

CARVALHO, R.P. **Microondas** – Temas Atuais de Física. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2005. 107 p.

CAVANI, A.; ZAMBRUNO, G.; MARCONI, A.; MANCA, V.; MARCHETTI, M.; GIANNETTI, A. Distinctive Integrin Expression in the Newly Forming Epidermis During Wound Healing in Humans. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, p. 600-604, 1993.

CHITHRA, P.; SAJITHLAL, G.; CHANDRAKASAN, G. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 181, p. 71-76, 1998.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 11-23, 2007.

CLARK. R.A.F. Biology of dermal wound repair dermatological clinics. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 11, p. 647-661, 1993.

DANIELSKI, L.; MICHELIN, E.M.Z.; FERREIRA, S.R.S. Horsetail (*Equisetum giganteum* L.) oleoresin and supercritical CO₂: experimental solubility and empirical data correlation. **Journal of Food Engineering**, v. 78,p. 1054-1059, 2007.

DEL VALLE, J.M.; AGUILLERA, J.M. Review: high pressure CO₂ extraction: fundamentals and applications in the food industry. **Food Science and Technology International**, v. 5, p. 1-24, 1999.

DRAELOS, Z.D. Botanicals as topical agents. **Clinics in Dermatology Y**, v. 19, p. 474-477, 2001.

EDEOGA, H.O.; OKWU, D.E.; MBAEBIE, B.O. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 685- 688, 2005.

ELLIOT, R.C.; HEWARD, G.J.F. The effect of banana-supplemented diet on gastric ulcer in mice. **Pharmacological Research Communications**, v. 8, p. 167-171, 1976.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFRGS/ Editora da UFSC, 2001. 257p.

FERREIRA, S.R.S.; NIKOLOV, Z.L.; DORAISWAMY, L.K.; MEIRELES, M.A.A.; PETENATE, A.J. Supercritical fluid extraction of black pepper (*Piper nigrum L.*) essential oil. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, p. 235-245, 1999.

FFRENCH-CONSTANT, C.; WATER, L.; DVORAK, H.F.; HYNES, R.O. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. **Journal of Cellular Biology**, v. 109, p. 903-914, 1989.

FRANK, S.; KÄMPFER, H. Excisional wound healing: an experimental approach. In: DIPIETRO, A., BURNS, A.L. **Wound Healing: Methods and Protocols**. Humana Press, 2003.

GORLACH, A. Redox regulation of the coagulation cascade, **Antioxidant Redox Signalization**, v. 7, p. 1398-1404, 2005.

HART, J. Inflammation. 1: Its role in the healing of acute wounds. **Journal of Wound Care**, v. 11, p. 205-209, 2002.

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBANEZ, E. Sub and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food-by-products, algae and microalgae: a review. **Food Chemistry**, v. 98, p. 136-148, 2006.

IGNAT'EVA, N.; DANILOV, N.; AVERKIEV, S.; OBREZKOVA, M.; LUNIN, V.; SOBOL, E. Determination of hydroxyproline in tissues and the evaluation of the collagen content of the tissues. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 62, p. 51-57, 2007.

JAGETIA, G.C.; RAJANIKANT, G.K. Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of

fractionated γ radiation. **International Wound Journal**, v. 9, p. 76-92, 2012.

JOANNE, M.M. **Cosmetic ingredient handbook**. 1. ed. Washinhton, 1988. 522 p.

KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; SEFIDKON, F.; BAHRAMIFAR, N. Comparision of essencial oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydro-distillation methods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 587-591, 2004.

KHALIL, E.A.; AFIFI, F.U.; AL-HUSSAINI, M. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 104-112, 2007.

KORPENWAR, A.N. Ethnomedicinal plants used by the tribal's in cure of wounds in Buldhana district (MS) India. **International Journal of Recent Trends in Science and Technology**, v. 3, p. 49-53, 2012.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-222, 2005.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-198, 2003.

LI, S.; HARTLAND, S. Influence of co-solvent on solubility and selectivity in extraction of xantines and cocoa butter from cocoa beans with supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 5, p. 7-12, 1992.

LINNANE, A.W.; KIOS, M.; VITETTA, L. The essential requirement for superoxide radical and nitric oxide formation for normal physiological function and healthy aging. **Mitochondrion**, v. 7, p. 1-5, 2007.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 43-56, 2005.

LOWENSTEIN, C.J.; TSUDA, H. N-ethylmaleimide-sensitive factor: a redox sensor in exocytosis. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 1377–1383, 2006.

MARTIN, P. Wound healing—aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, p. 75–81, 1997.

MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly **TRENDS in Cell Biology**, v. 15, p. 599-607, 2005.

MARTINDALE: JAMES, E.F.; REYNOLDS, E. (Ed), **Martindale: The Extra Pharmacopoeia**. 33. ed. London: Pharmaceutical Press. Electronic version In: Micromedex® Healthcare Series, Greenwood Village, Colorado (Edition expires [date]), 2009. MERCK SHARP & DOHME. Disponível em: <<http://www.msdonline.com.br>>. Acesso em 16 fev. 2013.

MAYADAS, T.N.; JOHNSON, R.C.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O.; WAGNER, D.D. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. **Cell**, v. 74, p. 541-554, 1993.

MEZZOMO, N. **Óleo de Amêndoa de Pêssego: Avaliação da Técnica de Extração, da Qualidade dos Extratos e de Parâmetros para Ampliação de Escala**. 151 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MUKHERJEE, H.; OJHA, D.; BHARITKAR, Y.P.; GHOSH, S.; MONDAL, S.; KAITY, S.; DUTTA, S.; SAMANTA, A.; CHATTERJEE, T.K.; CHAKRABARTI, S.; MONDAL, N.B.; CHATTOPADHYAY, D. Evaluation of the wound healing activity of *Shorea robusta*, an Indian ethnomedicine, and its isolated constituent(s) in topical formulation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 335–343, 2013.

NAM, S.H.; CHOI, S.P.; KANG, M.Y.; KOZUKUE, N.; FRIEDMAN, M. Antioxidative, antimutagenic and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 816-822, 2005.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 351-356, 2007.

NAYAK, B.S.; UDUPA, A.L.; UDUPA, S.L. Effect of *Ixora coccinea* flower on dead space wound healing in rats. **Fitoterapia**, v. 70, p. 233-236, 1999.

OLPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. Sarvier: São Paulo, 2010. 169 p.

PASQUEL, A.; MEIRELES, M.A.A.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J. Extraction of stevia glycosides with CO₂ water, CO₂ ethanol, and CO₂ water ethanol. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 271-282, 2000..

PATTANAYAK, S.P.; SUNITA, P. Wound healing, anti-microbial and antioxidant potential of *Dendrophthoe falcate* (L.f) Ettingsh. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 241-247, 2008.

PEREIRA, A. **Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp*)**. 2010. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PEREIRA, J.R.C. Tratamento de cicatrizes patológicas com a associação de cepalin, heparina e alantoína. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, p. 603-608, 2003.

POKORNY, J.; KORCZAK, J. Preparation of Natural antioxidants. In: POKORNY, J., ANISHLIEVA, N., GORDON, M. **Antioxidants in food: practical applications**. New York: CRC Press, 2001. 430 p.

QUISPE-CONDORI, S.; SÁNCHEZ, D.; FOGLIO, M.A.; ROSA, P.T.V.; ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELES, M.A.A. Global yield

isotherms and kinetic of artemisinin extraction from *Artemisia annua* L. leaves using supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 36, p. 40–48, 2005.

RASHED, A.N.; AFIFI, F.U.; DISI, A.M. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 131-136, 2003.

RAVENTÓS, M.; DUARTE, S.; ALARCÓN, R. Application and possibilities of supercritical CO₂ extraction in food processing industry: an overview. **Food Science and Technology International**, v. 8, p. 269-284, 2002.

REDDY, G.K.; ENWEMEKA, C.S. A simplified method for analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, v. 29, p. 225-229, 1996.

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

ROBSON, M.C.; STEED, D.L.; FRANZ, M.G. Wound healing. **Current Problems in Surgery**, v. 38, p. 73-94, 2001..

ROSSO, S.R. **Aproveitamento do resíduo da agroindústria da banana**: caracterização química e levantamento de parâmetros termodinâmicos. 2009. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SACCARO JUNIOR, N.L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios**: disputas dentro e fora do Brasil. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SHAIJI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. 319 p.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; NATH, V.; RAWAT, A.K.; MEHROTRA, S. Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity

of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 67–72, 2006.

SEN, C.K.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB Journal**, v. 10, p. 709–720, 1996.

SHESTOPALOV, A.V.; SHKURAT, T.P.; MIKASHINOVICH, Z.I.; KRYZHANOVSKAYA, I.O.; BOGACHEVA, M.A.; LOMTEVA, S.V.; PROKOF'EV, V.N.; GUS'KOV, E.P. Biological functions of allantoin. **Biology Bulletin**, v. 33, p. 437–440, 2006.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v. 76, p. 301-314, 1994.

SU, L.; YIN, J.J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, v. 100, p. 990-997, 2007.

SÜNTAR, I.P.; KOCA, U.; ESRA, K.A.; YILMAZER, D.; ALPER, M. Assessment of wound healing activity of the aqueous extracts of *Colutea cilicica* Boiss. & Bal. **Fruits and Leaves**, p. 1-7, 2009.

SVOBODOVÁ, A.; WALTEROVÁ, D.; PSOTOVÁ, J. Influence of silymarin and its flavonolignans on H₂O₂-induced oxidative stress in human keratinocytes and mouse fibroblasts. **Burns**, v. 32, p. 973–979, 2006.

VALDÉS, H.L.; LEYES, E.R.; REGO, H.P.L.; SANABIA, M.L.G. Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo. **Revista Cubana Plantas Medicinales**, v. 5, p. 17-22, 2000.

WOLFENDER, J.L.; NDJOKO, K.; HOSTETTSMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 437–455, 2003.

WU, X.; GUA, L.; HOLDENB, J.; HAYTOWITZB, D.B.; GEBHARDTB, S.E.; BEECHERB, G.; PRIORA, R.L. Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 407-422, 2004.

XU, X.; YU, L.; CHEN, G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 493–499, 2006.

ZANCAN, K.C.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES, M.A.A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.

ZETZL, C.; BRUNNER, G.; MEIRELESS, M.A.A. Standardized low-cost batch SFE Units for University education and comparative research. In: Proceedings of the 6th International Symposium on **Supercritical Fluids**, v. 1, p. 577–581, 2003.

ZHOU, R.; LI, S.; ZHANG, D. Combination of supercritical fluid extraction with ultrasonic extraction for obtaining sex hormones and IGF-1 from antler velvet. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 17, p. 373-380, 2009.

Capítulo 3: Hidrogel

1. Introdução

A evolução das intervenções no processo cicatricial de um organismo vivo passou por diversas linhas de pensamento até atingir os atuais procedimentos, os quais ainda apresentam inúmeras limitações práticas em relação ao ideal conceitual. O que se almeja são intervenções indolores, com capacidade de reconstrução tissular acelerada, restabelecendo características geométricas, estéticas e de funções físicas, químicas e biológicas. Entre as possibilidades de intervenções temos os curativos dérmicos no formato de hidrogéis, os quais são redes poliméricas tridimensionais, capazes de formar filmes, absorver água e serem inertes ao organismo (PEPPAS; MIKOS, 1986; HOARE; KOHANE, 2008). Numa expansão contínua da biblioteca de polímeros naturais e sintéticos disponíveis para aplicações biomédicas, hidrogéis de poli(acetato de vinila)-co-poli(álcool vinílico - PVA) têm emergido como promissores materiais biodegradáveis devido as suas propriedades físicas e químicas altamente controláveis (PEPPAS; MONGIA, 1997; MANSUR; ORÉFICE; MANSUR., 2004; WANG et al., 2004; COSTA JR. et al, 2007a,b; MANSUR et al, 2008; SINGH; PAL, 2012).

Os hidrogéis vêm sendo utilizados para mimetizar tecidos, atuando como matriz extracelular sintética ao organizar células numa arquitetura tridimensional e servir de estímulo que direcione o crescimento e a formação do tecido desejado (YANG et al., 2001; EKICI et al., 2011; TAMURA et al., 2011). Desde o trabalho pioneiro de Wichterle e Lim (1960), com a utilização de um polímero a base de hidroxietil metacrilato para a produção de um hidrogel, e também devido à característica hidrofílica e à biocompatibilidade dos hidrogéis em geral, tem sido considerada relevante a pesquisa no âmbito destes biomateriais.

Os hidrogéis são estruturas poliméricas, cuja configuração tridimensional abrange uma gama de composições químicas e propriedades físicas. Os hidrogéis químicos podem ser estáveis ou não, degradando-se ou dissolvendo-se. Os hidrogéis físicos são denominados reversíveis quando a rede polimérica se mantém coesa por entrelaçamentos moleculares ou por forças secundárias, incluindo ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (PEPPAS; MIKOS, 1986). Esses materiais poliméricos apresentam a capacidade de absorver água e entumecer rapidamente, porém sem se

dissolver, mantendo sua estabilidade química e mecânica (KÁLAL, 1983; JEN; WAKE; MIKOS, 1996; THOMSON et al., 1995).

Os hidrogéis podem ser formulados em diversas formas físicas, a saber: formas semissólidas maleáveis (lentes de contato gelatinosas), filmes (curativos epidérmicos), matrizes em pó compactas (comprimidos de uso oral), micropartículas e nanopartículas (veículos para tratamentos tópicos), revestimentos (usado em implantes ou cateter, em comprimidos ou cápsulas), membranas (*patch* de liberação transdérmica), sólidos encapsulados (bombas osmóticas) e líquidos (formadores de gel) (SIEPMANN; PEPPAS, 2001). Como resultado, os hidrogéis são comumente utilizados na prática clínica e na medicina experimental em uma grande variedade de aplicações, e.g., engenharia de tecidos, medicina regenerativa (LEE; MOONEY, 2001), imobilização de células (JEN; WAKE; MIKOS, 1996), separação de biomoléculas ou células (WANG; BURBAN; CUSSLER, 1993), selante efetivo para homeostase, barreira à adesão tecidual no período pós-cirúrgico (BENNETT et al., 2003), biossensores e suportes e/ou nanopartículas à liberação controlada de medicamentos (LEE et al., 2007).

O hidrogel também pode ser utilizado para mimetizar as funções da matriz extracelular presente nos tecidos. Matrizes extracelulares integram diversos aminoácidos e macromoléculas, fazendo com que as células fiquem unidas, mantendo o controle da estrutura tecidual, a fim de regular a função celular e permitir a difusão de nutrientes, metabólitos e fatores de crescimento (LEE; MOONEY, 2001). As estruturas dos hidrogéis possuem propriedades físicas semelhantes a de tecidos vivos, característica esta atribuída à elevada quantidade de água presente na sua estrutura, além de sua consistência macia e elástica, e sua baixa tensão interfacial frente à água e fluidos biológicos (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

Dentre as aplicações de um hidrogel, este ainda pode ser utilizado como curativo em lesões de pele. Para isso, deve apresentar características importantes, como flexibilidade, durabilidade, possibilidade de incorporação de compostos bioativos e permeabilidade. A permeabilidade satisfatória nada mais é que a manutenção do leito da lesão em condições apropriadas à proliferação celular, preconizando principalmente as trocas gasosas, a absorção do exsudato, o controle da perda de água e a baixa carga bacteriana (YUDANOVA; RESHETOV, 2006; OVINGTON, 2007; LIU; HUANG, 2010; DIAS et al., 2011).

Um hidrogel deve ser atóxico, relativamente inerte e não interferir com a função celular. A hidrofobicidade dos hidrogéis está diretamente relacionada a sua biocompatibilidade, assim como a

similaridade fisicoquímica entre o hidrogel e a matrix extracelular nativa em termos de composição (HOARE; KOHANE, 2008). Em cultura, a viabilidade celular e a expressão fenotípica das células irão confirmar a biocompatibilidade do hidrogel. Para a aplicação *in vivo*, o tecido do hospedeiro deve aceitar o hidrogel, de forma que o processo inflamatório, se houver, seja brando (JEN; WAKE; MIKOS, 1996).

Os hidrogéis podem ser derivados de polímeros naturais e/ou sintéticos. O PVA (Fig. 42) é um exemplo de polímero sintético, cuja preparação envolve um método físico que compreende ciclos de congelamento e descongelamento de soluções aquosas deste polímero. O PVA possui capacidade de formar filme, através de ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio entre grupamentos OH de suas cadeias (Fig. 43). A capacidade do hidrogel em absorver água é uma característica atribuída à presença de grupos hidrofílicos (OH, CONH, CONH₂, SO₃H) em suas estruturas, a exemplo do PVA (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008). Além disso, os hidrogéis de PVA apresentam propriedade adesiva e elevada biocompatibilidade (LOZINSKY et al., 1999).

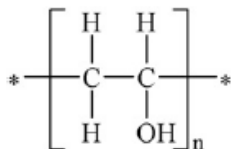


Figura 42. Estrutura química do álcool polivinílico (LOZINSKY et al., 1999).

Assim, considerando as propriedades químicas e fisicoquímicas do PVA, o presente trabalho foi baseado no estudo daquele polímero, o qual forma hidrogéis físicos. O PVA é um copolímero produzido pela polimerização do acetato de vinila, seguida de reação de hidrólise do poli(acetato de vinila) em poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila). O peso molecular é uma característica importante à determinação das propriedades de um polímero incluindo cristalinidade, aderência, força mecânica e difusividade. A relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final após a reação de hidrólise e o número total inicial de grupos acetila representa o grau de hidrólise (GH) do PVA, um parâmetro importante na caracterização das propriedades deste polímero. Um aumento do GH implica em redução da solubilidade na água, associada à estabilização energética promovida pelas ligações de pontes de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas, no aumento da

adesão em superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração (MANSUR, 2007 a,b).

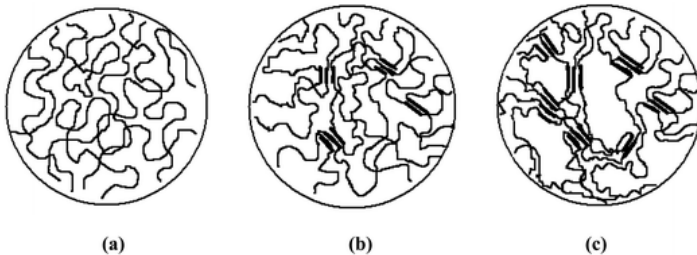


Figura 43. Hidrogel do polímero álcool polivinílico (PVA): a) solução de PVA; b) hidrogel de PVA após o primeiro ciclo de congelamento/descongelamento; c) hidrogel de PVA após n ciclos de congelamento/descongelamento. Os pontos em destaque, denominadas zonas microcristalinas, compreendem as ligações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio (LOZINSKY et al., 1999).

De acordo com a Figura 44, podemos observar que nos hidrogéis de PVA a região cristalina é caracterizada pela formação de ligações de pontes de hidrogênio, resultando na gelificação da solução com a aproximação das hidroxilas da estrutura deste polímero.

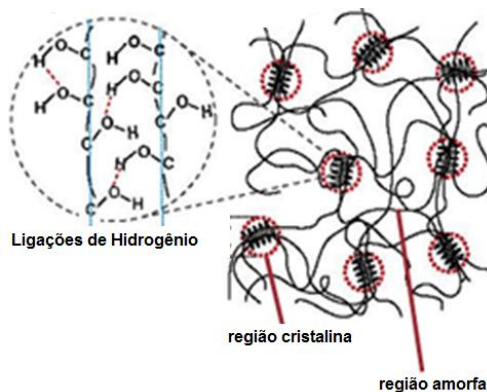


Figura 44. Rede polimérica de PVA na forma de hidrogel. Destaque para os pontos de cristalização caracterizados por ligações de pontes de hidrogênio entre as unidades poliméricas.

Os criogéis resultam da criogelatinização, ou de um tipo específico de crioestruturação, que ocorre devido ao tratamento criogênico de uma solução potencialmente capaz de formar um gel. Criogéis poliméricos são resultantes do processo de congelamento e estocagem na forma congelada, seguida do descongelamento da solução inicial sob condições adequadas à formação da estrutura e transição para gel. O alinhamento forçado das cadeias poliméricas e sua concentração aumentam através da conversão da água do estado líquido para o estado sólido, o que possivelmente promove um mecanismo de associação lado a lado das unidades poliméricas, a qual se mantém intacta durante o descongelamento, gerando uma estrutura gelificada – região cristalina (ZHANG; ZHANG; WU, 2013).

Curativos capazes de liberar composto(s) bioativo(s) a nível cutâneo e/ou subcutâneo são de interesse da indústria farmacêutica, considerando as abordagens preventiva e terapêutica no tratamento de várias desordens da pele. A administração de agentes terapêuticos por via tópica oferece muitas vantagens em relação ao sistema convencional de administração por via oral e a outros métodos mais invasivos, evitando a dor e proporcionando a administração do composto bioativo localmente (WAGNER et al., 2001). Neste contexto, fundamenta-se o uso da casca de banana como biomassa fonte de metabólitos secundários com ação cicatrizante à formulação de hidrogéis a base de PVA na forma de filme, i.e. um curativo transdérmico.

Os compostos antioxidantes naturais têm sido isolados de diversas espécies vegetais. Inúmeros pesquisadores enfatizam a obtenção de compostos bioativos presentes na casca de banana, entre eles flavonóides, ácidos graxos, fitoesteróis e carotenóides. O extrato de casca de banana associado ao hidrogel é de grande relevância para aplicação clínica no processo cicatricial como um fitofármaco baseado em um sistema de liberação controlada de compostos antioxidantes bioativos, i.e. catequinas.

Catequinas (Fig. 45) são compostos fenólicos aos quais são atribuídas atividades anti-inflamatória, antioxidante e propriedade *scavenger* de radicais livres *in vitro* (YEN; CHEN, 1998; CHAN et al., 1999). A epigallocatequina galato, por exemplo, uma das principais isoformas de catequinas, tem demonstrado inibir a infiltração de leucócitos e a atividade da mieloperoxidase, causando redução no eritema induzido por UV-B. As catequinas também são capazes de diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF- α e aumentar a produção de citocina anti-inflamatória IL-10 (YANG et al., 1998; CROUVEZIER et al., 2000). Estudos *in vitro* sugerem efeitos

antiinflamatórios daqueles metabólitos, entretanto o efeito nos processos inflamatório e de cicatrização em modelos *in vivo* não estão bem estabelecidos (KAPOOR et al., 2004).

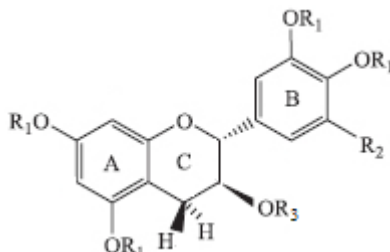


Figura 45. Estrutura química das catequinas: epicatequina R1 = R2 = H; galocatequina R1 = H; R2 = OH; R3 = H.

O extrato bruto aquoso de cascas de banana (*Musa* sp., cv. Prata Anã) (EBA) apresenta potencial cicatrizante de acordo com o seu perfil químico. Portanto, a associação do hidrogel de PVA ao EBA de cascas de banana pode resultar em um importante fitomedicamento à aplicação em processo cicatricial. Assim, ressalta-se o caráter inovador desse trabalho que objetiva:

- 1) desenvolver um curativo, derivado de polímero sintético contendo substâncias naturais cicatrizantes, i.e. EBA;
- 2) avaliar o comportamento de intumescimento e degradação *in vitro*, as propriedades mecânicas, a citotoxicidade e a viabilidade celular *in vitro* de formulações de hidrogel de PVA contendo EBA;
- 3) avaliar o potencial cicatrizante *in vivo* de curativo de PVA contendo EBA.

2. Material e métodos

2.1. Preparo dos hidrogéis

O PVA utilizado neste estudo é descrito como Mowiol® 20-98. De acordo com esta nomenclatura, o primeiro número indica a viscosidade de uma solução de PVA 4 %, a temperatura de 20 °C, como uma medida relativa da massa molar do polímero. E o segundo número indica o grau de hidrólise (GH) do poli(acetato de vinila). Portanto, o PVA Mowiol® 20-98, apresenta viscosidade de 18.5 – 21.5 mPa.s e GH de 98.0 – 98.8% (totalmente hidrolisado) (KURARAY, 2010). Para o

preparo dos hidrogéis nas concentrações correspondentes a 5%, 10%, 15% e 20% (m/v), foram pesadas alíquotas de álcool polivinílico (PVA Mowiol 20-98) e adicionadas de água Milli-Q, utilizando balão volumétrico. As soluções foram aquecidas à 80 °C, durante 5 horas. Alíquotas (13 mL) das soluções do hidrogel foram transferidas para moldes de silicone (12 cm x 8 cm x 0,4 cm) e levadas ao freezer (-20 °C), durante 15 horas. Após este período, as placas foram coletadas e mantidas em temperatura ambiente até total descongelamento (~3h). A incorporação do EBA, na forma liofilizada, foi realizada antes do hidrogel ser transferido aos moldes de silicone. O EBA foi preparado conforme descrito no item 2.2 do capítulo 1.

Alternativamente, hidrogéis de PVA 10% foram preparados por congelamento rápido, em ultrafreezer à -80 °C, durante 15 horas. Posteriormente, as placas foram retiradas do freezer e mantidas em temperatura ambiente por 3h, até o total descongelamento. O EBA (item 2.2 do capítulo 1), na forma liofilizada, foi incorporado antes do hidrogel ser transferido aos moldes de silicone.

Os hidrogéis de PVA 10% preparados por congelamento lento seguido de liofilização foram levados ao freezer a temperatura de -20 °C, durante 15 horas. Após este período de congelamento, as placas foram retiradas do freezer e deixadas a temperatura ambiente até total descongelamento, durante um período de 3h. Em seguida, foram congeladas novamente e liofilizadas por um período de 24 h. A incorporação de EBA (item 2.2 do capítulo 1), na forma liofilizada, foi realizada antes do hidrogel ser colocado nos moldes.

Resumidamente, os hidrogéis de PVA 10 % foram definidos de acordo com as condições de congelamento, a saber: congelamento lento (CL; T=-20 °C), congelamento rápido (CR; T=-80 °C), e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T=-20 °C).

2.2. Características organolépticas

As características organolépticas avaliadas dos hidrogéis de PVA-EBA foram a homogeneidade, cor, odor, brilho e a ausência de grumos. Estes testes consideraram a inspeção direta das amostras a olho nu (PROENÇA et al., 2006).

2.3. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico. A medida do pH foi realizada em triplicata para cada

amostra. O potenciômetro digital foi previamente calibrado com soluções tampão de biftalato de potássio pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0.

2.4. Ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel e degradação

Porções de 1,5 cm x 1,5 cm de hidrogel (n=3) de PVA (5, 10, 15 e 20%) puro (controle) e contendo EBA, com espessura e peso previamente determinados, foram imersas em 10 mL de solução que mimetiza o fluido do leito da lesão (SL: 0,68 g NaCl, 0,22 g KCl, 2,5 g NaHCO₃, 0,35 g NaH₂PO₄, 0,025g NaN₃ em 100 mL de água Milli-Q, força iônica 0,48M e pH 7,4) (LIN; CHEN, RUN-CHU, 2001).

Em um segundo momento, foram avaliadas as taxa de absorção de líquido e de degradação dos hidrogéis de PVA 10% puro e contendo EBA imersos em tampão fosfato (PBS 0,01 M, pH 7,4) ou em SL.

Cada solução contendo a porção de hidrogel imersa foi mantida em banho-maria à 37 °C, durante 10 dias. Foi adicionada azida sódica (0,1 %) às soluções no intuito de prevenir a contaminação microbiológica.

As amostras de hidrogéis em estudo foram inicialmente pesadas antes da imersão nas respectivas soluções tampão PBS e SL, bem como ao longo do tempo (ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel: 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 135, 150, 180, 195, 210, 240, 255, 270, 300, 315, 330 e 360 min; ensaio de degradação do hidrogel: 1 a 10 dias). Previamente às pesagens o excesso de líquido presente nas porções de hidrogel foi adsorvido em papel filtro. O ensaio foi realizado em triplicata.

A taxa de absorção de líquido foi calculada segundo a equação abaixo, onde $p1$ refere-se à massa da porção de hidrogel e $p2$ à massa da porção de hidrogel após turgescência:

$$\text{Taxa de Absorção} = \frac{p2 - p1}{p1} \times 100$$

Os resultados desta variável foram expressos em média \pm desvio padrão.

2.5. Ensaio *in vitro* de biocompatibilidade do hidrogel

A determinação da biocompatibilidade dos hidrogéis de PVA foi realizada via ensaio de citotoxicidade *in vitro*, conforme o protocolo ISO

10993-5. Os hidrogéis de PVA (5, 10, 15 e 20%) foram preparados conforme descrito no item 2.1 deste capítulo, distribuídos em placas de cultivo de 24 poços (300 μL) e submetidos ao processo de congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 14h, seguido de descongelamento à temperatura ambiente por aproximadamente 3 h. Após o descongelamento, as placas de cultivo foram expostas a radiação ultravioleta por um período de 4 h para efeitos de esterilização. Em virtude do EBA de cascas de banana conter compostos fenólicos sensíveis à luz U.V., o processo de esterilização foi realizado através de ultrafiltração. O EBA esterilizado (500 μL) foi transferido aos poços contendo os hidrogéis nas respectivas concentrações e a placa de cultivo foi incubada em estufa ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, atmosfera com 5% de CO_2), durante 1 hora. Subsequentemente, retirou-se o excesso de EBA, sendo adicionados 3 mL de meio de cultivo EMEM, suplementado com 10% soro fetal bovino e 1 % de antibiótico nos poços contendo os hidrogéis em estudo. Procedeu-se a nova incubação, por períodos de 7h ou 24h, em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera com 5% de CO_2 . Na sequência, foi recolhido o sobrenadante em contato com os respectivos hidrogéis, o qual foi submetido à centrifugação a 3.500 rpm durante 10 min, transferindo-o para placas contendo fibroblastos (L929), os quais foram incubados por 24 h (estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2) na presença dos meios de cultura dos tratamentos com incubação durante 7h ou 24h dos hidrogéis controle (PVA: 5, 10, 15 e 20%) ou hidrogéis (PVA: 5, 10, 15 e 20%) adicionados de EBA. Na sequência, avaliou-se a viabilidade celular através do método de MTT (brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil - MOSMAN, 1983). Após 24 horas, o sobrenadante foi removido e um novo meio de cultura contendo MTT foi adicionado, seguido de incubação por 3 horas à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO_2 . Decorrido este período, o meio de cultura foi removido e adicionado de 100 μL de DMSO para dissolver os cristais de formazan produzidos durante a incubação com MTT. As absorbâncias dos meios de cultura foram determinadas em leitor de Elisa, a 540 nm, para estabelecer a relação linear do número médio de células por poço no ensaio do MTT (MOSMAN, 1983). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

2.6. Teste de resistência à tração

O teste de resistência à tração ou tensão utilizou a metodologia ASTM D638-10 padronizada à determinação de propriedades de tração de plásticos (do inglês, *Standard Test Method for Tensile Properties of*

Plastics), da Sociedade Americana para Testes e Materiais (do inglês, *American Society for Testing and Materials – ASTM*). Os hidrogéis de PVA 10% contendo EBA foram preparados conforme descrito no item 2.1. Os hidrogéis ($n=10$) foram retirados dos moldes e segmentados (8 cm x 1 cm), seguido da determinação de sua espessura e do teste de tensão em equipamento Instron® (Fig. 46). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

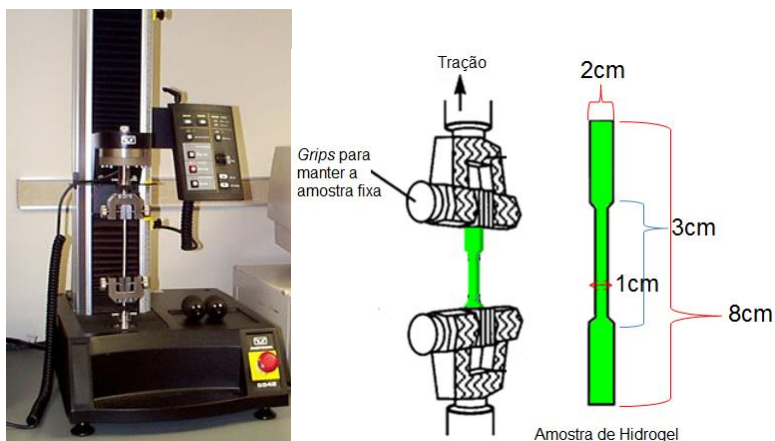


Figura 46. Equipamento Instron® (à esquerda) para teste de tração das amostras de hidrogéis em estudo. Detalhe do esquema de fixação do hidrogel no equipamento e dimensões da amostra (à direita).

2.7. Caracterização reológica

A reologia estuda a deformação e o fluxo dos materiais sob influência de tensões. Neste contexto, a matéria pode estar no estado líquido, sólido, ou gasoso (BRETAS, 2005; DAK, 2007). As propriedades reológicas dos hidrogéis foram determinadas em reômetro AR2000 TA Instruments®, utilizando pratos de geometria paralela de 20 mm com armadilha para solvente para evitar a perda de água. Para efeitos da análise da estabilidade do hidrogel no estado sólido de PVA 10% contendo EBA, amostras em formato circular com raio de 75 mm e espessura em torno de 1 mm ($n=6$) foram utilizadas. A temperatura inicial de 25 °C foi elevada até a temperatura final de 50 °C, com frequência oscilatória fixada em 1Hz e elevação de 1 °C a cada 15s. Foram analisadas as varreduras de frequência na faixa de 0,1 a 10 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$.

à temperatura ambiente e a 37 °C, mimetizando condições de interação tanto com o meio externo quanto com o organismo, e determinadas as evoluções dos módulos de armazenamento (G') e dissipação (G'').

2.8. Liberação de EBA pelo hidrogel

Primeiramente, os hidrogéis de PVA 10% foram preparados conforme descrito no item 2.1 deste capítulo. Amostras de 1,5 cm x 1,5 cm de hidrogel (n=3) puro e contendo EBA (março/2011) incorporado foram imersas em 1 mL de tampão fosfato (PBS 0,01M, pH 7,4, 0,025% de azida sódica), e incubadas em banho maria à 37 °C, sob agitação. Alíquotas (500 µL) de amostra foram coletadas entre 1min e 120 min. O volume de 1 mL foi mantido ao longo do período experimental, retornando 500 µL de tampão fosfato retirado a cada intervalo de tempo. As alíquotas amostrais foram liofilizadas e ressuspendidas em 150 µL de água Milli-Q. A liberação de EBA do hidrogel de PVA 10% foi monitorada através da quantificação de compostos fenólicos totais, através do método descrito por Randhir, Shetty e Shetty (2002), com a utilização do reativo de Folin-Ciocalteu. A quantificação dos compostos fenólicos utilizou uma curva-padrão de ácido gálico (10 µg/mL - 1000 µg/mL; $y = 0,0016x$; $r^2 = 0,99$) e os resultados foram expressos em µg de equivalentes de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média ± desvio padrão.

2.9. Ensaio in vivo do potencial cicatrizante dos hidrogéis de PVA contendo extrato aquoso de casca de banana

Conforme descrito no Capítulo 2, item 2.6.

Os ensaios que caracterizam o potencial cicatrizante dos hidrogéis foram realizados no biotério do Laboratório de Nutrição Experimental, no Centro de Ciências da Saúde, sob responsabilidade da professora Dra. Vera Lúcia Tramonte.

2.9.1. Animais e tratamento

Camundongos isogênicos Balb/C foram submetidos a procedimento anestésico (solução de quetamina 90 mg/kg e xilazina 15 mg/kg), seguido da tricotomia da região dorsal com lâmina de barbear, assepsia do local (álcool 70%) e delimitação da área de intervenção, i.e., um cm². Posteriormente, foi realizada a excisão (um cm²) do tecido

epitelial dorsal (FRANK; KÄMPFER, 2003) e após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas individuais e sem maravalha. A maravalha foi substituída por folhas de papel toalha, no intuito de não interferir no processo cicatricial, evitando o contato com a área da lesão e possível contaminação. Limpezas diárias das gaiolas foram realizadas durante o período experimental.

Estando os camundongos devidamente acondicionados, estes foram distribuídos entre os grupos experimentais (n = 6 animais/grupo), a saber:

- *grupo I* (controle negativo): os animais receberam aplicação tópica de 1,5 cm x 1,5 cm (área suficiente para cobrir toda a lesão e fixar nas bordas de tecido não lesionado) de hidrogel obtido por congelamento lento de PVA 10% liofilizado, ocorrendo a reaplicação do hidrogel quando necessário;

- *grupo II* (controle positivo): os animais receberam aplicação tópica de 1,5 cm x 1,5 cm de curativo comercial Duoderme®, ocorrendo a reaplicação diária do curativo;

- *grupo III* (grupo teste): os animais receberam aplicação tópica 1,5 cm x 1,5 cm de hidrogel obtido por congelamento lento e liofilizado de PVA 10% contendo EBA ocorrendo a reaplicação diária do hidrogel. A dose de extrato presente em cada porção de 1,5 cm x 1,5 cm de hidrogel correspondeu a nove mg de compostos fenólicos/porção.

Todos os animais receberam solução de paracetamol (110 mg/kg – via oral, duas vezes ao dia) como tratamento pós-operatório, 24h após o procedimento cirúrgico e durante todo o período experimental.

Neste estudo, o processo de reparação tecidual de lesões cutâneas experimentalmente induzidas em camundongos isogênicos Balb/C foi avaliado quanto à cinética temporal da regressão da área da lesão a nível macroscópico, abordando parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante de um extrato vegetal.

A dose escolhida para o tratamento das lesões deste estudo, i.e., 50 mg/kg/dia EBA de cascas de banana *Musa* sp., cultivar Prata Anã, baseou-se em resultados prévios obtidos por Pereira (2010). Neste contexto, a dose de EBA corresponde a nove mg de compostos fenólicos totais, necessária ao tratamento de uma lesão durante o período de nove dias, considerando os resultados descritos no Capítulo 2, item 3.

2.9.2. Morfometria da lesão

Essa variável caracteriza o potencial cicatrizante de um extrato vegetal, por exemplo, e considera a determinação da porcentagem de

redução da lesão, via comparação da área lesionada no dia do procedimento cirúrgico (t_{zero}) com a área cicatrizada a cada três dias, e o período de epitelização.

Para determinar a porcentagem de redução da lesão, as lesões foram fotografadas (Câmera Digital Sony Cyber-Shot 12.1), com distância padronizada, imediatamente após a cirurgia para retirada de tecido epitelial (área de um cm^2) e em intervalos de tempo de três dias, até a cicatrização total da lesão (FRANK; KÄMPFER, 2003). As áreas das lesões foram mensuradas com auxílio do software Image J, a partir das imagens digitalizadas. De forma similar, a porcentagem de redução da lesão (%) foi calculada utilizando a fórmula: $\% = [(\text{área cicatrizada}) \times 100] / \text{área da lesão realizada no procedimento cirúrgico inicial}$.

As lesões localizadas no dorso dos animais foram observadas diariamente após o procedimento cirúrgico para a determinação do período de epitelização. Esse período correspondeu ao número de dias necessários à completa cicatrização da lesão, ou seja, ausência de indícios do processo cicatricial (NAYAK; SANDIFORD; MAXWELL, 2007). Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

3. Resultados e discussão

3.1. Preparo dos hidrogéis

Inicialmente, foram preparados os hidrogéis de PVA (Mowiol 20-98), a partir de 1 (um) ciclo de congelamento e descongelamento, o qual foi suficiente à obtenção dos hidrogéis de PVA nas concentrações de 10 %, 15 % e 20 %. Entretanto, para o PVA 5 % foram necessários 3 (três) ciclos de congelamento e descongelamento, devido à menor concentração de polímeros em solução e consequente dificuldade de obtenção de consistência satisfatória do gel.

3.2. Características organolépticas

As características organolépticas avaliadas foram homogeneidade, cor, odor, brilho e ausência de grumos ou precipitados. Estas avaliações foram realizadas pela percepção direta via análise visual a olho nu. Em todos os tempos de avaliação dos hidrogéis, não foi detectada a degradação das matérias-primas utilizadas. Os hidrogéis mostraram-se estáveis quanto às características organolépticas ao longo de 2 (dois) meses. Entretanto, o hidrogel de PVA 10 % apresentou menor opacidade, sendo um hidrogel transparente que permitiu melhor

visualização do leito da lesão. Estas propriedades são consideradas importantes para a aceitação do produto pelos pacientes (ALMEIDA et al., 2012).

3.3. Determinação do pH

O valor de pH dos hidrogéis também é um fator importante, pois proporciona informações que podem refletir a estabilidade química da preparação, principalmente quanto à indicação de ocorrência de reações de degradação do princípio ativo, ou adjuvantes da formulação (MORAES, 2006). O pH permaneceu constante no período analisado (Tab. 14), contudo, os hidrogéis de PVA 15 % e PVA 20 % apresentaram pH uma unidade abaixo do pH fisiológico..

Tabela 14. Valores de pH dos hidrogéis de PVA.

	Tempo zero	10 dias	15 dias	30 dias	60 dias
PVA 5 %	7.3	7.3	7.3	7.3	7.2
PVA 10 %	7.1	7.3	7.3	7.2	7.3
PVA 15 %	6.2	6.3	6.2	6.1	6.1
PVA 20 %	6.2	6.3	6.2	6.2	6.1

O valor de pH, i.e. a concentração hidrogeniônica, da superfície da pele está relacionado a produção de ácido láctico (pH = 4,6 – 5,8), o que contribui como proteção bacteriana e fungicida na superfície cutânea. Entretanto, as secreções cutâneas apresentam capacidade tamponante (pH fisiológico = 7,4), como é o caso do fluido que extravasa do leito da lesão. Portanto, o controle do pH cutâneo, tanto sob o ponto de vista cosmético quanto dermatológico, é de extrema importância, no intuito de evitar a utilização de substâncias, por via tópica, que sejam agressivas ao tecido que está em processo de regeneração (ZLOGORSKI, 1987; RODRIGUES, 1995). Sendo assim, somente os hidrogéis de PVA 5 % e 10 %, com valor de pH próximo ao pH fisiológico, foram classificados como formulações mais promissoras, candidatas à aplicação tópica e para obtenção de um curativo cutâneo.

3.4. Ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel e degradação

Conforme mostra a Figura 47, a taxa de absorção de líquido pelos hidrogéis de PVA nas concentrações em análise (5, 10, 15 e 20% - m/v) aumentou significativamente de acordo com a concentração do polímero, a partir dos 260 min e até o final do período experimental, em condições *in vitro* que mimetizaram o fluido do leito da lesão, à 37 °C. Ressalta-se que o hidrogel de PVA 5 % apresentou a menor taxa de absorção de líquido e a maior taxa de degradação (Fig. 48) e, por isso, foi descartado das análises posteriores.

A taxa de absorção de líquido indica a habilidade do hidrogel, como um curativo epidérmico, de absorver o exsudato da lesão. A elevada taxa de absorção torna o hidrogel um curativo ideal à remoção de fluido de lesões altamente exsudativas e auxilia a prevenir contaminação (LALANI; LIU, 2012). Observou-se que no tempo de 250 min (aproximadamente 4h do ensaio de absorção de líquido) os hidrogéis de PVA (10, 15 e 20 %) atingiram o grau máximo de absorção de líquido. Por sua vez, o hidrogel de PVA 5 % atingiu o equilíbrio aos 125 minutos do ensaio (aproximadamente duas horas).

A estrutura química dos polímeros pode também afetar a taxa de absorção de líquido dos hidrogéis. Polímeros contendo grupos hidrofílicos, como o PVA, absorvem fluido em maior quantidade comparativamente aqueles contendo grupos hidrofóbicos, devido ao colapso destes na presença da água, minimizando a exposição do mesmo aquele solvente (PEPPAS, 2000).

A degradação de hidrogéis é definida como um processo em que a deterioração nas propriedades do polímero acontece devido a fatores de origem química, térmica, mecânica, ou por radiações, e.g. A degradação pode ser o resultado de eventos químicos, tais como: solvatação, desorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise. De forma similar, fenômenos físicos podem erodir uma matriz de polimérica devido à difusão, abrasão, trinca, descamação, quebra mecânica, ou ainda a combinação de fatores físicos e/ou químicos. Uma das formas mais simples de se avaliar o efeito dessas atividades, a qual foi empregada no presente estudo, considera a determinação da perda de massa dos hidrogéis que, normalmente, ocorre por dois fenômenos: a solvatação e a despolimerização da cadeia polimérica (COSTA-JUNIOR et al., 2008b; PANEVA, 2003; ZHANG, NEAU, 2001).

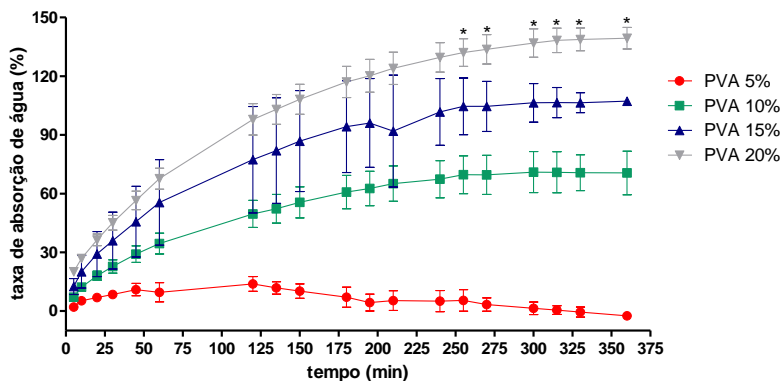


Figura 47. Taxa de absorção de água dos hidrogéis de PVA imersos em solução que mimetiza o fluido do leito da lesão a temperatura de 37 °C. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as concentrações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

A degradação dos hidrogéis de PVA 10%, 15 % e 20 % (Fig. 48) foi estatisticamente significativa até o 5º dia do período experimental, com destaque ao hidrogel de PVA 20 % com a menor taxa de degradação.

Considerando os resultados das análises organolépticas, de pH, absorção de líquido e degradação, o hidrogel de PVA 10 % foi selecionado por apresentar menor opacidade, valor de pH próximo às condições fisiológicas e taxa de degradação semelhante ao final do período experimental em relação aos hidrogéis de PVA 15 % e PVA 20 %. Em relação à taxa de absorção de líquido, ponderou-se a escolha do hidrogel de PVA 10 %, uma vez que um curativo altamente capaz de absorver líquido, i.e. PVA 15 % e 20 %, pode ser prejudicial ao processo cicatricial. Considera-se, ainda, que o ensaio *in vivo* posterior não apresenta lesão com características que a classifique como altamente exsudativa, por ser apenas a retirada de uma pequena área de tecido epitelial do dorso dos animais (FRANK; KÄMPFER, 2003).

Continuando a análise da taxa de absorção de líquido e degradação dos hidrogéis, foram preparados hidrogéis de PVA 10 %, via duas técnicas de congelamento: 1) congelamento lento à -20 °C (CL) e 2) congelamento rápido à -80 °C (CR). Além disso, uma terceira forma de preparo dos hidrogéis foi adotada, i.e., congelamento lento à -20 °C, seguido de liofilização (L) e análise. Aos hidrogéis de PVA 10%

adicionou-se o EBA na concentração de $4\text{mg}/\text{cm}^2$ (i. e., 9mg a cada $1,5 \times 1,5\text{ cm}$ de hidrogel)

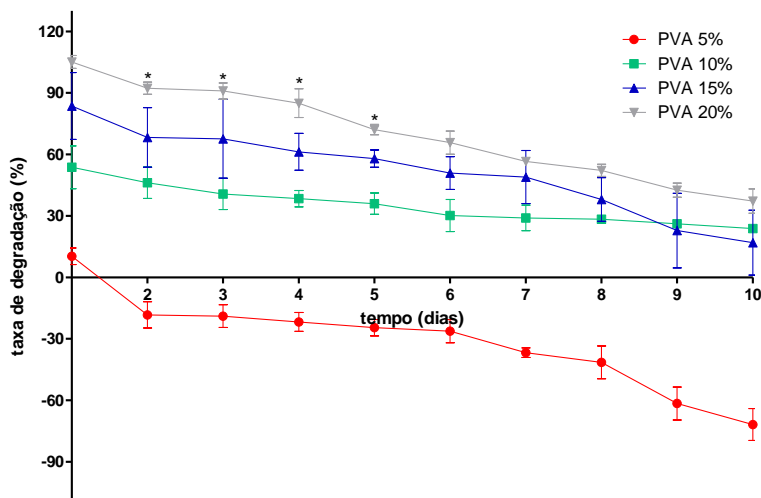


Figura 48. Taxa de degradação dos hidrogéis de PVA imersos em solução mimetizante do fluido do leito da lesão, a $37\text{ }^\circ\text{C}$. A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as concentrações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

As ligações entre as cadeias poliméricas de PVA podem ser de natureza química e física (congelamento/descongelamento), possibilitando uma grande variedade de aplicações em formulações farmacêuticas (MANSUR, 2007a,b). Através da variação da condição de congelamento dos hidrogéis de PVA 10 %, constatou-se (Fig. 49) que em até 5h do período experimental os hidrogéis congelados lentamente ($T = -20\text{ }^\circ\text{C}$) e congelados lentamente com posterior liofilização apresentaram taxas de absorção de líquido semelhantes. Comportamento distinto foi detectado ao hidrogel de PVA 10 % contendo EBA e submetido a liofilização após o ciclo de congelamento e descongelamento, imerso em solução de tampão fosfato (PBS). Pode-se inferir que quando esta condição do meio é comparada ao fluido do leito da lesão, mimetizado em condições *in vitro*, a taxa de absorção é inferior devido a maior concentração de sais nesta última. Portanto, é importante

de considerar a composição do ambiente da lesão quanto ao comportamento dos hidrogéis propostos. O fato de liofilizar o hidrogel não alterou sua capacidade de absorção de líquido. Contudo, se considerarmos a apresentação de um produto farmacêutico na forma liofilizada, é possível garantir maior estabilidade deste, evitando a contaminação por microorganismos e uso de conservantes que podem eventualmente interferir no processo de cicatrização das lesões.

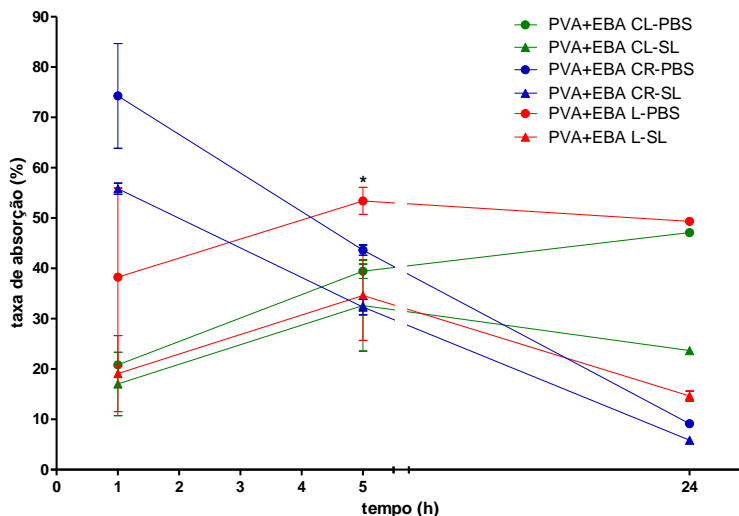


Figura 49. Taxa de absorção dos hidrogéis de PVA 10% contendo EBA, imersos em tampão fosfato (PBS) ou em solução que mimetiza o fluido do leito da lesão (SL), à 37 °C. Variações de congelamento: congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C), congelamento lento e posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

Com relação à taxa de degradação dos hidrogéis de PVA 10% contendo EBA, preparados através de congelamento lento e congelamento lento com posterior liofilização (Fig. 50), não foi observada diferença estatística significativa ao final do período experimental, apesar da variação significativa observada ao longo dos primeiros 4 dias do estudo. Os hidrogéis de PVA 10% contendo EBA

preparados por congelamento rápido (-80 °C), apresentaram elevada taxa de degradação ($p < 0,05$), a partir do 5º dia do período experimental e até o final deste.

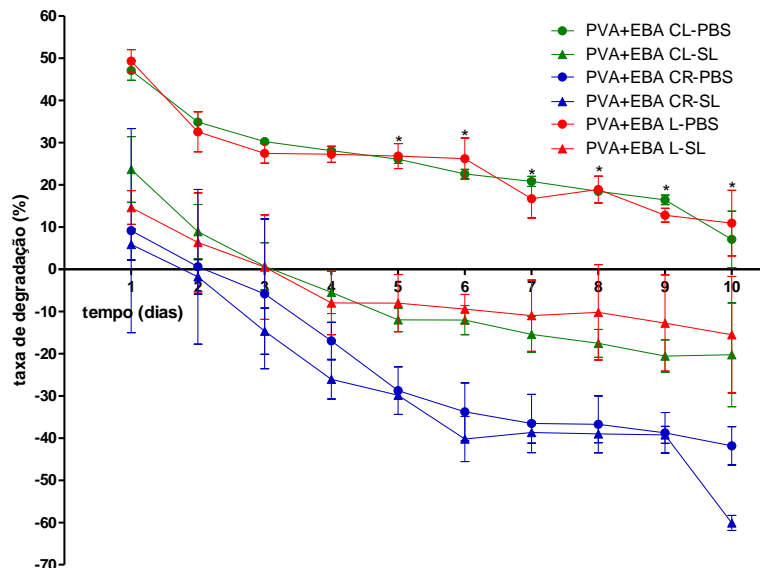


Figura 50. Taxa de degradação dos hidrogéis de PVA 10% contendo EBA imersos em tampão fosfato (PBS) e em solução que mimetiza o fluido do leito da lesão (SL) à 37 °C. Variações de congelamento: congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C); congelamento lento e posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

3.5. Ensaio *in vitro* de biocompatibilidade do hidrogel

A biocompatibilidade é o requisito principal para utilização farmacológica de sistemas poliméricos. A compatibilidade local cutânea é um dos parâmetros para aplicações clínicas. A “*International Organization for Standardization*” ISO 10993-5 apresenta um guia para avaliação da biocompatibilidade de materiais para aplicação médica, com prioridade dada a estudos *in vitro* baseados em cultivo celular, através de contato direto e indireto. O ensaio de citotoxicidade neste trabalho

utilizou o contato indireto, expondo-se os hidrogéis de PVA 10 %, com e sem EBA incorporado, ao meio de cultura durante 7h e 24h. Num segundo momento, o sobrenadante que estava em contato com as matrizes poliméricas foi transferido e colocado em contato com fibroblastos L929 de camundongos, durante 24h.

Neste experimento, a viabilidade celular foi determinada via ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT), que permite mensurar o metabolismo celular. O ensaio do MTT avalia a função celular em nível mitocondrial, baseando-se em reação colorimétrica à quantificação do produto de redução do MTT, i.e., formazan, no interior das mitocôndrias das células viáveis (MOSMAN, 1983). Quanto maior a intensidade de cor do meio de reação (absorbância, $\lambda = 540\text{nm}$), maior é a taxa metabólica e, portanto, menor a citotoxicidade do tratamento em análise, assumindo-se como uma medida indireta da biocompatibilidade do material testado.

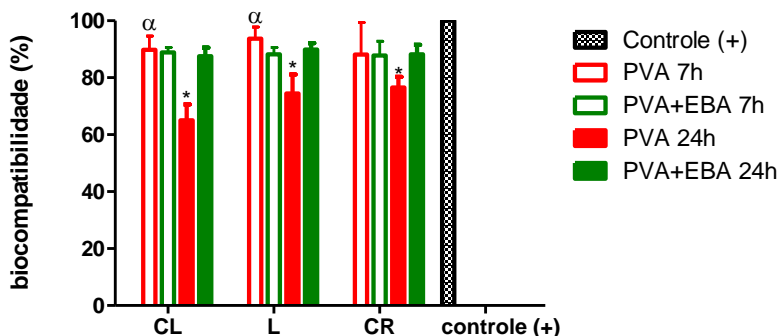


Figura 51. Biocompatibilidade dos hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C); congelamento rápido (CR; T = -80 °C); congelamento lento e, posterior, liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). Ensaio realizado via contato indireto com tempo de exposição de 7h e 24h do meio de cultivo nos respectivos hidrogéis. Onde, α : PVA 7h vs. 24h; *: PVA 24h vs. controle positivo.

A análise *in vitro* da biocompatibilidade (Fig. 51) permite inferir que o tempo de contato dos hidrogéis (PVA 10 %) com o meio de cultura alterou a viabilidade dos fibroblastos. A viabilidade celular diminuiu significativamente no tempo de 24h. Entretanto, quando da adição do EBA, a atividade mitocondrial dos fibroblastos após 7h e 24h

de exposição indireta com os hidrogéis de PVA 10 % se manteve semelhante ao controle positivo, não sendo observados sinais de citotoxicidade. A partir da Fig. 51, é possível observar que a biocompatibilidade variou entre 88 ± 2 % (hidrogéis de PVA+EBA, 7h) e 89 ± 3 % (hidrogéis de PVA+EBA, 24h). Os valores dos tratamentos com hidrogéis contendo EBA e o controle positivo (100% de viabilidade), não diferiram significativamente ($p < 0,05$). Assim, os hidrogéis de PVA 10% contendo EBA são considerados promissores para serem testados em ensaios *in vivo*, por serem biocompatíveis com as células de fibroblastos L929 de camundongos. De fato, hidrogéis indicados ao desenvolvimento de produtos farmacêuticos, como os curativos, devem apresentar biocompatibilidade e biodegradabilidade aceitáveis (HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008).

O teste de biocompatibilidade *in vitro*, utilizando cultura de células de fibroblastos L929, é considerado um dos primeiros passos à identificação de compostos ativos e como primeiro teste de biossegurança (ISO 10993-5). Todas as amostras de hidrogéis + EBA apresentaram um desempenho acima de 80%, superior aos 50% considerado como viabilidade celular mínima aceitável como biocompatível (SEBAUGH, 2010).

3.6. Teste de resistência à tração

As propriedades mecânicas de um hidrogel polimérico podem ser caracterizadas pelo seu comportamento de resposta à aplicação de uma carga (Fig. 52). Polímeros amorfos, como as borrachas, são macios e com grande capacidade de recuperação elástica, ou seja, retirada a carga retornam à sua forma original. A liberdade de movimento da cadeia do polímero é mantida no nível local, enquanto que a estrutura de rede, resultante da reticulação química ou física, dificulta o movimento em grande escala ou o fluxo. Assim os polímeros dessa classe tendem a apresentar menor módulo de elasticidade ou rigidez e grande capacidade de deformação. As borrachas também podem exibir um aumento da tensão antes do colapso. Contrariamente, vidros e polímeros semicristalinos, por exemplo, têm alto módulo elástico e pouca deformação (SPERLING, 2001; RATNER et al., 1996).

A força de tensão máxima, que indica a resistência à tração, em grandes deformações é importante à seleção de polímeros e em particular para aplicações biomédicas. A força de tensão máxima de um polímero é a tensão no/ou próxima ao colapso do material. A tenacidade de um polímero está relacionada à energia absorvida até a falha (KHAN,

PEH, CH'NG, 2000; ASTM D638-10; BAHRAMI, 2003; CAMPOS, 2005; RAO et al., 2007; COSTA-JUNIOR, 2008a,c).

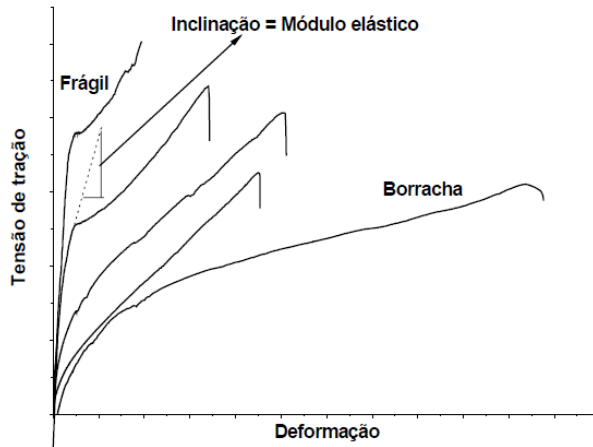


Figura 52. Propriedades mecânicas de um polímero em função das variáveis tensão de tração e deformação.

A resistência à tração, ou força de tensão, dos hidrogéis de PVA 10 % derivados do congelamento lento (CL; T= -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C), e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T= -20 °C), foi determinada em amostras com dimensões de 8 cm x 1 cm, com espessura de aproximadamente CL = 1000 ± 120 µm, CR = 450 ± 32 µm e L = 400 ± 29 µm. As amostras de hidrogel, em formato de tiras, foram fixadas pelas extremidades e em uma delas foi aplicada a força de tração a uma velocidade de 0,5 mm/s. A força de ruptura e a elongação dos hidrogéis foi mensurada a partir do momento do rompimento da porção central dos hidrogéis (n=10, THIRAWONG et al., 2007). A resistência à tração e a elongação foram calculadas através das seguintes fórmulas (SEZER et al., 2007):

$$1) \text{ Resistência à tração (N/mm}^2\text{)} = \frac{\text{força de ruptura (N)}}{\text{área secção transversal da amostra (mm}^2\text{)}}$$

$$2) \text{ Elongação (\%)} = \frac{\text{comprimento no ponto da ruptura (mm)}}{\text{comprimento inicial (mm)}} \times 100$$

A Figura 53 mostra que a resistência à tração foi semelhante ($p < 0,05$) entre os hidrogéis de PVA 10 % + EBA preparados via congelamento lento (CL + EBA e L + EBA). O processo de liofilização do material não interferiu nas propriedades mecânicas dos hidrogéis (Figs. 53 e 54). Entretanto, o procedimento de congelamento rápido diminuiu significativamente a resistência à tração dos hidrogéis congelados à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (CR e CR + EBA), em torno de 3 a 4 ordens de magnitude, comparativamente aos hidrogéis de congelamento lento, com ou sem EBA incorporado. Além disso, a adição de EBA proporcionou um aumento significativo na resistência à tração dos hidrogéis preparados via congelamento lento. Todavia, a adição de EBA ao hidrogel de PVA 10 % obtido por congelamento rápido não alterou sua resistência em relação ao polímero sem extrato.

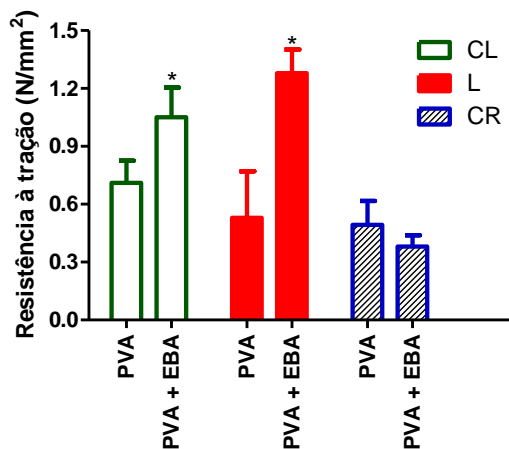


Figura 53. Resistência à tração (N/mm²) dos hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA preparados por congelamento lento (CL; T = $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), congelamento rápido (CR; T = $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T = $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

O congelamento rápido ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) resultou em hidrogéis claramente mais frágeis e menos elásticos em comparação ao congelamento lento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, Figs. 53 e 54). Possivelmente, o processo de congelamento mais rápido permite a formação de um maior número de *crosslink*, o que também diminui a porcentagem de alongamento dos

hidrogéis (Fig. 54). A adição de EBA não alterou a porcentagem de alongação dos hidrogéis, independente do processo de congelamento adotado.

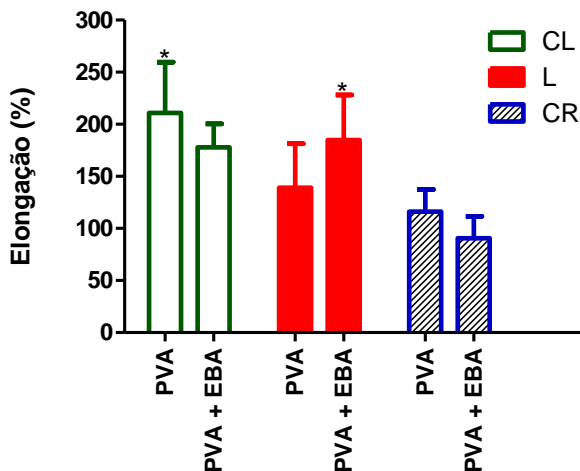


Figura 54. Porcentagem de alongação dos hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C) e congelamento lento com posterior liofilização do hidrogel (L; T = -20 °C). A diferença estatística foi simbolizada por (*), quando comparadas as diferentes formulações dos hidrogéis de PVA, considerando $p < 0,05$.

Os hidrogéis de PVA 10% apresentaram redes poliméricas com resistência mecânica suficiente, a qual é requerida em aplicações biomédicas. Portanto, estes hidrogéis podem ser utilizados para cobrir lesões e suportar alguma fricção durante as atividades cotidianas. Assim, mesmo em caso de um atrito acidental, esses filmes poliméricos têm a capacidade de absorver energia sem quebrar, proporcionando um efeito protetor à lesão e corroborando os achados de Singh e Pal (2012).

3.7. Caracterização reológica

Seguindo com a caracterização das amostras de PVA 10%, foram estudadas suas propriedades reológicas. O estudo das propriedades reológicas de uma determinada amostra de hidrogel obtida

via solubilização do polímero em água, i.e., com sua apresentação na forma líquida, considera que esta tem um comportamento de fluxo livre, característico do estado líquido, em que o módulo de dissipação (G'') é maior que o módulo de armazenamento (G') (BRANDL et al., 2010). Entretanto, a obtenção dos hidrogéis de PVA 10 % em estudo depende do processo de congelamento à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e porque o reômetro utilizado atingia a temperatura mínima equivalente a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, não foi possível determinar o ponto de gelatinização das amostras de hidrogéis. Em função disto, as amostras dos hidrogéis de PVA 10 % foram transferidas ao reômetro na forma sólida e as análises reológicas realizadas após o procedimento de congelamento e descongelamento destas. Sendo assim, os *crosslinking* formados nas estruturas polimérica dos hidrogéis são caracterizados por valores de $G' > G''$, conforme observado nas Figuras 55-60.

Para hidrogéis de PVA 10%, no estado sólido, foram determinados os módulos de armazenamento (G') e dissipação (G''), através da varredura de frequência na faixa de $0,1$ a 10 rad.s^{-1} , à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

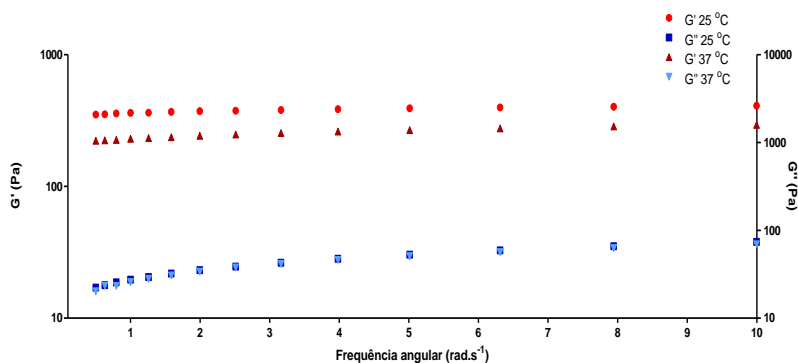


Figura 55. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') consoante à varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % sem EBA, preparado por congelamento rápido (CR; $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Conforme as Figs. 55 e 56, em ambas as temperaturas analisadas é possível observar um aumento nos módulos de armazenamento ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 3865\text{ Pa}$ e $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 3577\text{ Pa}$) e de dissipação ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $G'' = 223,1\text{ Pa}$ e $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G'' = 339,6\text{ Pa}$) nos hidrogéis de PVA 10 % obtidos por congelamento rápido e contendo EBA, ao final varredura

de frequência, comparativamente à amostra sem EBA na formulação ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 409,7\text{ Pa}$, $G'' = 74,03\text{ Pa}$ e $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 293,6\text{ Pa}$, $G'' = 69,51\text{ Pa}$ – ordens de magnitude aproximadas: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' =$ aumento de 9x; $G'' =$ aumento de 3x e $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' =$ aumento de 12x; $G'' =$ aumento de 5x).

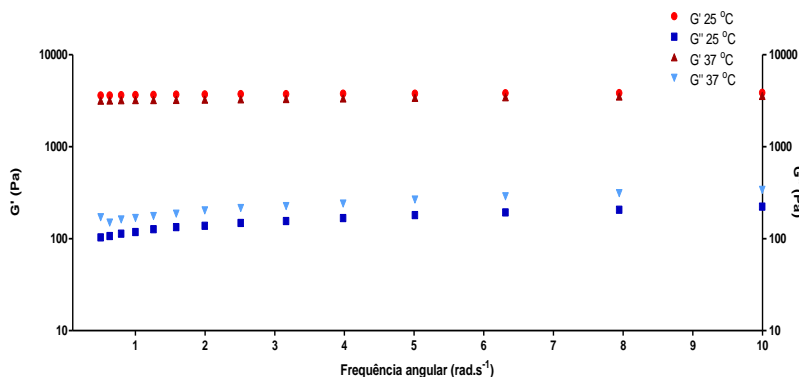


Figura 56. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') conforme a varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento rápido (CR; $T = -80\text{ }^{\circ}\text{C}$).

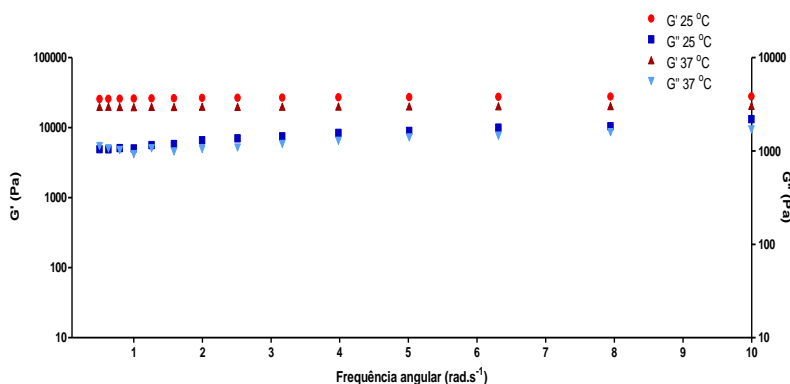


Figura 57. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') consoante à varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % sem EBA, preparado por congelamento lento (CL; $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

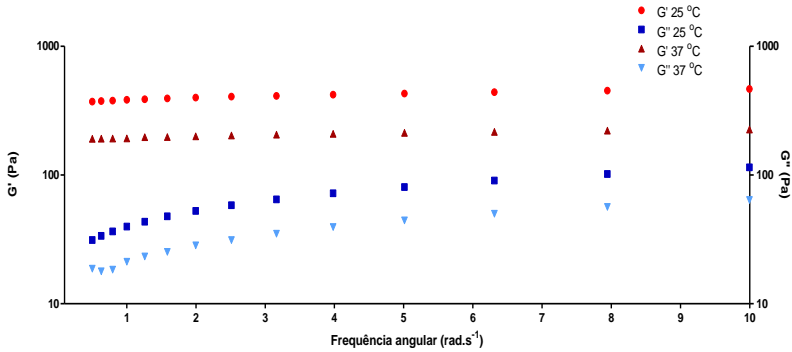


Figura 58. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento lento (CL; $T = -20$ °C).

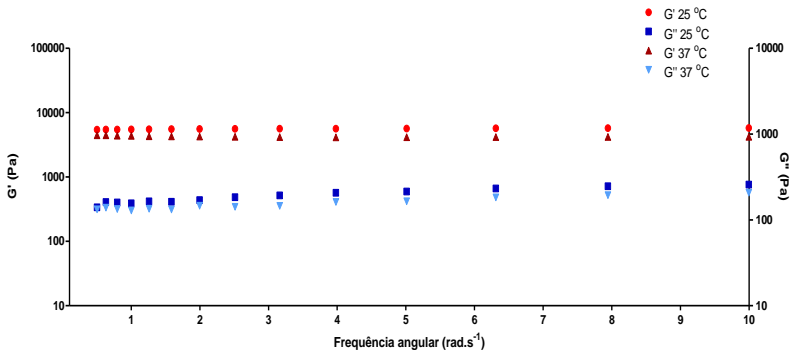


Figura 59. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % não adicionado de EBA, preparado por congelamento lento, seguido de liofilização do hidrogel.

Os hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA obtidos por congelamento lento (Figs. 57 e 58) apresentaram, ao final da varredura de frequência, módulos de armazenamento ($T = 25$ °C, $G' = 466,6$ Pa e $T = 37$ °C, $G' = 226,1$ Pa) e de dissipação ($T = 25$ °C; $G'' = 114,9$ Pa e $T = 37$ °C, $G'' = 64,06$ Pa) muito menor (ordens de magnitude aproximadas: $T = 25$ °C, $G' = 6x$ menor; $G'' = 19x$ menor e $T = 37$ °C,

$G' = 9x$ menor; $G'' = 27x$ menor) em relação aos hidrogéis de PVA 10 % não adicionado de EBA ($T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 2797\text{ Pa}$, $G'' = 2195\text{ Pa}$, $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 2062\text{ Pa}$, $G'' = 1702\text{ Pa}$).

Os hidrogéis de PVA 10 % contendo EBA obtidos por congelamento lento seguido de liofilização (Figs. 59 e 60) apresentaram, ao final da varredura de frequência, valores de módulos de armazenamento (G') de 2379 Pa ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 1198 Pa ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de dissipação (G'') iguais a 257,1 Pa ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) e 148,9 Pa ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$), sendo inferiores comparativamente ao hidrogéis de PVA 10 % sem EBA, e.g., $G'(25\text{ }^{\circ}\text{C}) = 5793\text{ Pa}$, $G''(25\text{ }^{\circ}\text{C}) = 257,8\text{ Pa}$ e $G'(37\text{ }^{\circ}\text{C}) = 4231\text{ Pa}$, $G''(37\text{ }^{\circ}\text{C}) = 208,1\text{ Pa}$ (Ordens de magnitude aproximadas: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 2x$ menor e $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $G' = 4x$ menor; $G'' = 1x$ menor). O módulo de dissipação à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, entretanto, mostrou-se semelhante para as formulações em estudo.

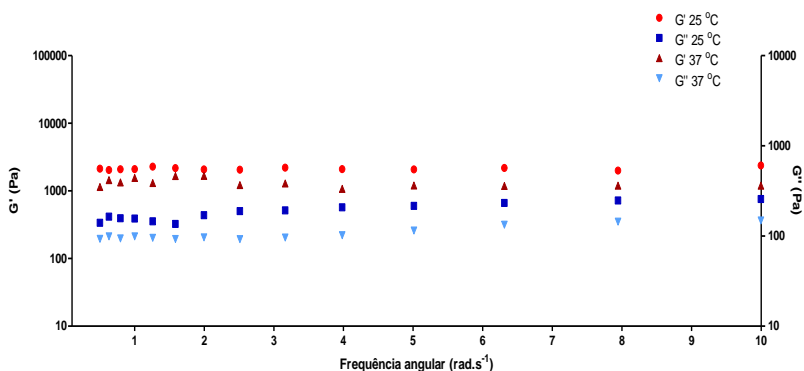


Figura 60. Módulos de armazenamento (G') e de dissipação (G'') em função da varredura de frequência (rad.s^{-1}) do hidrogel de PVA 10 % adicionado de EBA, preparado por congelamento lento, seguido de liofilização.

Na Tabela 15, são mostrados os valores de G' , expressos em média \pm desvio padrão, dos hidrogéis de PVA estudados. Quanto maior o valor daquela variável, maior é a rigidez de uma formulação de hidrogel. Portanto, infere-se que a adição de EBA à matriz de PVA 10 %, seguido de congelamento rápido, propiciou a obtenção de hidrogéis mais rígidos (*), corroborando os resultados obtidos no item 3.6, i.e. baixa resistência à tração e baixa porcentagem de alongação em relação aos demais tratamentos. Nas demais formulações contendo EBA obtidas

por congelamento lento, a adição do extrato de cascas de banana induziu a redução de G' , resultando em formulações menos rígidas e mais elásticas, conforme observado nos experimentos de teste de resistência à tração (item 3.6). Além disso, à 37 °C, os hidrogéis apresentam menor rigidez ($p < 0,01$), comparativamente à condição de temperatura ambiente (25 °C). Portanto, estas matrizes poliméricas podem ser consideradas suportes mecânicos adequados à composição de curativos aplicáveis a processos de cicatrização de lesões, uma vez que em contato com a pele serão facilmente moldados, possivelmente, apresentando-se mais rígidos em condições de armazenamento, i.e. à temperatura ambiente.

Tabela 15. Valores dos módulos de armazenamento (G') dos hidrogéis de PVA 10 % puros e adicionados de EBA, à 25 °C e 37 °C, preparados por congelamento lento (CL; T = -20 °C), congelamento rápido (CR; T = -80 °C) e congelamento lento seguido de liofilização (L; T = -20 °C).

Amostra	25 °C	37 °C
CR	376,764 ± 18,796	250,314 ± 23,6255
CR + EBA	3724,786 ± 83,2662 (*)	3313,143 ± 128,7185 (*)
CL	26758,570 ± 757,698 (*)	20025 ± 257,465 (*) (**)
CL + EBA	408,636 ± 29,868	204,114 ± 11,560
L	5597,714 ± 110,070 (*)	4278,786 ± 107,274 (*) (**)
L + EBA	2137,429 ± 101,577	1322,357 ± 191,719 (**)

Nota: Quanto maior o valor de G' , mais rígida é a matriz polimérica. (*) Diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando comparadas as amostras adicionadas ou não de EBA. (**) Diferença estatística significativa ($p < 0,001$) quando comparadas as amostras em relação à variação de temperatura.

Os perfis de varreduras de frequência (Figs. 55-60) das amostras revelam que, em geral, o módulo de armazenamento (G') permanece constante e superior ao módulo de dissipação (G'') ao longo de toda a faixa de frequência angular estudada (0,1 a 10 rad.s⁻¹), independente da temperatura (25 °C e 37 °C). De acordo com Thatiparti, Shoffstall e Recum (2010), o comportamento superior de G' em relação a G'' indica a formação de géis fortes e rígidos. De fato, uma rede tridimensional é caracterizada quando G' apresenta valores superiores a G'' , sendo este aumento independente da frequência angular (WILLIAMS et al., 2011). As formulações ora estudadas exibem claramente uma correlação positiva com a frequência angular e, por isso, não exibem uma estrutura de gel tridimensional definitiva.

3.8. Liberação de EBA pelo hidrogel

Nas últimas décadas, os hidrogéis têm sido extensivamente utilizados como matrizes à liberação controlada de fármacos e na engenharia de tecidos. A popularidade desses materiais baseia-se em sua versatilidade química, permite a criação de uma ampla variedade de hidrogéis com propriedades distintas (HOARE; KOHANE, 2008; PEPPAS et al., 2000). Além disso, hidrogéis geralmente apresentam excelente biocompatibilidade por assemelharem-se físico-quimicamente à matriz extracelular. Comparativamente a outros biomateriais, tais como o poli (ácido lático) ou poli (lático-co-glicólico), os polímeros hidrofílicos são adequados à retenção de biomoléculas por não apresentarem interações hidrofóbicas, as quais podem afetar sua atividade (PEPPAS et al., 2000; LIN; ANSETH, 2009).

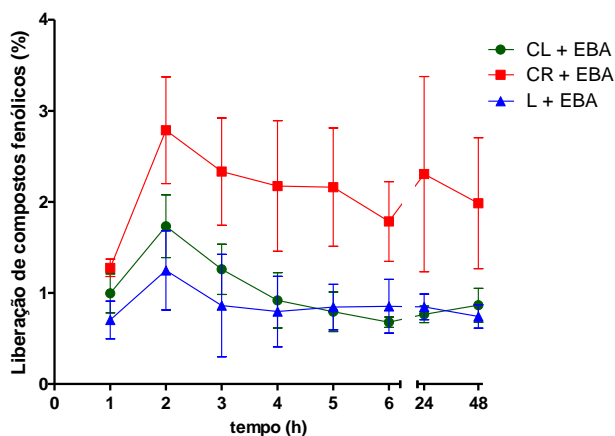


Figura 61. Percentual de liberação de compostos fenólicos totais do EBA ao longo de um período de 48 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento (-20 °C), congelamento rápido (-80 °C) e congelamento lento seguido de liofilização do hidrogel. O ensaio foi realizado em solução que mimetiza o fluido do leito da lesão, à 37 °C.

Para o estudo da liberação de compostos fenólicos, os hidrogéis de PVA 10 % foram polimerizados após a adição de EBA padronizado na forma liofilizada. Os hidrogéis de PVA foram preparados conforme descrito no item 2.1, e antes de serem submetidos ao congelamento, i.e.

polimerização, EBA liofilizado foi adicionado a solução de PVA 10 %, de modo a não alterar o volume do hidrogel.

A Figura 61 mostra a liberação de EBA a partir do hidrogel de PVA 10% monitorada através da quantificação de compostos fenólicos totais, utilizando-se o método descrito por Randhir, Shetty e Shetty (2002). Somente 3 % do conteúdo de compostos fenólicos foi liberado da estrutura polimérica de PVA 10 % ao meio. Provavelmente, os compostos fenólicos formaram ligações do tipo pontes de hidrogênio com a estrutura polimérica e não foram liberados à solução de imersão dos hidrogéis.

Em virtude destes resultados, conduziu-se um segundo experimento visando diminuir a interação dos compostos fenólicos do EBA com a estrutura polimérica do hidrogel de PVA. Considerando a semelhança entre os perfis de liberação dos hidrogéis obtidos por congelamento lento (CL + EBA) e congelamento lento seguido de liofilização (L + EBA), os resultados promissores das propriedades determinadas no ensaio de absorção de líquido pelo hidrogel e degradação, da avaliação da biocompatibilidade e das propriedades mecânicas (teste de resistência à tração), selecionou-se o hidrogel de PVA 10 % obtido por congelamento lento seguido de liofilização (L + EBA) para esta série experimental. Todavia, destaca-se que a incorporação do EBA ao polímero foi realizada de duas formas, a saber: *i*) o EBA foi incorporado ao hidrogel de PVA 10 % antes da polimerização e, *ii*) preparou-se uma solução concentrada de EBA, na qual os hidrogéis de PVA 10 % obtidos por congelamento lento seguido de liofilização foram imersos.

Porções (1,5 cm x 1,5 cm) de hidrogéis de PVA 10 % polimerizados e liofilizados foram imersos em 2 mL de solução de EBA (2 mg/mL), protegidos da luz, durante 5 h, à 25 °C. Este período de tempo foi selecionado de acordo com os resultados do ensaio de absorção de líquido, em que os hidrogéis de PVA 10 % atingiram o grau máximo de absorção em aproximadamente 4 h. Após as 5 h de imersão dos hidrogéis de PVA em EBA, foi realizado o ensaio de liberação e quantificação dos metabólitos de interesse.

De acordo com a Tabela 16, os compostos fenólicos totais foram quantificados no tempo zero (n=3), i.e., antes da imersão das amostras de hidrogéis, e após 24 h. Além disso, a dosagem de compostos fenólicos totais foi realizada no EBA (n=3), sem a presença do hidrogel, objetivando determinar a eventual ocorrência de degradação dos compostos durante o procedimento de imersão dos hidrogéis. Apesar de ter sido detectada uma taxa de degradação de aproximadamente 9 % do

EBA, mais de 50 % do total de compostos fenólicos foram incorporados à matriz polimérica, i.e., em torno de 1 mg para cada segmento (1,5 cm x 1,5 cm) de hidrogel de PVA 10 %.

Analisando os dois tipos de hidrogéis de PVA obtidos, pode-se considerar a possibilidade de obtenção de dois tipos de curativos. Assim, matrizes poliméricas liofilizadas contendo apenas 1 mg de compostos fenólicos poderiam ser utilizadas como curativos aplicados uma vez ao dia. De outra forma, os hidrogéis contendo EBA incorporado antes da polimerização, contendo 9 mg de EBA, poderiam ser utilizados por um período mais longo, sem o requerimento de substituição do curativo (vide capítulo 1, item 3.2.2).

Tabela 16. Conteúdo de compostos fenólicos totais do EBA (mg/mL) utilizado como solução de imersão dos hidrogéis de PVA 10 %.

Solução de imersão: EBA	Conteúdo inicial de compostos fenólicos totais (mg/mL)	Conteúdo final (t_{1h}) de compostos fenólicos totais (mg/mL)	Conteúdo final (t_{24h}) de compostos fenólicos totais (mg/mL)
Sem hidrogel liofilizado	2,03 ± 0,09	-	1,82 ± 0,22
Com hidrogel liofilizado	2,03 ± 0,09	-	0,81 ± 0,11
Com hidrogel não liofilizado	2,03 ± 0,09	1,27 ± 0,16	-

Nota: As soluções de imersão (EBA) foram armazenadas ao abrigo da luz, à 25 °C, por um período de 5h.

Os dados da liberação de compostos fenólicos a partir das porções de hidrogel de PVA 10% liofilizadas estão apresentados na Figura 62. Novamente, constatou-se que a concentração de compostos fenólicos diminui ao longo do tempo, não ocorrendo liberação dos compostos de interesse a partir da matriz polimérica.

Devido à retenção dos compostos fenólicos à matriz polimérica de PVA, possivelmente pela formação de ligações de pontes de hidrogênio (Figs. 42 e 44), foi preparado um novo hidrogel de PVA 10

%, porém não liofilizado. Na sequência, porções (1,5 cm x 1,5 cm) do novo hidrogel (n=3) foram imersas em 2 mL de solução de EBA (2 mg/mL), durante 1 h, ao abrigo da luz e à 25 °C. Ao término do tempo de incubação, determinou-se o valor dos teores de compostos fenólicos totais liberados ao meio (Fig. 63).

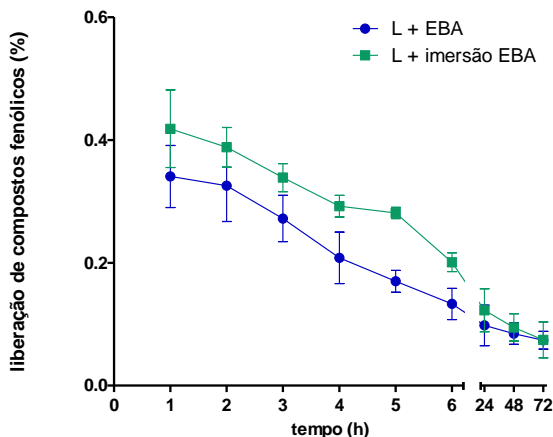


Figura 62. Percentual de liberação de compostos fenólicos do EBA ao longo de 72 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento ($T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de liofilização. O ensaio utilizou uma solução que mimetiza o fluido do leito da lesão, à 37 °C. Legenda: L + EBA: hidrogel de PVA adicionado de EBA incorporado previamente à polimerização; L + imersão EBA: hidrogel de PVA com EBA incorporado por imersão após a polimerização.

Os dados da Figura 63 revelam que 15 % do conteúdo total de compostos fenólicos foram liberados do hidrogel ao meio nos primeiros 30 minutos e que a concentração dos metabólitos se manteve constante por um período de 60 minutos. Após a primeira hora do ensaio de liberação, a concentração de compostos fenólicos decresceu. A maior porcentagem de liberação de compostos fenólicos observada neste ensaio, comparativamente aos resultados dos experimentos anteriores, explica a interação daqueles metabólitos secundários com a matriz polimérica de PVA. Assim, hidrogéis contendo reduzido teor de água, quando em contato com o EBA, tornam-se mais resistentes mecanicamente, dado o aumento do número de ligações do tipo pontes de hidrogênio (Fig. 53). Porém, nos hidrogéis não liofilizados, o

comportamento de interação das moléculas de EBA é distinto, uma vez que uma maior concentração de compostos fenólicos foi imediatamente liberada. Pode-se especular que as moléculas do EBA penetraram na matriz polimérica de PVA por difusão, ali permanecendo sem interagir com a rede polimérica do PVA via ligação química. Além disso, o decréscimo da concentração de compostos fenólicos pode ser explicado por sua degradação ao longo do tempo e também porque a taxa de absorção de líquido do hidrogel atingiu o limite.

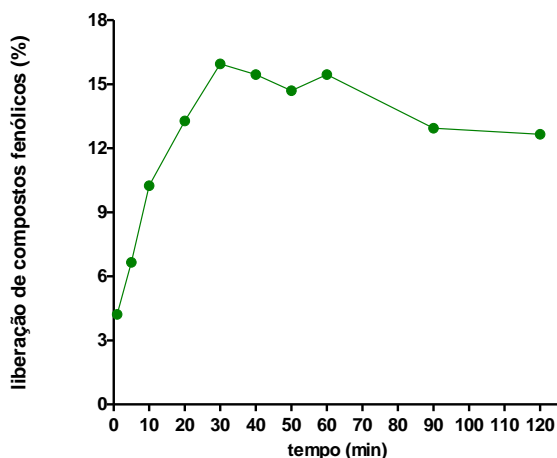


Figura 63. Percentual de liberação de compostos fenólicos do EBA ao longo de 2 h, a partir de hidrogéis de PVA 10 % preparados por congelamento lento ($T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$) seguido de imersão em solução do EBA (2 mg/mL). O ensaio realizado utilizou solução que mimetiza o fluido do leito da lesão, à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

De acordo com Peppas e colaboradores (2000), hidrogéis sintéticos, como o PVA oferecem uma forma possivelmente eficaz e conveniente para administrar moléculas bioativas. Os hidrogéis são redes tridimensionais hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água e, por isso, assemelham-se ao tecido epitelial, por exemplo. São insolúveis, devido à presença de ligações químicas ou interações físicas e podem ser sintetizados de modo a responder a certos parâmetros fisiológicos e estímulos presentes no organismo, tais como o pH, a força iônica e a temperatura.

O PVA é um polímero sintético, biodegradável, não tóxico, solúvel em água, que possui excelente propriedade formadora de filme (SUDHAMANI; PRASAD; SANKAR, 2003; MATSUMURA et al., 1999). Associações de polímeros sintéticos como o PVA e naturais como a quitosana têm sido investigadas, conforme estudo de Costa-Júnior (2008b) que apresentou resultados promissores quanto a aplicação *in vivo*, pois as características mecânicas de degradação *in vitro* e viabilidade celular foram compatíveis com as características do tecido epitelial. Os polímeros estudados por aquele autor apresentaram grau de intumescimento de 150% a 700% em 24h, índices de degradação entre 20% e 75%, em 24h, e viabilidade celular *in vitro* superior a 60%, em relação ao controle celular. Polímeros a base de quitosana/PVA oferecem uma ampla faixa de possibilidades de uso biomédico, tais como biomaterial, veículo de liberação controlada de drogas e engenharia de tecido epitelial.

Singh e Pal (2012) sintetizaram e caracterizaram hidrogéis de PVA contendo antibióticos no formato de curativos para lesões. Os hidrogéis de PVA formam filmes permeáveis ao oxigênio (quantidade de oxigênio que penetrou na rede polimérica após 24h: $6,40 \pm 0,20$ mg/L) e ao vapor de água (taxa de penetração de vapor d'água de $1814,88 \pm 249,71$ mg/dia/L, além de funcionarem como barreira à entrada de microorganismos no leito da lesão. Os hidrogéis de PVA têm a capacidade de absorver líquido, biocompatibilidade sanguínea positiva com atividade hemolítica entre 2-5%. Todas estas propriedades indicam que hidrogéis de PVA podem ser utilizados como curativos em lesões cutâneas.

As propriedades dos hidrogéis de PVA 10% desta pesquisa, juntamente com os estudos de Peppas e colaboradores (2000), Costa-Júnior (2008b) e Singh e Pal (2012), culminaram no estudo *in vivo* descrito a seguir para a formulação de hidrogel liofilizado de PVA 10% + EBA padronizado, no intuito de verificar o seu potencial cicatrizante.

3.9. Ensaio *in vivo* do potencial cicatrizante dos hidrogéis de PVA adicionados de EBA

O processo fisiológico de cicatrização de lesões é dividido, didaticamente, em quatro fases: coagulação, inflamação, seguida pela migração e proliferação, e finalmente a remodelagem. Estas fases, ocasionalmente, se sobrepõem ou ocorrem simultaneamente. Nas paredes dos vasos danificados, as plaquetas imediatamente aderem ao colágeno exposto da parede do vaso. Os aglomerados de plaquetas

parcialmente coalescem e liberam os fatores que iniciam a coagulação. Uma rede de fibrina forma um tampão de plaquetas e preenche a abertura da lesão. O propósito desta rede de fibrina, ou primeira matriz extracelular, é reter os componentes celulares do sangue e assim formar um coágulo para hemóstase, oclusão da lesão e provisão de uma matriz à proliferação celular e a síntese de colágeno (MUZZARELLI, 1997; SCHMIDT, 2005). Similar à atuação da rede de fibrina, propõe-se a rede polimérica de PVA como um substituto, conferindo também proteção física contra a desidratação e a contaminação por agentes infecciosos. E, além disso, o polímero de PVA pode ser utilizado como um curativo contendo compostos ativos em sua formulação, os quais são capazes de estimular a proliferação celular, e o leito da lesão esteja condicionado a acelerar o processo cicatricial de maneira ordenada e com qualidade.

3.9.1. Morfometria da lesão x potencial cicatrizante do EBA

O potencial cicatrizante *in vivo* do hidrogel de PVA 10% com EBA incorporado antes da polimerização (9 mg de compostos fenólicos/segmentos de 1,5 cm x 1,5 cm), obtido por congelamento lento seguido de liofilização foi determinado via morfometria da lesão, medindo-se o período de epitelização e a porcentagem de redução da lesão.

Conforme demonstrado na Tabela 17, os animais tratados com hidrogel de PVA 10% + EBA apresentaram período de epitelização de 9 dias, estatisticamente inferior ($p < 0,05$) aos grupos controle positivo (12 dias), negativo 1 (15 dias) e negativo 2 (11 dias). O grupo controle negativo 1 foi inserido a fim de observar se somente o hidrogel de PVA 10 % apresenta algum potencial cicatrizante. E, portanto, foi possível observar que o hidrogel liofilizado de PVA 10 % foi estatisticamente eficaz quando comparado ao controle negativo 1 e o controle positivo, acelerando o processo de cicatrização. De acordo com os resultados descritos no Capítulo 2, item 3, o grupo de animais tratados apenas com EBA apresentou período de epitelização correspondente a 9 dias, valor igual ao observado para os animais tratados com hidrogel de PVA 10% contendo EBA e posterior liofilização. Isso indica que o fato do EBA estar incorporado à estrutura tridimensional do hidrogel não comprometeu o seu potencial de regeneração tecidual, apesar do seu conteúdo ter sido retido na rede polimérica.

Além disso, o curativo liofilizado de PVA 10% + EBA se mostrou estatisticamente mais eficaz ao acelerar o processo de cicatrização,

reduzindo em 3 dias o período de epitelização, comparativamente ao curativo comercial DuoDERME® (Tab. 17).

Tabela 17. Período de epitelização à conclusão do processo cicatricial determinado via modelo de excisão de tecido epitelial em camundongos tratados com hidrogéis liofilizados de PVA 10 % e curativo DuoDERM® (n=6/grupo de tratamento).

Grupos de Tratamento	Período de Epitelização (dias)
CN 1	15 α', β
CN 2	11 α', β
CP	12 α', α''
PVA 10% + EBA	9 α', α'', β

Nota: Grupos de tratamento: CN 1= controle negativo: animais não tratados; CN 2= controle negativo: animais tratados com hidrogel liofilizado de PVA 10%; CP = controle positivo: animais tratados com curativo comercial DuoDERME®; PVA 10% + EBA: grupo teste de animais tratados com hidrogel liofilizado de PVA 10% contendo EBA. A diferença estatística foi simbolizada por α, β $p < 0,05$, onde α' : CN 1, α'' : CN 2 e β : CP.

Em contrapartida, o hidrogel liofilizado de PVA 10% + EBA, além de formar uma rede polimérica protetora da lesão e controlar a desidratação e as trocas gasosas no leito da lesão, contem em sua composição EBA como agente terapêutico. Os compostos fenólicos do EBA foram incorporados na matriz polimérica de PVA via ligações de pontes de hidrogênio, tornando-se quimicamente mais estáveis. Assim, mantiveram a atividade ao longo do período experimental ao proporcionar uma regeneração tecidual tão eficaz quanto a aplicação diária de extrato aquoso padronizado de casca de banana. O EBA possui compostos fenólicos em sua composição com propriedade de acelerar o processo de regeneração tecidual, atuando no aumento da proliferação celular (Capítulo 2, itens 3.2 e 3.3), sem apresentar ação antibacteriana (Capítulo 2, item 3.4.1).

O DuoDERME® é um curativo com fórmula de gel controlada, altamente flexível para uso em feridas secas ou ligeiramente exsudativas, conforme modelo de excisão tecidual estudado. Este curativo é composto por gelatina, carboximetilcelulose sódica, pectina,

poliisobutileno, borracha butílica, borracha de estireno-isopreno-estireno, metileno 3, 5-di-tert-butil-4-hidroxicinamato, éster de pentaeritritol, óleo mineral e poliuretano e protege a lesão da contaminação microbiana. O tratamento dos animais com aplicação tópica do curativo DuoDERME® (controle positivo) mostrou-se equivalente ao tratamento com a aplicação tópica do hidrogel liofilizado de PVA 10% (controle negativo).

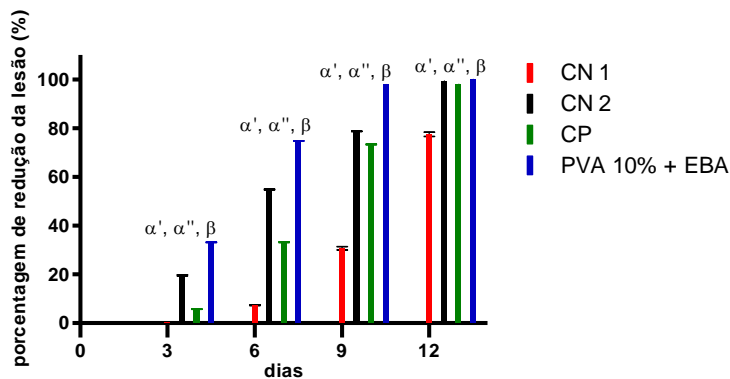


Figura 64. Porcentagem de redução da lesão mensurada a cada 3 dias durante 12 dias de tratamento com curativos liofilizados de PVA 10% contendo EBA, comparativamente aos grupos controles positivo e negativo. Modelo de excisão de tecido epitelial em camundongo. Cada barra representa média \pm erro padrão da média ($n=6$, por dia, por grupo de tratamento: CN 1= controle negativo: animais sem tratamento; CN 2: hidrogel liofilizado de PVA 10%; CP = controle positivo: curativo DuoDERME®; PVA 10% + EBA: curativo liofilizado de PVA 10% contendo EBA. A diferença estatística foi simbolizada por α , β , onde α' : em relação ao CN 1, α'' : em relação ao CN 2 e β : em relação ao CP, considerando $p<0,05$.

A progressão da cicatrização das lesões, realizadas por excisão de uma área tecidual correspondente a 1 cm^2 , foi monitorada em intervalos de tempo de 3 dias até o período total de epitelização do grupo controle positivo, i.e, 12 dias. Portanto, esse foi o período de tempo máximo padronizado para determinar os parâmetros que caracterizam o potencial cicatrizante do hidrogel proposto. A porcentagem de redução da lesão, foi determinada ao longo do processo de cicatrização, através de

registros de imagens fotografadas em intervalos de tempo de 3 dias até total cicatrização da lesão.

Os valores de porcentagem de redução da lesão ao longo do processo cicatricial (Fig. 64) permitem afirmar que os animais tratados com o hidrogel liofilizado de PVA 10% + EBA apresentaram aceleração do processo de regeneração tecidual, comparativamente aos grupos controles positivo e negativo. Os animais tratados com o hidrogel liofilizado de PVA 10% + EBA (Fig. 64) apresentaram redução significativa ($p < 0,001$) da lesão entre o 3º e o 9º dia de tratamento, em relação aos animais dos grupos controles, culminando em um período de epitelização significativamente ($p < 0,001$) menor. Em contrapartida, o tratamento com o curativo comercial DuoDERME® (controle positivo) foi menos eficaz ao longo do processo cicatricial quanto à redução da lesão, em relação ao grupo controle negativo (hidrogel liofilizado de PVA 10%). Observou-se que as lesões estavam muito úmidas quando da aplicação do curativo comercial DuoDERME®, o que, possivelmente, retardou o processo de redução da lesão (Fig. 64) e a conclusão do período de epitelização (Tab. 17).

4. Conclusão

No presente estudo foram obtidos hidrogéis de PVA de 5, 10, 15 e 20 %, por congelamento (rápido e lento) e descongelamento. Todas as formulações mostraram-se estáveis com relação às características organolépticas e pH, ao longo de dois meses. Destaque para o hidrogel de PVA 10 % com menor opacidade e valor de pH próximo ao fisiológico.

A taxa de absorção de líquido nas diferentes concentrações de hidrogéis de PVA (5, 10, 15 e 20%) aumentou significativamente de acordo com a concentração do polímero. Esta é uma característica importante devido a possibilidade do hidrogel funcionar como um curativo que permite a absorção de uma determinada quantidade de líquido exsudato da lesão, além de protegê-la contra a perda de água, uma vez que funciona como uma barreira física protetora.

Os hidrogéis de PVA 10 %, puro e contendo EBA na sua composição, não apresentaram sinais de citotoxicidade no ensaio *in vitro*. Por isso, são consideradas formulações biocompatíveis.

Ao analisar as propriedades mecânicas dos hidrogéis, foi visto que a resistência à tração diminuiu nos hidrogéis obtidos por congelamento rápido, tornando as formulações mais frágeis e menos elásticas. O processo de liofilização do material não interferiu nas

propriedades mecânicas dos hidrogéis preparados através de congelamento lento. A adição de EBA aos hidrogéis causou um aumento significativo na resistência à tração dos materiais analisados.

Com a caracterização reológica, foi possível observar o comportamento de gel das amostras de PVA 10 %. A adição de EBA resultou em formulações menos rígidas e mais elásticas. A temperatura de 37 °C, os hidrogéis apresentam menor rigidez, quando comparados a temperatura ambiente (T=25 °C), indicando que no formato de um curativo, por exemplo, quando aplicados em uma lesão irão moldar-se à ela facilitando a sua aplicação tópica.

Os hidrogéis de PVA 10 % são dispositivos com alta capacidade de adsorção de compostos bioativos. Os compostos fenólicos do EBA podem formar ligações de hidrogênio com a estrutura polimérica do PVA.

O estudo *in vivo* do potencial cicatrizante do hidrogel liofilizado de PVA 10 % + EBA indica que esta formulação estabilizou quimicamente os compostos fenólicos de EBA e poderá ser utilizada como um curativo com potencial cicatrizante promissor, sendo um produto diferenciado em relação ao curativo comercial DuoDERME®.

5. Referências bibliográficas

ASTM D638-10 **Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics**, 2012.

ALMEIDA, J.S.; BENVENÚ, D.M.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; BARCELOS, R.C.; CORADINI, K.; CARVALHO, L.M.; BÜRGER, M.E.; BECK, R.C.R. Hydrogels containing rutin intended for cutaneous administration: efficacy in wound healing in rats. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, p. 792 – 799, 2012.

BAHRAMI, S.B.; KORDESTANI, S.S.; MIRZADEH, H.; MANSOORI, P. Poly(vinyl alcohol) – chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. **Iranian Polymer Journal**, v. 12, p.139-146, 2003.

BENNETT, S.L.; MELANSON, D.A.; TORCHIANA, D.F.; WISEMAN, D.M.; SAWHNEY, A.S. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers. **Journal of cardiac Surgery**, v. 18, p. 494-499, 2003.

- BRANDL, F.; HAMMER, N.; BLUNK, T.; TESSMAR, J.; GOEPFERICH, A. Biodegradable hydrogels for time-controlled release of tethered peptides or proteins. **Biomacromolecules**, v. 11, p. 496-504, 2010.
- BRETAS, R.E.S.; D'ÁVILA, M.A. **Reologia de polímeros fundidos**. 2. ed. São Carlos: Ed. UFSCar, 2005.
- CAMPOS, M.G.N.; GROSSO, C.R.F.; CÁDENAS, G.; MEI, L.H.I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposian**, v. 229, p. 253-257, 2005.
- CHAN, M.M-Y.; DUNNE F.; HO, C-T.; HUANG, H-I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 1281–1286, 1999.
- COSTA JR., E.S.; MANSUR, H.S. Syntesis and carachterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel films for skin tissue engineering application. In: **International Symposium on Natural Polymer and Composites**, 2007. Gramado: Associação Brasileira de Polímeros.
- COSTA JR., E.S.; MANSUR, H.S. Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend chemically crosslinked by glutaraldehyde for tissue engineering application, In: **Congresso Brasileiro de Polímeros**, 2007. Campina Grande: Associação Brasileira de Polímeros.
- COSTA, H.S.; ROCHA, M.F.; ANDRADE, G.I.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; PEREIRA, M.M.; ORÉFICE, R.L.; VASCONCELOS, W.L.; MANSUR, H.S. Sol-gel derived composite from bioactive glass-polyvinyl alcohol. **Journal of Materials Science**, v. 43, p. 494–502, 2008a.
- COSTA-JÚNIOR, E.S. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial**. 2008b. 133f. Tese de Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas) - Universidade Federal de Minas Gerais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

COSTA, H.S.; MANSUR, A.A.P.; BARBOSA-STANCIOLI, E.F.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. Morphological. Mechanical and biocompatibility Characterization of Macroporous Alumina Scaffolds Coated with Calcium Phosphate/PVA. **Journal of Materials Science**, v. 43, p. 510-524, 2008c.

CROUVEZIER, S.; POWELL, B.; KEIR, D.; YAQOUB, P. The effects of phenolic components of tea on the production of Pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes *in vitro*. **Cytokine**, v. 13, p. 280–286, 2000.

DAK, M.; VERMA, R.C.; JAAFREY, S.N.A. Effect of temperature and concentration on rheological properties of “Kesar” mango juice. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 1011–1015, 2007.

DIAS, A.M.A.; BRAGA, M.E.M.; SEABRA, I.J.; FERREIRA, P.; GIL, M.H.; SOUSA, H.C. Development of natural-based wound dressings impregnated with bioactive compounds and using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, p. 9–19, 2011.

EKICI, S.; ILGIN, P.; BUTUN, S.; SAHINE, N. Hyaluronic acid hydrogel particles with tunable charges as potential drug delivery devices. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 1306-1313, 2011.

FRANK, S.; KÄMPFER, H. Excisional wound healing: an experimental approach. In: DIPIETRO, A., BURNS, A.L. **Wound Healing: Methods and Protocols**. Humana Press, 2003.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1638–1649, 2008.

HOARE, T.R.; KOHANE, D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. **Polymer**, v. 49, p. 1993-2007, 2008.

ISO 10993-5:2009. **International Organization for Standardization**. IHS, 3. ed. Switzerland, 2009.

JEN, A.C.; WAKE, M.C.; MIKOS, A.G. Review: hydrogels for cell immobilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 357-364, 1996.

KAPOOR, M.; HOWARD, R.; HALL, I.; APPLETON, I. Effects of epicatechin gallate on wound healing and scar formation in a full thickness incisional wound healing model in rats. **American Journal of Pathology**, v. 165, p. 299–307, 2004.

KÁLAL, J. Water sensitive chemically crosslinked gels. In: FINCH, C.A. **Chemistry and technology of water-soluble polymers**. New York: Plenum Press, 1983.

KHAN, T. A.; PEH, K.K.; CH'NG, H.S. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for dressing. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 303-311, 2000.

KURARAY Europe GmbH. **Mowiol® Technical data sheet**. Division PVA-PVB, Frankfurt, 2006.

LALANI, R.; LIU, L. Electrospun zwitterionic poly(sulfobetaine methacrylate) for nonadherent, superabsorbent, and antimicrobial wound dressing applications. **Biomacromolecules**, v. 13, p. 1853-1863, 2012.

LEE, W.; LEE, T.G.; KOH, W.G. Grafting of poly(acrylic acid) on the poly(ethylene glycol) hydrogel using surface-initiated photopolymerization for covalent immobilization of collagen. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 13, p. 1195-1200, 2007.

LEE, K.Y.; MOONEY, D.J.. Hydrogels for Tissue Engineering. **Chemical Reviews**, v. 101, p. 1869-1879, 2001.

LIN, C.C.; ANSETH, K.S. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. **Pharmaceutical Research**, v. 26, p. 631-643, 2009.

LIN, S.; CHEN, K.; RUN-CHU, L. Design and evaluation of drug-loaded wound dressing having thermoresponsive, adhesive, absorptive and easy peeling propertie. **Biomaterials**, v. 22, p. 2999-3004, 2001.
LIU, B.S.; HUANG, T.B. A novel wound dressing composed of nonwoven fabric coated with chitosan and herbal extract membrane for wound healing. **Polymer Composites**, v. 31, p. 1037-1046, 2010.

LOZINSKY, V.I.; ZUBOV, A.L.; SAVINA, I.S.; PLIEVA, F.M.. Study of cryostructuration of polymer systems. XIV. Poly(vinyl alcohol) cryogels: apparent yield of the freeze–thaw-induced gelation of concentrated aqueous solutions of the polymer. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 77, p. 1822-1831, 1999.

MANSUR, H.S.; Oréface, R.L.; MANSUR, A.A.P. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and pva-derived hybrids by small-angle x-ray scattering and ftir spectroscopy. **Polymer**, v. 45, p. 7193-7202, 2004.

MANSUR, H.S.; SADAHIRA, C.M; SOUZA, A.; MANSUR, A.A.P. FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Material Science and Engineering C**, v. 28, p. 539-548, 2007a.

MANSUR, A.A.P. **Mecanismo físico-químico de aderência na interface argamassa modificada com polímeros/cerâmica de revestimento**. 2007. 365f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Ciência e Eng. de Materiais). Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte 2007b.

MANSUR, H.S.; COSTA, H.S. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol).chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p. 72-83, 2008.

MATSUMURA, S.; TOMIZAWA, N.; TOKI, A.; NISHIKAWA, K.; TOSHIMA, K. Novel poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. **Macromolecules**, v. 32, p. 7753-7761, 1999.

MORAES, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181f. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUZZARELLI, R.A.A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 131-140, 1997.

NAYAK, B. S.; SANDIFORD, S.; MAXWELL, A. Evaluation of the wound-healing activity of ethanolic extract of *Morinda citrifolia* L. leaf. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 351-356, 2007.

OREFICE, R.L.; DISCACCIATI, J.A.C.; NEVES, A.D.; MANSUR, H.S.; JANSEN, W.C. *In situ* evaluation of polymerization kinetics and corresponding evolution of the mechanical properties of dental composites. **Polymer testing**, v. 22, p. 77-81, 2003.

OVINGTON, L.G., Advances in wound dressings. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 33–38, 2007.

PANEVA, D., Mincheva, R., Stoilova, O., Manolova, N., RashkoV, I. 2003. Degradation of chitosan in the presence of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) by a crude enzyme complex from *trichoderma viride*. **e-Polymers**, v. 19, p. 1-9, 2007.

PEPPAS, N.A.; MIKOS, A.G. Preparation methods and structure of hydrogels, p. 1-26. In: PEPPAS, N. A. Hydrogels in medicine and pharmacy: Fundamentals, v. 1, 1986.

PEPPAS, N.A.; MONGIA, N.K. Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 43, p. 51-58, 1997.

PEPPAS, N.A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27 – 46, 2000.

PROENÇA, K.S.; ROMA, R.M.; OLIVEIRA, R.V.M.; GONÇALVES, M.M.; VILA, M.M.D.C. Avaliação da estabilidade de cremes empregando diferentes agentes de consistência. **Revista Brasileira Farmacêutica**, v. 87, p. 74-77, 2006.

RANDHIR, R.; SHETTY, P.; SHETTY, K. L-DOPA and total phenolic stimulation in dark germinated fava bean in response to peptide and

phytochemical elicitors. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1247-1256, 2002.

RAO, P.S.; SRIDHAR, S.; WEY, M.Y.; KRISHNAIAH, A. Pervaporative Separation of ethylene glycol/water mixtures by using cross-linked chitosan membranes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 46, p. 2155-2163, 2007.

RATNER, B.D.; HOFFMMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials science: An introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996. 494p.

RODRIGUES, L. A avaliação biofísica da superfície cutânea: indicadores fisiológicos da funcionalidade epidérmica. **Revista Portuguesa de Farmácia**, v. 45, p. 52-59, 1995.

SCHIMIDT, R. **Topical delivery of α 1-antichymotrypsin for wound healing**. 2005. 192f. Tese (Doutorado em Tecnologia Farmacêutica). Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians, Universität München, München, 2005.

SEBAUGH, J.L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, v. 10, p. 128-134, 2010.

SEZER, A.D.; HATIPOGLU, F.; CEVHER, E.; OGURTAN, Z.; BAS, A.L.; AKBUGA, J. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and *in vitro/in vivo* evaluation. **AAPS Pharmaceutical Science & Technology**, v. 8, p. 1-8, 2007.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N.A. Modelling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, p. 139-157, 2001.

SINGH, B.; PAL, L. Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogelwound dressings for slow drug delivery: Mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 9, p. 9-21, 2012.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. 3. ed. Pennsylvania: Wiley Interscience, 2001. 671 p.

SUDHAMANI, S.R.; PRASAD, M.S.; SANKAR, U.K. DSC and FTIR studies on gellan and polyvinyl alcohol (PVA) blends films. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 245-250, 2003.

TAMURA, H.; FURUIKE, T.; NAIR, S.V.; JAYAKUMA, R. Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 820-824, 2011.

THATIPARTI, T.R.; SHOFFSTALL, A.J.; RECUM, H.A. Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics. **Biomaterials**, v. 31, p. 2335-2347, 2009.

THOMSON, R.C.; ISHAUG, S.L.; MIKOS, A.G.; LANGER, R. Polymers for biological systems, p. 717-724. In: MEYERS, R.A. **Molecular biology and biotechnology**: A comprehensive desk reference. VCH Publishers: New York, 1995.

WAGNER, H.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283-295, 2001.

WANG, K.; BURBAN, J.; CUSSLER, E. Hydrogels as separation agents. **Responsive Gels**, v. 2, p. 67-79, 1993.

WANG, T.; TURHAN, M.; GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, p. 911-918, 2004.

WICHTERLE, O.; LIM, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. **Nature**, v. 185, p. 117-118, 1960.

WILLIAMS, P.D.; OZTOP, M.H.; MCCARTHY, K.L.; LO, Y.M. Characterization of water distribution in xanthan-curdlan hydrogel complex using magnetic resonance imaging, nuclear magnetic resonance relaxometry, rheology, and scanning electron microscopy. **Journal of Food Science**, v. 76, p. E472, 2011.

YANG, F.; VILLIERS, W.J.; MCCLAIN, C.J.; VARILEK, G.W. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-

production and lethality in a murine model. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2334–2340, 1998.

YANG, S.; LEONG, K.-F.; DU, Z.; CHUA, C.-K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 679-689, 2001.

YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Scavenging effect of various tea extracts on superoxide derived from the metabolism of mutagens. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, p. 1768–1770, 1998.

YUDANOVA, T.N.; RESHETOV, I.V. Drug synthesis methods and manufacturing technology modern wound dressings: manufacturing and properties. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, p. 85–92, 2006.

ZHANG, H.; NEAU S.H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v. 22, p. 1653-1658, 2001.

ZHANG, H.; ZHANG, F.; WU, F. Physically crosslinked hydrogels from polysaccharides prepared by freeze-thaw technique. **Reactive & Functional Polymers**, v. 73, p. 923-928, 2013.

ZLOTOGORSKI, A. Distribution of skin surface pH on the forehead and cheek of adults. **Archives of Dermatological Research**, v. 279, p. 238-401, 1987.