

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Jocelene Filippin Cossetin

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Cinnamomum zeylanicum* Blume (LAURACEAE).**

Santa Maria, RS
2016

Jocelene Filippin Cossetin

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Cinnamomum zeylanicum* Blume (LAURACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Profa. Dra. Melânia Palermo Manfron

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Cossetin, Jocelene Filippin
Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade biológica de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). / Jocelene Filippin Cossetin.-2016.
94 f.; 30cm

Orientadora: Melânia Palermo Manfron
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Análise fitoquímica. Potencial antioxidante 2. Estudo químico 3. *C. Zeylanicum*. Antimicrobiana 4. Potencial antioxidante. Citotóxico 5. Antigenotóxico. Antiinflamatório I. Manfron, Melânia Palermo II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Jocelene Filippin Cossetin. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

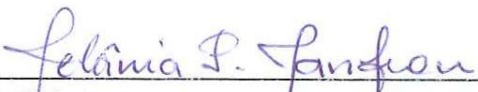
E-mail: jocelenecossetin@yahoo.com.br

Jocelene Filippin Cossetin

**CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
BIOLÓGICA DE *Cinnamomum zeylanicum* Blume (LAURACEAE).**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

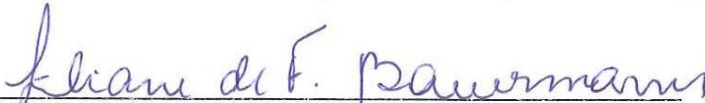
Aprovada em 06 de abril de 2016:



Melânia Palermo Manfron, Profa. Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Fabiane Moreira Farias, Profa. Dra. (UNIPAMPA)



Liliane de Freitas Bauermann, Profa. Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

"Quando se diz obrigado, se dizem muitas coisas mais, que vêm de muito longe com a origem do indivíduo, e de tão perto como o pulsar do coração".

Pablo Neruda

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me proporcionado caminhos e oportunidades na minha vida para chegar até aqui e com muita fé concluir mais uma etapa.

Aos meus pais, pelo apoio e pela compreensão, por muitas vezes não poder estar ao lado deles em momentos de reunião em família, em momentos difíceis na qual mesmo sabendo da importância da minha presença ou mesmo passar fins de semana consecutivos eu não pude estar presente. Tudo isso, com certeza, por estar envolvida na construção desta dissertação, mais uma conquista nossa.

A minha irmã, Lu mais que querida, que conseguiu conviver comigo nesses dois últimos anos os quais foram vividos com os mais variados sentimentos. Você foi quem aguentou as minhas chatices e brigas, mas foi também quem esteve sempre presente sendo a pessoa que todo dia quando chegava em casa eu podia conversar, desabafar e compartilhar todas experiências vividas. Minha eterna amiga, meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço a minha colega e amiga Camila Cuelho, companheira de longa data, a quem devo boa parte desta conquista. Meus mais sinceros agradecimentos pela amizade que construímos ao longo destes 8 anos e pelo apoio incondicional que sempre me dá. Sem isso, certamente, não teria chegado até aqui. Meu muito obrigado!

Agradeço as colegas e amigas do Laboratório, pela amizade, paciência e pelo suporte, tão determinantes para a realização deste trabalho, em especial: Marina, Évelin Iuri, Débora, Rachel, Maiara, Alexandre, Camila, Lucas Juliana, Agradeço também a Rafaela, pelas análises realizadas bem como auxílios e conhecimentos compartilhados sobre o HPLC. Meus mais sinceros agradecimentos.

A Maiara, minha IC, a qual foi fundamental na construção deste trabalho, pois a partir do nosso trabalho conjunto e convívio diário conseguimos chegar até o final desenvolvendo-o com muita responsabilidade e dedicação contornando as dificuldades e obstáculos sem deixar que o cansaço nos atingisse.

A vera e Rafaela e Rose querida! As suas presenças e Cias. diária além dos seus “bom dias contagiantes”!

Aos colegas Pedro Henrique Doleski, Natália Jardim Roberta Rosso, Alessandra Guedes, que ajudaram de alguma forma nesse trabalho.

À Prof^a. Daniela B. Rosa Leal e seus orientados, principalmente Pedro Henrique Doleski e Alessandra Guedes, pela ajuda na indução, tratamento das ratas e demais experimentos, na realização do ensaio in vivo.

Meu muito obrigado pela professora Marta Palma Alves e Cristiane de Bona pela contribuição ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização dos testes físico químicos da formulação para aplicação tópica.

Ao Professor Michel Mansur e seus orientados, principalmente Jonathaline, Elisandra, Luciane, pela ajuda nos experimentos de Citotoxicidade e genotóxicidade.

À Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização de testes.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelo ensino, aprendizagem e espaço físico para a realização deste trabalho.

*À professora **Melania Palermo Manfrom** orientadora por ter confiado no meu trabalho e no meu potencial, pela transmissão de seus conhecimentos, além de ter servido como base sólida para a construção deste trabalho.*

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Cinnamomum zeylanicum* Blume (LAURACEAE).

AUTORA: Jocelene Filippin Cossetin
ORIENTADORA: Melânia Palermo Manfron

Cinnamomun zeylanicum Blume conhecida como canela e pertencente à família Lauraceae, é utilizada na medicina popular para inflamações, reumatismo, infecções cutâneas, dor de cabeça, depurativo do sangue e calmante. O objetivo deste trabalho foi determinar parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal; identificar compostos químicos do metabolismo secundário; desenvolver e caracterizar formulação creme-gel contendo o extrato em diferentes concentrações, bem como investigar atividade antioxidante antimicrobiana, antioxidante e antígeno-tóxica no extrato das folhas de canela, além de analisar a atividade antiinflamatória avaliando a de dermatite de contato *in vivo* em formulação creme-gel contendo o extrato desta espécie. Na caracterização físico-química, por meio de testes farmacopéicos foi utilizado à droga vegetal seca das folhas de canela, constatando que não houve variação significativa da amostra coletada. No extrato hidroetanólico 70% (EB) das folhas de *C. zeylanicum* verificou-se presença alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas e cumarinas. Por doseamento espectroscópico foram determinados polifenóis, flavonóides e taninos no EB. *C. zeylanicum* mostrou potencial antioxidante qualitativa por CCD com valor de CE₅₀ e IAA de 12,88µg/mL e 15,91% pelo método DPPH. A atividade antimicrobiana frente à *E.coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* pelo método de microdiluição em caldo e atividade antígeno-tóxica analisadas em cultura de leucócitos humanos pelos teste de viabilidade e proliferação celular, ensaio cometa e frequência de micronúcleos. As concentrações CzE1 µg/mL e CzE10 µg/mL de extrato reverteram o dano genotóxico causado pelo peróxido de hidrogênio. A Hidróxicumarina e o Cinamaldeido foram identificados por CLAE respectivamente. O creme-gel contendo concentração de 5%, 10% e 15% de extrato apresentou valores de pH (6,0-6,5), características organolépticas, espalhabilidade e viscosidade em conformidade com o preconizado para aplicação tópica. O creme-gel a 5% e 10% apresentou atividade antiinflamatória na dermatite de contato avaliado *in vivo* pelo modelo de indução de dermatite de contato. Os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *C. zeylanicum* possibilitam controle de qualidade da droga e extrato apresentou atividades antioxidante, antimicrobiana, antígeno-tóxica e antiinflamatória.

Palavras-chave: Análise fitoquímica. Estudo químico. *C. Zeylanicum*. Antimicrobiana. Potencial antioxidante. Citotóxico. Antígeno-tóxico. Antiinflamatório.

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL AND EVALUATION OF BIOLOGICAL EXTRACT *Cinnamomum zeylanicum* Blume EFFECTS.

AUTHOR: Jocelene Filippin Cossetin
ADVISER: Melânia Palermo Manfron

Cinnamomun zeylanicum Blume known as cinnamon and belongs to the Lauraceae family, is used in folk medicine for inflammation, rheumatism, skin infections, headache, blood purifying and soothing. The objective of this study was to determine the physical-chemical parameters of quality of vegetable drug; identifying chemical compounds secondary metabolism; develop and characterize cream-gel formulation containing the extract in different concentrations and investigate antimicrobial antioxidant activity, antioxidant and antigenotoxic the extract of cinnamon leaves, in addition to analyzing the anti-inflammatory activity by evaluating the contact dermatitis in vivo in cream-gel formulation containing the extract of this species. In the physical-chemical characterization through pharmacopoeia tests was used to dry vegetable drug cinnamon leaves, noting that there was no significant variation of the samples. In hydroethanolic extract 70% (EB) of *C. zeylanicum* sheets verified the presence alkaloids, flavonoids, tannins, saponins and coumarins. For spectroscopic assay were determined polyphenols, flavonoids and tannins in EB. *C. zeylanicum* showed qualitative antioxidant potential by CCD with EC50 and AAI value 12,88 μ g / mL and 15.91% by DPPH method. The antimicrobial activity against E.coli, K. pneumonia, S. aureus and P. aeruginosa by the microdilution broth method and analyzed antigenotoxic activity in cultured human leukocytes test for viability and cell proliferation, comet assay, and micronucleus frequencies. Concentrations CzE1 / mL and CzE10 / mL extract reversed the genotoxic damage caused by hydrogen peroxide. The hydroxycoumarin and cinnamaldehyde were identified by HPLC respectively. The cream gel containing a concentration of 5%, 10% and 15% extract had pH values (6.0-6.5), organoleptic properties, viscosity and spreadability in accordance with the recommendations for topical application. The cream-gel 5% and 10% had anti-inflammatory activity in contact dermatitis evaluated in vivo by contact dermatitis induction model. The physical-chemical parameters established for *C. zeylanicum* enable quality control of drugs and extract showed antioxidant activity, antimicrobial, anti-inflammatory and antigenotoxic.

Keywords: Phytochemical analysis. Chemical study. *C. Zeylanicum*, Antimicrobial. Antioxidant potential. Cytotoxic. Anti genotoxic. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Aspecto geral de *Cinnamomum zeylanicum* Blume.....22

MANUSCRITO 1: Análise fitoquímica, dosagens de fenólicos, taninos e flavonoides e avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica do extrato das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*.

Figura 1 – Curva padrão do Ácido Gálico com suas concentrações versus absorvâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.36

Figura 2 – Curva padrão da quercetina com suas concentrações versus absorvâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.37

Figura 3 – Curva padrão da catequina com suas concentrações versus absorvâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.37

Figura 4 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH apresentadas pelas imagens luz Visível (A) e pela luz ultravioleta (B) das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* em cromatoplacas. Fase móvel: Clorofórmio: metanol (8,5: 3,5)39

Figura 5 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e Quercetina do extrato da folha de *Cinnamomum Zeylanicum* nas diferentes concentrações de DPPH.40

Figura 6 – Efeitos do extrato *C. zeylanicum* (canela) nos parâmetros antígeno-tóxicos de leucócitos humanos em cultura expostas a peróxido de hidrogénio.....44

MANUSCRITO 2: Análise fitoquímica por HPLC-DAD e Desenvolvimento de formulação Creme-gel contendo extrato *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela): Avaliação em modelo experimental de dermatite de contato.

Figura 1 – Representação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato das folhas de *C. zeylanicum* e do composto a Hidróxicumarina (A) identificado.....66

Figura 2– Representação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato das folhas de *C. zeylanicum* e do composto a Cinamaldeído (B) identificado.....66

Figura 3 – Formulação creme-gel base 3 – Creme-gel: após o preparo (A), Creme- gel após 7 dias de análise (B), Creme- gel após 14 dias de análise (C), Creme- gel Após 30 dias de análise.....69

Figura 4 – Avaliação das formulações [Creme-gel c/extrato 5% (a); Creme-gel c/extrato 10% (b) e Creme-gel c/extrato 15% (c)] nos seguintes tempos determinados: após o preparo (A); após 7 dias de preparo (B); após 14 dias de preparo (C) e após 30 dias de preparo (D)69

Figura 5 – Hidrólise do ADP e ATP pela E-NTPDase em linfócitos.....72

Figura 6 – Atividade da E-ADA em linfócitos74

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1: Análise fitoquímica, dosagens de fenólicos, taninos e flavonoides e avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica do extrato das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*.

Tabela 1 – Bactérias utilizadas para os ensaios de ação antibacteriana.	31
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos estabelecidos para o controle de qualidade do extrato das folhas de <i>C. zeylanicum</i>	33
Tabela 3 – Resultado da análise fitoquímica do extrato das folhas de <i>Cinnamomum zeylanicum</i>	35
Tabela 4 – Teores de flavonoides, polifenóis e taninos nos extratos bruto de <i>C. zeylanicum</i>	38
Tabela 5 – Valores de concentração efetiva e índice de atividade antioxidante de extratos de <i>C. zeylanicum</i>	41
Tabela 6 – Concentração Microbicida Mínima (CIM) do extrato de <i>C. zeylanicum</i>	42

MANUSCRITO 2: Análise fitoquímica por HPLC-DAD e Desenvolvimento de formulação Creme-gel contendo extrato *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela): Avaliação em modelo experimental de dermatite de contato.

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa dos creme-gel para a avaliação da eficácia <i>in vivo</i> em modelo de dermatite de contato	62
Tabela 2 – Características organolépticas e valores de Ph das formulações semi-sólidas em estudo (n=3)	68
Tabela 3 – Resultados da Viscosidade das formulações semissólidas em estudo.....	70
Tabela 4 – Resultados da espalhabilidade das formulações semissólidas em estudo.	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	PLANTAS MEDICINAIS	15
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS	17
3.3	FORMULAÇÕES CONTENDO SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA APLICAÇÃO TÓPICA.....	19
3.4	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	21
4	MANUSCRITOS	24
4.1	MANUSCRITO I – ANÁLISE FITOQUÍMICA, DOSAGENS DE FENÓLICOS, TANINOS E FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIGENOTÓXICA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE <i>Cinnamomum zeylanicum</i>.	25
	RESUMO	25
	1 INTRODUÇÃO.....	26
	2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
	2.1 Coleta do material vegetal	27
	2.2 Obtenção do extrato.....	27
	2.3 Parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal	28
	2.4 Análise fitoquímica	28
	2.5 Doseamento de fenólicos, flavonoides e taninos.....	28
	2.6 Determinação do potencial antioxidante	29
	2.6.1 Atividade antioxidante em CCD	29
	2.6.2 Eficiência antioxidante por espectrofotometria.....	29
	2.7 Atividade antimicrobiana	30
	2.8 Atividade antigenotóxica.....	31
	2.8.1 Preparação da cultura celular de Linfócitos:	31
	2.8.2 Tratamentos das Culturas	31
	2.8.3 Avaliação de parâmetros anti-genotóxicos do extrato em culturas de leucócitos humanos	31
	2.8.3.1 Proliferação celular e a inviabilidade	32
	2.8.3.2 Ensaio cometa.....	32
	2.8.3.3 Formação dos micronúcleos	32
	2.9 Análise estatística	33
	3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
	3.1 Parâmetros físico-químicos de controle de qualidade da droga vegetal	33
	3.2 Análise fitoquímica	34
	3.3 Doseamento de fenólicos, flavonoides e taninos.....	36
	3.4 Potencial Antioxidante	38
	3.4.1 Potencial antioxidante por CCD.....	38
	3.4.2 Potencial antioxidante por espectrofotometria	40
	3.5 Atividade Antimicrobiana	42
	3.6 Atividade antigenotóxica.....	44

	3.6.1 Avaliação de parâmetros antigenotóxicos do extrato em culturas de leucócitos humanos	44
	4 CONCLUSÃO.....	47
	5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
4.2	MANUSCRITO II – Análise fitoquímica por HPLC-DAD e Desenvolvimento de formulação Creme-gel contendo extrato <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume (Canela): Avaliação em modelo experimental de dermatite de contato.....	56
	RESUMO	57
	1 INTRODUÇÃO.....	58
	2 MATERIAL E MÉTODO.....	59
	2.1 Coleta do material vegetal.....	59
	2.2 Obtenção do extrato.....	60
	2.3 Condições Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	60
	2.4 Preparação da formulação Creme-gel	61
	2.5 Caracterização físico-química do creme-gel	62
	2.6 Avaliação da eficácia <i>in vivo</i>	63
	2.6.1 Indução de dermatite de contato e tratamento.....	63
	2.6.2 Atividade das ecto-enzimas E-NTPDase e E-ADA	63
	2.6.2.1 Isolamento de células mononucleares ricas em linfócitos.....	63
	2.6.2.2 Determinação de proteína.....	64
	2.6.2.3 Atividade da E-NTPDase	64
	2.6.2.4 Atividade da E-ADA	64
	3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
	3.1 Obtenção do extrato.....	65
	3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	65
	3.3 Caracterização físico-química do creme-gel	67
	3.3.1 Determinação das características organolépticas e pH das formulações semissólidas.....	67
	3.3.2 Avaliação da viscosidade das formulações semissólidas	69
	3.3.3 Avaliação da espalhabilidade das formulações semissólidas.....	70
	3.4 Determinação das atividades das E-NTPDase e da E-ADA	71
	4 CONCLUSÃO.....	74
	5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
5	DISCUSSÃO GERAL.....	79
6	CONCLUSÕES	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA	86

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais no Brasil é uma prática comum resultante da forte influência cultural dos indígenas locais miscigenadas, das tradições africanas, oriundas de três séculos de tráfico escravo, e da cultura europeia, trazida pelos colonizadores. A construção da terapia alternativa de cura se deve ao fato da articulação entre os conhecimentos dos indígenas, jesuítas e fazendeiros, que contribuiu para o surgimento de uma bagagem de usos acerca das plantas e suas bases medicinais, que resistiram até a atualidade (MAIOLI et al., 2007; SILVA et al., 2013).

As plantas medicinais constituem fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico que são usadas para o tratamento de várias doenças na medicina popular. A avaliação dos efeitos farmacológicos dessas substâncias tem sido amplamente explorada a fim de descobrir novos fármacos de origem vegetal e também como uma possível alternativa terapêutica a fármacos que possuem importantes efeitos adversos quando administrados (PATWARDHAN et al., 2004; SAMY et al., 2008).

A avaliação da atividade biológica de uma planta inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de extratos brutos ou de substâncias isoladas dessas plantas (ROYER et al., 2013). Mas para obterem reconhecimento como medicinais, é necessário que a autenticidade, a integridade e pureza desses extratos ou substâncias sejam comprovadas. Estudos que comprovem a eficácia dos mesmos são escassos e a utilização de produtos naturais na criação animal ainda é pouco explorada (CATALAN et al., 2012). Entretanto, a ciência moderna tem levado em conta os saberes populares, na busca da comprovação da eficácia dos fitoterápicos, para que sejam comercializados e utilizados de maneira segura (MACHADO, 2008).

As plantas produzem compostos químicos como parte de suas atividades metabólicas normais. Esses compostos são os metabólitos primários, como açúcar e lipídios, encontrados em todas as plantas, e em metabólitos secundários, encontrados apenas em algumas plantas, sendo compostos não essenciais ao seu funcionamento básico, mas que melhoram suas chances de reprodução e/ou sobrevivência contra predadores. Os metabólitos secundários, ao mesmo tempo em que são tóxicos aos predadores da planta, por exemplo, têm efeitos benéficos quando usados para tratar doenças humanas. Tais compostos são bastante variáveis em estrutura, sendo a maioria, substâncias aromáticas.

Os fitoterápicos podem ser mais eficientes que os medicamentos produzidos a partir da síntese química, mas para alcançar essa eficiência a produção dos mesmos devem seguir

estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, e de desenvolvimento de metodologias analíticas. A qualidade dos fitoterápicos vai além de um laudo de análise da matéria-prima vegetal, sendo considerada a estrutura da produção e a adoção de boas práticas de fabricação e de garantia de qualidade das plantas um requisito primordial na obtenção de matérias-primas vegetais e fitomedicamentos de qualidade (KLEIN et al., 2009).

Cinnamomum zeylanicum Blume, conhecida como “canela da-índia” e “canela-do-ceilão” é originária do Sri Lanka e do sudoeste da Índia. O gênero *Cinnamomum* pertence à família Lauraceae é constituído por aproximadamente 350 espécies (LORENZI; MATOS, 2002). Apresenta odor suave e sabor adocicado levemente picante, usada na perfumaria, na culinária, como corretivo de odores e sabores. O óleo essencial da casca é rico em aldeído cinâmico e das folhas em eugenol usado na preparação de medicamentos (LIMA et al., 2005).

Cinnamomum zeylanicum Blume, tem sido utilizada principalmente na medicina popular devido às propriedades antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante. Ainda são sugeridos benefícios cardiovasculares através da redução dos níveis sanguíneos de glicose, do colesterol sérico e da pressão sanguínea (RANASINGHE et al., 2013). O uso da casca da planta é indicado como aperiente, antidiarréico, antiflatulento e antiespasmódico (BRASIL, 2011). Ao extrato das folhas são descritas atividades antioxidante, antibiótica e antifúngica (WANG; WANG; YIH, 2008; DIAS, 2009; RANASINGHE et al., 2013). Quase todas as partes da planta têm algum uso culinário ou medicinal. A composição do óleo essencial varia consideravelmente em composição química, assim como em efeitos farmacológicos, conforme a parte da planta que é utilizada. Na raiz o principal constituinte é a cânfora, nas folhas, eugenol e na casca, cinamaldeído (RANASINGHE et al., 2013).

Desse modo confere este trabalho realizar outros estudo da espécie *C. zeylanicum* sendo de grande relevância, tendo em vista a sua composição de substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêutica para prevenção e manejo de doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal é estudar fitoquimicamente a espécie *Cinnamomum zeylanicum* bem como avaliar alguns de seus efeitos biológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer parâmetros físico-químicos de controle de qualidade de *C. zeylanicum*;
- Obter o extrato bruto das folhas de *C. zeylanicum* para realizar os bioensaios e identificar metabólitos com função terapêutica;
- Avaliar o perfil fitoquímico do extrato de *C. zeylanicum*, quantificando os níveis de polifenóis, flavonoides, e taninos;
- Análisar os compostos fitoquímicos por CLAE;
- Avaliar *in vitro* os efeitos antioxidantes do extrato de *C. zeylanicum*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *C. zeylanicum* pelo método *in vitro*;
- Determinar os efeitos do extrato de *C. zeylanicum* sobre parâmetros protetores genotoxicológicos em culturas de leucócitos humanos;
- Preparar, caracterizar e avaliar a formulação semissólida gel-creme-gel base e as contendo o extrato de *C. zeylanicum* nas concentrações 5%, 10% e 15%;
- Avaliar a eficácia da formulação semissólida contendo o extrato de *C. zeylanicum* nas concentrações 5%, 10% e 15% em modelo experimental de dermatite de contato e verificar a atividade da NTPDase.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são definidas como aquelas capazes de possuir princípios ativos com potencial terapêutico para o tratamento de diversas patologias de extrema importância para a recuperação e manutenção da saúde (LIMA; 2012). No Brasil, as plantas são utilizadas por aproximadamente 91% da população sendo que 46% da mesma mantêm o cultivo caseiro dessas plantas (ETHUR, 2011; VEIGA JUNIOR, 2008; LIMA; LIMA; DONAZZOLO, 2007).

O uso de plantas medicinais para tratamento de várias doenças é oficialmente reconhecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1978 (OZAKI; DUARTE, 2006). Além disso, de acordo com a OMS, há a necessidade de valorizar o uso de medicamentos à base de plantas sendo que cerca de 70 % da população mundial depende das plantas medicinais como umas das principais formas de acesso aos cuidados básicos de saúde. (BRASIL, 2013b).

Assim como outras terapias, as plantas medicinais fazem parte da chamada Medicina Tradicional, a qual se refere a conhecimentos, habilidades e práticas baseadas na teoria, crenças, experiências indígenas e de outras culturas. Essas terapias são usadas pela população na manutenção da saúde e na prevenção, na melhoria ou no tratamento de doenças físicas e mentais, podendo ainda ser chamada de Medicina Alternativa ou Complementar (BRASIL, 2012).

Segundo Oliveira e Menini (2012), o estudo de plantas medicinais, a partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações importantes para a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos sobre as espécies vegetais. Desta forma, pode-se planejar a pesquisa a partir do conhecimento empírico já existente, muitas vezes, consagrado pelo uso contínuo, que deve ter suas ações comprovadas cientificamente. Além disso, é importante validar a eficiência e garantir a segurança do uso das plantas medicinais, e, por isso, devem-se realizar estudos científicos e clínicos a fim de se obter documentações técnicas e validadas em compêndios oficiais ou publicações indexadas (BRASIL, 2012).

Com a realização desses estudos foi possível obter comercialmente vários fármacos, como, por exemplo, o anticancerígeno paclitaxel, o analgésico morfina e o antibacteriano daptomicina. Morrison e Hergenrother (2013) relataram que desde 1960 até 2010, os produtos

naturais ou derivados semissintéticos de produtos naturais serviram como fonte de 41% dos medicamentos anticancerígenos e 65% dos antibacterianos.

Para a realização de pesquisas com plantas medicinais pode-se ter o envolvimento de várias etapas, como: investigações da medicina tradicional e popular (etnofarmacológico), isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica, fitoquímica), investigações farmacológicas de extratos vegetais e constituintes químicos isolados (farmacologia), transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética), estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e o desenvolvimento de formulações para a produção de fitoterápicos (MACIEL et al., 2002).

Com a realização de alguns estudos citados anteriormente é possível obter um produto terapêutico originário de uma planta medicinal ou de seus derivados, exceto a partir de substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa (PNPIC, 2006). Esse produto é denominado de fitoterápico, sendo que a terapia realizada a partir da utilização de plantas medicinais em suas diferentes preparações, mas não constituídas de suas substâncias isoladas, é caracterizada como fitoterapia.

No Brasil, a utilização dos produtos naturais a partir da fitoterapia vem se adequando às necessidades do atendimento primário de saúde (ELDIN; DUNFORD, 2001). Isso é devido à expansão da fitoterapia de uma forma geral, explicado, muitas vezes, pela preferência dos consumidores por tratamentos mais “naturais”. Além disso, houve o desenvolvimento de novos métodos analíticos para se obter o controle de qualidade e a crescente avaliação das propriedades farmacológicas das substâncias existentes nas espécies vegetais bem como o desenvolvimento de formas de apresentações dos produtos e o reduzido custo quando se tem produtos de origem vegetal (HOMAR, 2007).

As propriedades farmacológicas de interesse das plantas são resultantes de sua composição principalmente devido a sua diversidade molecular e, por isso, tem estimulado a busca pelo conhecimento do seu metabolismo secundário, que é responsável pela síntese dos compostos vegetais dentre os quais são responsáveis, muitas vezes, pelas propriedades medicinais, aromáticas e curativas (ALVES, 2001). Algumas pesquisas têm mostrado prescrições médicas contendo produtos naturais e drogas relacionadas e que são usadas para tratar aproximadamente 87% de todas as doenças humanas (CHIN et al., 2006). Além disso, os metabólitos isolados podem servir como ponto de partida (protótipos) para síntese de novas substâncias através da química sintética moderna (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Compostos secundários presentes no extrato bruto ou óleo essencial de plantas medicinais podem desempenhar funções importantes em interações planta-patógeno, através da ação farmacológica direta (MELLO et al., 2006; FRANZENER et al., 2007; SILVA et al., 2008), ou indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas que venham a ser tratada com estes compostos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN, 2005). Com isso, substâncias são sintetizadas no metabolismo secundário das plantas podendo apresentar ação biológica diretamente contra patógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2003).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS

As plantas medicinais normalmente contêm uma mistura de compostos químicos que podem agir individualmente, de forma aditiva ou de forma sinérgica para curar, por exemplo, uma enfermidade. Em uma planta é possível encontrar substâncias que podem auxiliar na digestão, compostos com ação anti-inflamatória que minimizam o inchaço e a dor, compostos com atividade antibactericida que agem como antibióticos naturais, podendo apresentar ação antioxidante, entre outros (EINBOND et al., 2004; SLOWING; CARRETERO; VILLAR, 1994; LOCHER et al., 1995).

Com relação à composição das plantas, os metabólitos primários, por definição, são macromoléculas que se encontram na maioria das células vegetais e são necessários para a vida da planta como os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucleicos, responsáveis pela sobrevivência do vegetal e que participam dos processos de fotossíntese, respiração e assimilação dos nutrientes. Ainda sobre os constituintes de uma planta, os metabólitos secundários ou micromoléculas são importantes para a sobrevivência e a perpetuação das plantas em seu ecossistema, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, sendo entre outros, os compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcaloides. Esses compostos, segundo estudos realizados, são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas, estando intimamente associados à estratégia de defesa dos vegetais (SIMÕES et al., 2010).

Alguns fatores são diretamente condicionantes para a produção dos metabólitos secundários, bem como aos teores de princípios ativos que podem ser variáveis e estarem distribuídos de forma heterogênea na planta, influenciando, conseqüentemente na concentração e nas propriedades do produto vegetal. Neste sentido, diversos fatores que influenciam sua variabilidade precisam ser computados, dentre os quais se ressaltam os seguintes: localização geográfica e sazonalidade, como estação do ano, fotoperíodo (tempo e

intensidade luminosa), temperatura, umidade, altitude, latitude, condições do solo (nutrientes e tipo de solo), além do período do dia da coleta (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010; HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

No reino Plantae, a produção de metabólitos secundários promove adaptações evolutivas e exerce funções de proteção da espécie e, paralelamente, são estes que são utilizados para restabelecimento e promoção da saúde do ser humano (JIRSCHITZKA et al., 2012). Devido a isso, são atribuídas aos metabólitos secundários bioatividades como antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana, propriedades propiciadas pelos vários fitoquímicos como compostos fenólicos, destacando-se os flavonoides, alcaloides, taninos, terpenos (DEWICK, 2002; BAG et al., 2012; JYOTHI; SESHAGIRI, 2012) e também lectinas (COWAN, 1999). A ação antiinflamatória e cicatrizante das plantas estão amplamente relacionadas aos taninos e flavonóides (ONWUKAEME, 1995; HOSSEINZADEH; YOUNESI, 2002; MANGA et al., 2004; RANE; MENGI, 2003; SALA et al., 2003; ASONGALEM et al., 2004).

Os alcalóides são substâncias de natureza alcalina que possuem um nitrogênio heterocíclico em sua composição. São encontrados em representantes de todos os grupos vegetais, sendo sua maior ocorrência em Angiospermas. Essas substâncias possuem diversas funções. Nos vegetais eles atuam como defesas contra microorganismos e predadores e como protetores contra raios UV. No setor industrial, são reproduzidos a partir de moléculas pré-descobertas, como repelentes para herbívoros, devido a seu gosto amargo; como anticolinérgicos (escopolamina), diuréticos (teofilina), antitumorais (vincristina), antitussígenos (codeína) (SIMÓES, 2010).

Os taninos são substâncias secundárias, responsáveis pela adstringência dos vegetais, apresentando massa molecular entre cerca de 500 e 3000 Dalton e são solúveis em água. São classificados tradicionalmente em: taninos hidrolisáveis, encontrados em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas; e taninos condensados que ocorrem mais amplamente em gimnospermas e angiospermas (SANTOS; MELO, 2004). Eles atuam como captadores de radicais livres, e tem atividades antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anti-diarréica e antiséptica (MONTEIRO et al., 2006a). Apresentam também a habilidade de se ligarem a proteínas precipitando as mesmas, oferecendo defesa a planta contra a herbivoria por dificultar a digestão dos animais (MCSWEENEY, 2001; GURIB-FAKIM, 2006).

Os terpenos são substâncias cuja origem biosintética deriva de unidades do isopreno (BRUNETON, 1995). Os esqueletos dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades isoprênicas. Logo, unidades isoprênicas podem dar origem a

mono e sesquiterpenos, formados por duas e três unidades de isopreno, respectivamente. Diterpenos são originários da junção de quatro cadeias isoprênicas e os triterpenos são derivados de um composto alifático de 30 carbonos, esqualeno, que dá origem aos diferentes grupos desses compostos, tais como a β -amirina e o β -sitosterol (PETIT; DIAS, 1969).

Entre os metabólitos secundários, sobressaem-se os flavonoides, sendo as chalconas as precursoras desta ampla classe de substâncias de origem vegetal com importantes propriedades farmacológicas (BASILE et al., 2000; CUSHNIE; LAMB, 2005). São estruturas onipresentes, comumente encontradas em vinho, própolis, sementes, nozes, frutas e vegetais (BOIK, 2001; SIMÕES et al., 2010; CUSHNIE; LAMB, 2005; SAVOIA, 2012). Alguns exemplos de flavonoides são as catequinas provenientes de *Camellia sinensis L.*, os quais possuem propriedades antitumoral (BOIK, 2001), anti-inflamatória e antiplaquetária, apresentando relevantes benefícios para o sistema cardiovascular (DEWICK, 2002; SIMÕES et al., 2010). Estes compostos fenólicos têm potente capacidade de eliminar radicais livres (COOK; SAMMAN, 1996; MANDALARI et al., 2007), além de apresentarem atividades analgésica, antialérgica e antimicrobiana, de regeneração de cartilagens e ossos (ORHAN et al., 2010; SUGAMOTO et al., 2011) e moduladora do sistema imune (MACHADO et al., 2008). Os potenciais benefícios à saúde propiciados pelos flavonoides também estão associados com a compatibilidade com o meio biótico (CLARDY; WALSH, 2004).

Outra atividade relacionada aos flavonóides é sua ação antioxidante devido à presença de hidroxilas aromáticas (VESSALA et al., 2003). Alguns flavonóides como rutina e quercetina, têm mostrado melhores atividades antioxidantes do que o ácido ascórbico que é considerado um potente redutor (SOARES et al., 2005). A ação antioxidante está também relacionada à inibição do óxido nítrico que pode contribuir para as atividades imunoreguladoras e antiinflamatórias encontradas nas plantas (KIM et al., 1999).

3.3 FORMULAÇÕES CONTENDO SUBSTÂNCIAS NATURAIS PARA APLICAÇÃO TÓPICA

Diante das importantes propriedades farmacológicas já verificadas a partir das plantas, o interesse do mercado nacional por novos medicamentos e inovação tem intensificado a fim de se obter formas farmacêuticas fitoterápicas, incluindo as de uso tópico.

Dentre os fitoterápicos com aplicação tópica são citadas na literatura géis contendo *Aloe barbadensis* para tratamento de acne, *Calêndula officinalis* formulação de gel e pomada para tratar processos inflamatórios e de cicatrização (MACHADO et al., 2010; ROVERONI-

FAVARETTO; LODI; ALMEIDA, 2009). Géis e cremes foram desenvolvidos com *Curcuma longa* ou com *Hamamelis virginiana* para tratar prurido, dermatite, inflamação e acne; *Cordea verbenaceae* para o tratamento de inflamações (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012). Também foram estudados géis contendo *Sechium edule* para a avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica (ORDÓÑEZ et al., 2009). Além disso, *Symphytum officinale* foi verificado para o tratamento de osteoartrite a partir de cremes (SMITH; JACOBSON, 2011).

Independentemente da forma farmacêutica a ser testada há sempre uma preocupação com o controle de qualidade e a garantia de segurança e eficácia dos fitoterápicos pretendidos (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012). Nesse sentido, a obtenção de formas farmacêuticas derivadas de matéria-prima vegetal necessita de um planejamento inicial, com a finalidade de planejar o manejo adequado da matéria-prima vegetal e demais excipientes de acordo com as especificações dos mesmos, além da determinação sequencial das ações de transformação tecnológica e monitoramento dos pontos e metodologias de controle de qualidade mais apropriadas segundo as legislações e normatizações vigentes, para o desenvolvimento de fitoterápicos (TOLEDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

Além disso, no caso de fitoterápicos, a escolha apropriada da forma farmacêutica e da via de administração requer considerações prévias a cerca da eficácia e segurança do marcador químico ativo presente na planta medicinal ou derivado intermediário, de modo que, durante a transformação do material vegetal em um produto tecnicamente elaborado, o fitoterápico, a qualidade seja assegurada pela preservação da integridade química e farmacológica do(s) marcador (es) químico(s) da planta, garantindo a constância de sua ação biológica e a segurança de sua utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico (TOLEDO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007; FERREIRA; LEITE, 2008).

A partir disso é importante realizar o desenvolvimento de novos medicamentos com atividade terapêutica a partir de substâncias naturais visto que esses produtos de plantas em sua maioria genuinamente nacionais apresentam além da eficácia, também, segurança e que por isso devem ser amplamente estudados. A exemplo a espécie *Cinnamomum zeylanicum* composta por um grande grupo de substâncias química e que pode ser uma fonte promissora de matéria-prima vegetal para um fitoterápico. Dessa forma, faz-se necessário o entendimento desses compostos, pois é a partir deles que é obtida grande parte das atividades farmacológicas atribuídas ao gênero *Cinnamomum*.

3.4 *Cinnamomum zeylanicum* Blume

O gênero *Cinnamomum*, pertencente à família Lauraceae, compreende cerca de 250 espécies distribuídas na Índia, China, Sri Lanka e Austrália, sendo conhecidas popularmente pelo nome de canela. É cultivada também em países tropicais da América do sul, como o Brasil, onde as maiores plantações encontram-se nas regiões Sul e Sudeste (CASTRO, 2010). É uma árvore que apresenta aproximadamente 15 m de altura, composta por folhas com formato oval-longo que são utilizadas extensivamente como especiarias em alimentos ou para produzir óleos essenciais, apresentando um sabor picante que exala um odor característico quando esmagadas e flores com coloração esverdeada.

Cinnamomum zeylanicum composto majoritariamente pelo cinamaldeído bem como β -cariofileno, linalol e outros terpenos. Cinamaldeído é o principal constituinte do óleo essencial extraído das casca de canela e fornece o odor e sabor característico da espécie, sendo utilizada como aditivos alimentares e aromatizadores dos alimentos, fazendo parte da lista da Food and Drug Administration como "Generally Recognized as Safe-GRAS que designa compostos seguros para seu uso e que não apresentam efeitos potencialmente adversos à saúde humana. (RANASINGHE et al., 2013). Com relação aos compostos são encontrados na folha, o acetato de cinamila, o eugenol, e anetol. Na raiz, o principal constituinte é a cânfora, sendo que na casca, o cinamaldeído é o principal da espécie (JANTAN et al., 2002; JANTAN et al., 2004).

C. zeylanicum, canela-do-ceilão como é conhecido também, possui sinonímia de *Cinnamomum verum*. A sua casca quando seca contém 1,2% de óleo volátil, sendo 60% constituído pelo cinamaldeído. Esse óleo possui aroma característico de aldeído cinâmico e sabor picante e adocicado. A *Cinnamomum cassia*, canela-da-china é menos aromático que a canela do ceilão e possui aroma característico de mucilagem, seu sabor é levemente adocicado. Com relação à casca quando seca contém 1% de óleo volátil, constituído de 70% a 90% de *trans*-cinamaldeído (BRASIL, 2010).

Figura 1 – Aspecto geral de *Cinnamomum zeylanicum* Blume



Fonte: Autora.

C. zeylanicum apresenta a partir de sua composição química atividades farmacológicas como antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante. Ainda são atribuídos benefícios cardiovasculares devido à redução dos níveis sanguíneos de glicose, do colesterol sérico e da pressão sanguínea (RANASINGHE et al., 2013). O uso da casca dessa planta é indicado como aperiente, antidiarréico, antiflatulento e antiespasmódico (BRASIL, 2011). A partir do extrato das suas folhas são descritas atividades antioxidante, antibiótica e antifúngica. (WANG; WANG; YIH, 2008; DIAS, 2009; RANASINGHE et al., 2013).

Estudos realizados têm demonstrado efeitos de diferentes alimentos funcionais na Síndrome Metabólica (SM) e seus componentes (colesterol, triglicérides, glicose, pressão arterial, etc.) sendo a canela (*Cinnamomum* sp.) um destes alimentos. Isso é devido aos polifenóis encontrados na canela que podem melhorar os componentes da SM e reduzir os riscos de fatores associados com diabetes e doenças cardiovasculares. Experimentos em indivíduos com SM, Diabetes Mellitus (DM) tipo 2 e síndrome dos ovários policísticos, demonstram efeitos benéficos relacionados à glicose, insulina, lipídios e antioxidantes quando foi utilizado o extrato aquoso de canela. Além disso, efeitos na composição da massa corporal magra e na resposta inflamatória também foram verificados (ANDERSON, 2008).

Além disso, a partir do óleo volátil das cascas e folhas de *Cinnamomum verum* foi verificado a atividade antibacteriana frente às cepas de *E.coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Um estudo demonstrou

diferença quantitativa nos perfis inibitórios pelo óleo obtido pelas diferentes partes da planta, sendo o óleo da casca mais efetivo que o óleo volátil obtido das folhas. Isso pode ser explicado a partir da análise fitoquímica da composição do óleo que revela uma diferença qualitativa nos teores dos compostos, uma vez que, nas folhas, o eugenol (63%) apresenta-se como a substância majoritária, diferentemente do óleo das cascas que apresenta cinamaldeído (87%) (OUSSALAH et al., 2007).

Análises realizadas com o extrato das folhas de *Cinnamomum verum* demonstraram a capacidade antioxidante e a de eliminação de radicais livres. Isso foi observado em um estudo, em que a intensa atividade antioxidante frente a radicais livres, especialmente pelo método de DPPH (125 µg/3mL) e ABTS (concentrações acima de 75 µg/1,1 mL), resultou em um promissor uso frente a inibição da peroxidação lipídica em emulsões de ácido linoleico (MATHEW; ABRAHAM, 2006). Sendo assim, a canela, a qual é utilizada como um agente aromatizante em alimentos ou chá pode atuar, também, como um potente antioxidante, podendo ser utilizada em indivíduos que têm doenças relacionadas ao estresse oxidativo (RANJBAR et al., 2006).

Um estudo de revisão sobre plantas medicinais descreve *C. zeylanicum* como sendo uma espécie que foi e continua sendo de grande relevância, tendo em vista a sua composição de substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêutica para prevenção e manejo de doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes e devido a suas propriedades antioxidantes (RAHMATULLAH et al., 2009).

Nesse sentido, faz-se importante o conhecimento dos principais compostos, pois é a partir deles que é obtida grande parte das atividades farmacológicas atribuídas ao gênero *Cinnamomum*. Além disso, a realização de estudos *in vitro* e *in vivo* como métodos alternativos para avaliação biológica assegurando a eficácia e segurança para uso de formulações e medicamentos fitoterápicos contendo substâncias naturais como a canela (BARRY, 2004).

4 MANUSCRITOS

MANUSCRITO I

- Análise fitoquímica, dosagens de fenólicos, taninos e flavonoides e avaliação das atividades antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica do extrato das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*.

- Manuscrito a ser submetido à revista “**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**”.

MANUSCRITO II

- Análise fitoquímica por HPLC-DAD e Desenvolvimento de formulação Creme-gel contendo extrato de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela): Avaliação em modelo experimental de dermatite de contato.

- Manuscrito a ser submetido à revista “**Journal of Pharmacy and products**”.

4.1 MANUSCRITO I

ANÁLISE FITOQUÍMICA, DOSAGENS DE FENÓLICOS, TANINOS E FLAVONOIDES E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIGENOTÓXICA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Cinnamomum zeylanicum*.

COSSETIN, F. J.¹; COSSETIN, F. L.¹; MAZIERO, M.¹; CUELHO, C.¹; DORNELLES, R. C.¹; MANFRON, M. P.¹

1 Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*1476, Venâncio Aires Street, 1476 - apartment 409. ZIP CODE: 97015-190.

Neighborhood: City Centre. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

e-mail: jocelenecossetin@yahoo.com.br. Parents: Joselino Cossetin and Clarilene Fátima Filippin Cossetin.

RESUMO

Cinnamomum zeylanicum é uma espécie pertencente à família Lauraceae e é conhecida popularmente como canela sendo utilizada na medicina popular como antimicrobiano, antiparasitária, anti-inflamatório e antitérmico. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química e investigar as atividades antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica nas folhas desta espécie. Na caracterização físico-química, por meio de testes farmacopéicos foi utilizada droga vegetal seca e não houve variação significativa da amostra coletada. Na extração hidroetanólica (70%), o rendimento do extrato bruto (EB) foi de 22,94%. O EB das folhas de *C. zeylanicum* apresentou compostos do metabolismo secundário como alcalóides, saponinas, flavonoides, taninos e cumarinas. Por doseamento espectroscópico foram determinados polifenóis, flavonoides e taninos no EB. *C. zeylanicum* apresentou atividade antioxidante qualitativamente por CCD por apresentar manchas amarelas que caracterizam a atividade antioxidante do extrato e quantitativamente um valor de CE₅₀ e IAA de 12,88µg/mL e 15,91% pelo método DPPH. Além disso, a espécie apresentou, também, atividade antimicrobiana frente à *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* pelo método de microdiluição em caldo e atividade antígeno-tóxica analisadas em cultura de leucócitos humanos pelos teste de viabilidade e proliferação celular, ensaio cometa e frequência de micronúcleos. Nestes últimos testes, todas as concentrações CzE1 µg/mL e CzE10 µg/mL de extrato demonstraram que reverteram o dano genotóxico causado pelo peróxido de hidrogênio. Portanto, os parâmetros físico-químicos estabelecidos para *C. zeylanicum* possibilitam controle de qualidade da droga dessa espécie, e esta apresentou atividades, antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica.

Palavras-chave: Lauraceae. Controle físico-química. Extrato. Canela.

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico usado no tratamento de doenças. A avaliação dos efeitos farmacológicos pode ser usada como estratégia para descobrir novos fármacos de origem vegetal. Estas podem ser processadas e administradas de diversas formas, tais como, por exemplo, xaropes, infusões, óleos essenciais, pomadas, bálsamos, comprimidos ou cápsulas, sendo indicadas para ajudar a combater patologias crônicas e agudas, como, por exemplo, doenças cardiovasculares, inflamações ou problemas gástricos. Estas plantas são ricas em vários compostos, tais como, flavonóides, taninos, etc., sendo que muitos deles apresentam propriedades antioxidantes (BENZIE; WACHTEL, 2011).

Vários estudos têm evidenciado os potenciais antioxidantes e antimicrobianos de uma grande variedade de frutas e de vegetais (TAGURI et al., 2006; ASOLINI et al., 2006). O consumo frequente de frutas e vegetais tem sido associado à baixa incidência de doenças degenerativas, tais como câncer, doenças cardíacas, inflamatórias e do sistema imunológico, além de disfunções neurológicas e de cataratas. Esses fatos estão relacionados com a presença de vários compostos antioxidantes nas frutas e nos vegetais (TAGURI et al., 2006; ASOLINI et al., 2006).

Os antioxidantes têm como função impedir que os radicais livres danifiquem as células e os tecidos (FOGLIANO et al., 1999). Na indústria alimentícia, o uso de antioxidantes não é recente; no entanto, nota-se uma tendência em substituir antioxidantes artificiais por naturais (AMAROWICZ et al., 2004). As principais classes de antioxidantes que podem estar presentes naturalmente nos alimentos são os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos), carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e seus derivados (VELIOGLU et al., 1998; AMAROWICZ et al., 2004).

A atividade antibacteriana de vários polifenóis e extratos de plantas também foram avaliados em estudos farmacêuticos e em alimentos (TAGURI et al., 2006; AHN et al., 2007). Alguns compostos fenólicos tais como os de sálvia, alecrim, tomilho, lúpulo, coentro, cravo e manjeriço são conhecidos por possuírem efeitos antimicrobianos contra patógenos alimentares (AHN et al., 2007).

A OMS estima que 80% da população em países em vias de desenvolvimento utilize a medicina tradicional à base de plantas como fonte primária para tratar e controlar diferentes patologias (TAMAYO, 2006). Contudo, há que ter em conta que as plantas medicinais não podem ser utilizadas para o tratamento de todas as patologias e em qualquer paciente, e que

não estão isentas de efeitos secundários, nem de contraindicações e interações (FERREIRA; PINTO, 2010).

Cinnamomum zeylanicum Blume, conhecida popularmente como canela-da-Índia, espécie usada mundialmente na perfumaria e na culinária, como corretivo de odores e sabores, sendo seu óleo essencial usado na preparação de alguns medicamentos. Partes da planta (casca, frutos e folhas) apresentam propriedades estimulante, tônica, carminativa e antiespasmódica (ALMEIDA, 1993).

Na canela, a constituição química varia significativamente em relação às distintas partes da planta, a casca é rica em aldeído cinâmico e a folha é fonte de eugenol (KOKETSU et al., 1997). O eugenol foi citado em diversos trabalhos como inibidor do crescimento microbiano (FARIA et al., 2006; LEMOS et al., 2005; PEREIRA et al., 2004), apresentando interesse como matéria-prima em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e produtos farmacêuticos. Segundo Santurio e colaboradores (2007), o óleo essencial extraído da canela apresenta um potencial antimicrobiano significativo frente a bactérias e fungos.

Dentro deste contexto, a presente pesquisa experimental foi desenvolvida com objetivo preparar um extrato hidroalcoólico apartir das folhas de *C. zeylanicum*, visando determinar parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal e caracterizar os compostos químicos do metabolismo secundário. Como também Investigar a atividade antioxidante, antimicrobiana e antígeno-tóxica no extrato bruto de *C. zeylanicum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

Aproximadamente 600 g de folhas foram coletadas da espécie *C. zeylanicum* na cidade de Cruz Alta, na localidade de Capão Grande, Latitude -28° 45' 34" Sul e longitude 53° 32' 07" Oeste nos meses de junho e julho de 2013. Uma amostra está depositada no herbário do Departamento da Biologia (SMDB) UFSM sob-registro 16.750.

2.2 Obtenção do extrato

As folhas de *C. zeylanicum* foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de aproximadamente de 40°C e reduzido a pó, por meio de moinho de facas. O extrato hidroalcoólico (70%) das folhas foi obtido por maceração com renovação de solventes por um

período de 30 dias. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado. Calculou-se o rendimento total do extrato, de acordo com a fórmula (1):

$$Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Re = Rendimento total do extrato (%);

P_{ext} = Peso do extrato seco (g);

P_{folhas} = Peso das folhas secas moídas (g).

2.3 Parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal

O controle de qualidade da droga (material estranho, determinação de água, índice de intumescência, conteúdo total de cinza e cinza insolúvel em ácido) foi realizado em triplicata, de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010).

2.4 Análise fitoquímica

A avaliação fitoquímica preliminar foi analisada conforme Moreira (1979) e Costa (1982) com modificações por reações de caracterização de metabólitos secundários com reagentes específicos e por cromatografia em camada delgada (CCD). Foram cromatografadas em Sílica gel GF254 e eluídas com solventes específicos para cada grupo químico a serem identificados.

Para a caracterização dos grupos de metabólitos foi utilizado método específicos. Os alcalóides foram avaliados a partir de Reações de Wagner, Dragendorff; antraquinonas (heterosídeos livres e Antraquinônicos); flavonoides (Shinoda, Salkowski e teste de espuma); taninos (cloreto férrico e acetato de chumbo) e cumarinas (KOH/Solução alcóolica).

2.5 Doseamento de fenólicos, flavonoides e taninos.

O doseamento dos polifenóis foi determinado pelo método de Folin – Ciocalteu, conforme Chandra e Meija (2004) modificado, utilizando como padrão ácido gálico. As leituras das amostras foram feitas com espectrofotômetro Shimadzu UV 1021, a 730nm e em triplicata. A concentração de polifenóis foi determinada por interpolação da absorbância da

amostra com a curva de calibração obtida com o padrão e expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato vegetal. Os flavonoides foram dosados de acordo com Rio (1996) modificado, utilizando como padrão rutina. As leituras das amostras foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV1021, a 425 nm e em triplicata. Os taninos foram quantificados pelo método da vanilina 4% em solução metanólica de ácido clorídrico, utilizando como padrão catequina conforme Agostini-Costa e colaboradores (1999). As leituras das amostras, em triplicata, foram realizadas em espectrofotômetro Shimadzu UV1021, a 490 nm. A concentração de taninos foi determinada por interpolação da absorbância da amostra com a curva de calibração obtida com o padrão e expressos em miligramas de equivalentes de catequina por grama de extrato vegetal.

2.6 Determinação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante foi avaliado *in vitro* frente ao radical livre 1, 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), por CCD (qualitativamente) e por espectrofotometria (quantitativamente).

2.6.1 Atividade antioxidante em CCD

A atividade antioxidante de *C. zeylanicum* foi avaliada a partir da aplicação do extrato em cromatoplasas de alumínio (Sílica gel GF₂₅₄) e eluidas em sistema de eluente (Clorofórmio: metanol; 8,5: 3,5). Como referência de atividade antioxidante foi empregado ácido cafeico, quercetina e rutina. Após a eluição e evaporação total do eluente, nebulizou-se a cromatoplasa com solução de DPPH 0,004% em metanol. A cromatoplasa foi armazenada no ambiente escuro por 30 min a temperatura ambiente e, após, fez-se a leitura, que é caracterizada pela formação de manchas amareladas comparáveis com as observadas pelo padrão (CHOI et al., 2002).

2.6.2 Eficiência antioxidante por espectrofotometria

O potencial antioxidante foi avaliado pelo método fotocolorimétrico do DPPH, de acordo com Choi e colaboradores (2002). Prepararam-se soluções do extrato, do DPPH e do padrão ácido ascórbico em etanol. As leituras das soluções foram feitas em triplicata em espectrofotômetro Shimadzu UV (518nm). A porcentagem de inibição do radical DPPH pelas amostras foi calculada de acordo com a equação (2):

$$AAO\% = 100 - [(Abs da amostra - Abs do branco) \times 100 / Abs. controle negativos.] \quad (2)$$

A concentração eficiente (CE_{50}) é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. A partir de uma curva (regressão), plotando-se na abscissa as concentrações da amostra e na ordenada, a proporção da atividade antioxidante (AAO%). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SIGMASTAT 2.0.

O índice de atividade antioxidante (IAA) foi calculado correlacionando-se a massa de DPPH ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) com CE_{50} ($\mu\text{g. mL}^{-1}$) conforme Equação (3):

$$IAA = [m_{DPPH} / CE_{50}] \text{ mDPPH: massa de DPPH e } CE_{50}: \text{ Concentração efetiva.} \quad (3)$$

2.7 Atividade antimicrobiana

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato utilizou-se o método de microdiluição em caldo de acordo como Clinical and Laboratory Standards CLSI M7A6 (2003) para bactérias. Os inóculo em solução salina 0,85% foram preparados pelo método espectrofotométrico, resultando em suspensão 5×10^5 UFC/mL para bactérias. Foram realizadas diluições seriadas nas concentrações de extrato 1.000 $\mu\text{g/ml}$ até 2mg/mL em dimetilsulfóxido no extrato bruto.

Os testes foram realizados em microplacas estéreis de poliestireno em meio ao caldo Muller-Hinton para bactérias. As cavidades das placas de microdiluição contendo 100 μL do extrato vegetal foram inoculadas com 100 μL de suspensão bacteriana. A cavidade do controle positivo continha 0,1 mL do inóculo e 0,1mL do meio, sem extrato. Os ensaios foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas por um período de 24h a 35-37°. Após o período de incubação, observou-se o crescimento microbiano indicado pelo aparecimento de turvação. Através deste método, determinou-se a menor concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento microbiano, chamada de concentração Inibitória Mínima (CIM).

A avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*, foi realizada com cepas ATCC e isolados clínicos obtidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) (tabela 1).

Tabela 1 – Bactérias utilizadas para os ensaios de ação antibacteriana.

Microrganismos	ATCC	GRAM
<i>Bacillus cereus</i>	14779	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> **	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> **	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	-
<i>Salmonella sp</i> **	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	-

** isolados clínicos obtidos no Hospital Universitário de Santa Maria.

2.8 Atividade antigenotóxica

2.8.1 Preparação da cultura celular de Linfócitos

As culturas de linfócitos foram preparadas utilizando 0,5 mL de sangue venoso (coletado de voluntários,) segundo o (protocolo do comitê de ética CEP/UFSM 23081.012330/2006-94) e imediatamente foi transferido para o meio de cultura contendo 10 mL de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, conforme descrito por (SANTOS-MONTAGNER et al., 2010). As células foram colocadas em estufa a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ por 72 horas.

2.8.2 Tratamentos das Culturas

Para avaliar perfis anti-genotóxicos, as culturas de leucócitos foram divididos em cinco grupos. Os grupos foram: um controle negativo (tampão de fosfato de pH 7,2); um controle positivo (Peróxido de hidrogênio 100 µg/mL); e os outros três grupos contendo o extrato de *C. zeylanicum* nas concentrações 1µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL.

2.8.3 Avaliação de parâmetros anti-genotóxicos do extrato em culturas de leucócitos humanos

Os parâmetros anti-genotóxicos foram avaliados pelas análises da Proliferação celular e a inviabilidade, teste cometa e a frequência de micronúcleos.

2.8.3.1 Proliferação celular e a inviabilidade

Os parâmetros a proliferação celular e a inviabilidade foram avaliados através da perda da integridade da membrana, utilizando o método do Azul de Tripam (BUROW et al., 1998). A amostra nas concentrações 1 μ /mL, 10 μ /mL e 100 μ /mL foi combinada com solução de Turk (ácido acético 3% mais de genciana violeta a 1% em água), e depois de três minutos, a amostra foi colocada em câmara de Neubauer. A diferenciação de células vivas e mortas foi observada pela coloração azul apresentada pelas células de mortas. Um total de 300 células foi contado e a quantidade de leucócitos totais (proliferação) conseguida por meio de contagem numa câmara de Neubauer.

2.8.3.2 Ensaio cometa

O teste cometa foi avaliado a partir de (SINGH, 1995). Após a incubação, as amostras (leucócitos) foram misturadas com agarose e colocados numa lâmina de microscópio pré-revestida com agarose em baixo ponto de fusão. As lâminas foram imersas numa solução de lise, e uma eletroforese foi realizada (20 min a 300 MA e 25 V). No final, as lâminas foram neutralizadas e deixadas para secar durante a noite à temperatura ambiente. As lâminas secas foram reidratadas e em seguida, fixadas por 10 min, e deixadas secar novamente. A última etapa foi à coloração e a utilização de solução de paragem. As lâminas foram analisadas sob condições cegas. Dano no DNA foi determinado como ADN índice de dano (DI). O dano foi calculado a partir de células em diferentes classes de danos (completamente intactas: 100 células \times 0 a máxima danificado - 100 células \times 4).

2.8.3.3 Formação dos micronúcleos

A análise dos micronúcleos foi realizada segundo a técnica descrita por Schmid (1975). Os linfócitos foram colocadas num tubo cónico com solução salina e centrifugadas em 1000 rpm durante 5 minutos. Um mililitro dessa solução de leucócitos foi espalhado sobre uma lâmina (duas por amostra) e deixados para secar em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas e depois analisadas sob microscopia óptica na lente de imersão (FENECH, 2000).

2.9 Análise estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias foi efetuada através do teste de Tuckey ($p \leq 0,05$), para dados não paramétrico foi utilizado o teste não paramétrico Kruscal-Wallis, utilizando-se programa estatístico BioEstat 5.3.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato seco obtido das folhas de *C. zeylanicum* apresentou um rendimento de 22,94%. Vasconcelos (2007) em seu estudo utilizou o mesmo solvente no extrato hidroalcoólico e obteve rendimento de 19% das folhas de *Cissus sicyoides*. Já Casoti (2012) obteve um rendimento de extrato bruto de 22,94% a partir da extração hidroalcoólica de *Dithecoctenium echinatum*. Desse modo, o rendimento dos extratos obtidos a partir das plantas varia de acordo com fatores relacionados com a planta e com os métodos de extração e líquidos extratores utilizados (DINIZ, 2000).

3.1 Parâmetros físico-químicos de controle de qualidade da droga vegetal

Os resultados das análises de controle de qualidade da droga vegetal (tabela2) foram realizados em triplicata, em conformidade com a Farmacopeia Brasileira (2010).

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos estabelecidos para o controle de qualidade do extrato das folhas de *C. zeylanicum*.

Parâmetros de qualidade	Matéria estranha (%)	Índice de intumescência (ml)	Teor de água (%)	Cinzas totais (%)	Cinzas Inso. Ácid (%)
Extrato C. Zeylanicum	0,02±0.1601	15,10± 0,1999	9,05 ± 0,1421	2,16 ± 0,4547	0,67± 0,5619

As drogas vegetais, quando não manipuladas adequadamente, podem apresentar material de origem diversa, como outras partes da planta ou mesmo restos de outros vegetais. De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) os limites preconizados para a presença de impurezas em drogas vegetais não pode exceder 2%. Foi possível observar que a droga qual apresentou 0,02% de matéria estranha, não excedendo o valor preconizado pela Farmacopéia, sugerindo que houve limpeza e separação adequada de espécies de plantas quando coletadas.

O índice de intumescência fornece os teores de mucilagem da droga, e em sua quantidade está diretamente relacionada com retenção de água. O valor encontrado em *C. zeylanicum* foi de 15,10 ml o que sugere a presença dessa substância, determinada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010).

O valor da quantidade de água que permaneceu na droga após a secagem da planta é um índice diretamente relacionado à sua conservação. O excesso de água em drogas permite a ação de enzimas, conseqüentemente a degradação dos constituintes químicos e podendo ocasionar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS et al., 2003; SIMÕES et al., 2010). O limite preconizado para a umidade em drogas vegetais esta entre 8 e 14% sendo apresentado por *C. zeylanicum* o valor de 9,05%, denotando estar dentro dos parâmetros farmacopéicos.

A determinação de cinzas totais envolve componentes da planta, e as presentes na superfície da droga. Sua porcentagem está relacionada com procedimentos de colheita e pós-colheita inadequadas, permitindo a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis como contaminante. A espécie *C. zeylanicum* apresentou 2,16% de cinzas totais, valor relativamente baixo o que denota cuidado na coleta e nos processos de secagem e armazenamento.

As cinzas insolúveis em ácido clorídrico de *C. zeylanicum* (0,67%) estão dentro dos teores aceitos pela Farmacopeia Brasileira (2010), até 1%. As cinzas insolúveis em ácido podem indicar contaminação ambiental ou presença de substâncias silicosas, areia e terra silícea ou contaminação.

3.2 Análise fitoquímica

O estudo preliminar da composição química do extrato da parte da planta permitiu a identificação das seguintes classes de compostos (tabela 3).

Tabela 3 – Resultado da análise fitoquímica do extrato das folhas de *Cinnamomum zeylanicum*.

Constituintes	Testes	Resultados
	Wagner	+++
Alcalóides	Dragendorff	++
	Livres	—
Antraquinonas	Heterosídeos	
	Antraquinônicos	—
Flavonóides	Shinoda	+++
Saponinas	Salkowski	+++
	Teste de espuma	+++
Taninos	Cloreto férrico	++
	Acetato de chumbo	++
Cumarinas	KOH/Sol. Alcoólica	+++

Análise química qualitativa dos extratos de *Cinnamomum zeylanicum*. Legenda: (+++) resultados fortemente positivos (++) resultados positivos (+) resultados fracamente positivos; e (-) resultados negativos.

De acordo com as análises da caracterização (tabela3) podemos sugerir que os flavonoides, saponinas, alcalóides e cumarinas apresentaram presença fortemente positiva. Os resultados encontrados foram semelhantes aos apresentados por outro trabalho em que avaliaram os extratos etanólico, aquoso frio e quente, com acetona e extratos metanólicos da casca de *C. zeylanicum*. Todos os extratos apresentaram alcalóides de esteróides e saponina. Flavonóides foram detectados no extrato com etanol, acetona e extrato aquoso frio (SINGH et al., 2014).

Os resultados dos testes fitoquímicos corroboram com outras espécies estudadas. Alguns autores relataram a presença de esteroides, taninos, compostos fenólicos e triterpenoides nos extratos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum* (SILVA et al., 2007; MEIER et al., 2014; SILVA; SOUSA; CHAVES, 2006; CHAVES; ALMEIDA; ROCHA, 2006). Sandabe e colaboradores (2006), no extrato aquoso do caule de *Ficus sycomorus*, constataram a presença de alcaloides, flavonoides, saponinas e taninos gálicos. Já para a raiz de *Urera baccifera* foram observados heterosídeos flavonoidicos, heterosídeos saponínicos, taninos e purinas mostrando que estes metabolitos podem ser caracterizados em diferentes espécies e servem para distingui-los com marcadores químicos (GINDRI et al., 2010).

De acordo com dados da literatura plantas ricas em taninos são empregadas na medicina no tratamento de reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas

estomacais, problemas renais, processos inflamatórios e diarreia. Já plantas ricas em flavonoides são responsáveis por ações antitumoral, anti-hemorragicos, hormonais, anti-inflamatórias, antimicrobianos e antioxidantes (HASLAM, 1996; DE BRUNYE et al., 1999; DUFRENSE; FARNWORH, 2001; TOSHIO et al., 2005; ZUANAZZI; MONTANHA, 2007). A atividade anti-inflamatória das folhas de muitas espécies de canela tem sido atribuída a uma série de taninos e a ação analgésica e antipirética aos compostos cumárico (SACHIN VETAL, 2013).

De acordo com Adwan et al. (2006) e Maciel et al. (2002), as plantas contêm inúmeros constituintes, e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas distintas que podem interagir contribuindo para a mesma atividade. A constituição química de espécies vegetais pode ser influenciada qualitativamente e quantitativamente por variações climáticas, com repercussão direta sobre a atividade biológica (NASCIMENTO et al., 2008).

3.3 Doseamento de fenólicos, flavonoides e taninos

Os teores totais de polifenóis, flavonóides e taninos para a amostra do extrato das folhas, de *C. zeylanicum* foram calculados usando-se a curva de calibração construída para o ácido gálico ($R^2 = 0,9972$), a quercetina ($R^2 = 0,9974$) e rutina ($R^2 = 0,9974$) respectivamente (figuras 1, 2, 3).

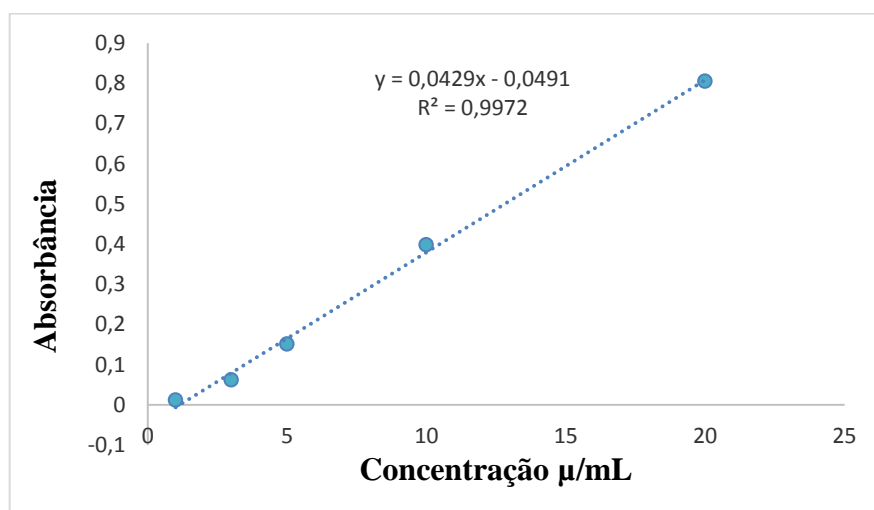


Figura 1 – Curva padrão do Ácido Gálico com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

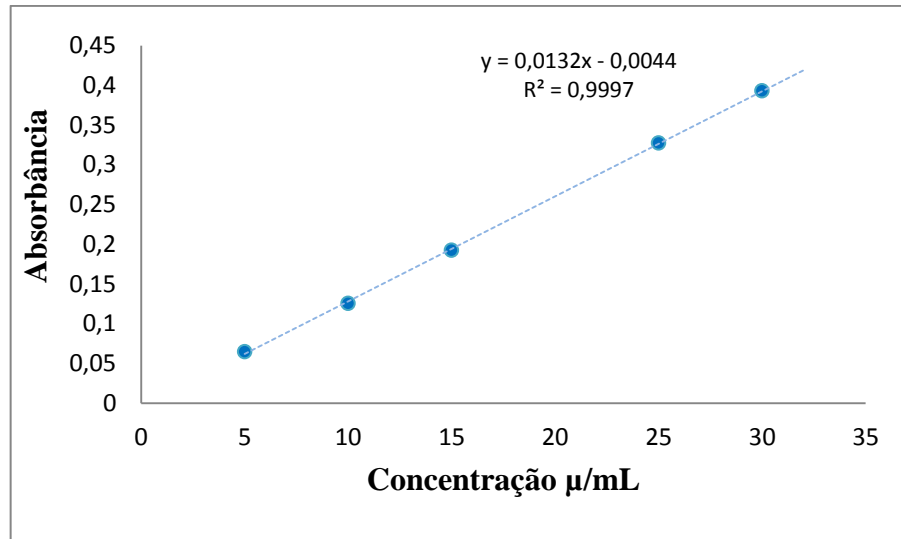


Figura 2 – Curva padrão da quercetina com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

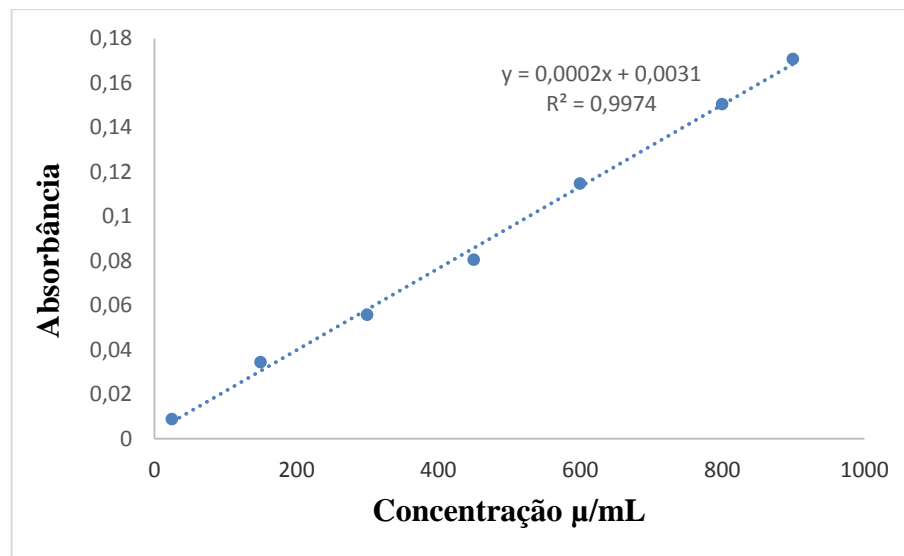


Figura 3 – Curva padrão da catequina com suas concentrações versus absorbâncias e respectiva equação da reta e coeficiente de correlação.

A análise fitoquímica, pela detecção de compostos de metabolismo secundário, nos extratos das folhas da canela revelou a presença de polifenóis, taninos e flavonóides. Os polifenóis e flavonoides dosados no extrato desta espécie foram superiores aos valores para taninos (tabela 4). O papel desempenhado pelos polifenóis como protetores contra diversas doenças degenerativas já é bem relatado na literatura, o que demonstra que *C. zeylanicum* tem potencial para novos estudos sobre suas atividades farmacológicas.

Tabela 4 – Teores de flavonoides, polifenóis e taninos nos extratos bruto de *C. zeylanicum*.

AMOSTRA (concentração)	Polifenóis mg/g ±DP	Flavonoides mg/g ±DP	Taninos mg/g ±DP
Extrato Bruto (0,004%)	80,65 ± 0,96	50,67 ± 1,47	35,20 ± 0,91

C. zeylanicum apresentou 80,65mg/g de polifenóis e 50,67 mg/g de flavonoides. Estas substâncias são conhecidas por apresentarem benefícios, devido ao seu poder antioxidante anticancerígeno, anti-inflamatório, anti-aterogênico, antitrombótico, antimicrobiano, vasodilatador e analgesia (WOLLGAST2 et al., 2000).

Os polifenóis são compostos do metabolismo secundário das plantas que desempenham várias funções, tais como proteger do ataque de patógenos ou herbívoros ou na pigmentação que ajuda a atrair os polinizadores, além de apresentar papel essencial na qualidade de fruto, tais como o desenvolvimento de cor, o sabor e na adstringência (CHAMKHA et al., 2003). A quantidade de polifenóis, presentes nos vegetais pode variar de acordo com a radiação solar, época do ano, períodos chuvosos ou não, radiação UV, o que pode ser justificado os altos teores encontrados na canela (MACHADO et al., 2008).

O óleo obtido das folhas de *C. zeylanicum* apresentou um dos melhores resultados quanto a capacidade oxidante dentre os 45 tipos de óleos analisados pelo método do DPPH além de elevado conteúdo de polifenóis (WANG; WANG; YIH, 2008).

3.4 Potencial Antioxidante

3.4.1 Potencial antioxidante por CCD

O potencial antioxidante pelo método do DPPH em cromatoplasmas de Sílica gel foi avaliado pela coloração desenvolvida após a exposição da amostra em solução de DPPH que possui uma coloração roxa intensa e pela ação antioxidante de uma amostra é progressivamente descoloração se tornando amarela ao final (figura 4).

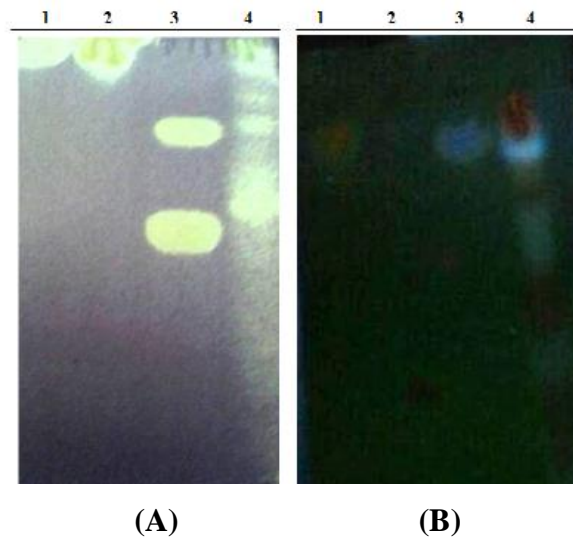


Figura 4 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH apresentadas pelas imagens luz Visível (A) e pela luz ultravioleta (B) das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* em cromatoplas. Fase móvel: Clorofórmio: metanol (8,5: 3,5)

Legenda: 1- Ácido caféico; 2- Quercetina; 3- Rutina; 4- EB.

O mesmo foi observado por Choi e colaboradores (2002) que avaliaram a atividade antioxidante de diferentes plantas e também observaram desenvolvimento de manchas amareladas demonstrando atividade antioxidante que possivelmente pode estar relacionado aos polifenóis e flavonoides presentes na espécie.

Outro estudo analisaram a atividade antioxidante preliminar qualitativa dos extratos por CCD em gel de sílica, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH. Os resultados sugeriram a existência de substâncias com atividade antioxidante do extrato etanólico de *Terminalia brasiliensis* (folha e casca), *Terminalia fagifolia* (folha), *Cenostigma macrophyllum* (folha), *Qualea grandiflora* (folha) e *Copernicia cerifera* (raiz), evidenciadas nas cromatoplas pela presença de manchas amarelas sobre fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH (SOUSA et al., 2007).

Balestrin e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antioxidante por cromatografia de camada delgada do extrato bruto e frações (hexano, clorofórmio e acetato de etila) de *Dorstenia multififormes*. Os resultados demonstraram que a fração clorofórmio apresentou atividade antioxidante relativa superior, quando comparada ao padrão de atividade antioxidante rutina testada.

3.4.2 Potencial antioxidante por espectrofotometria

A representação gráfica da concentração das amostras em relação à porcentagem de inibição permite o cálculo da CI_{50} . (figura 5).

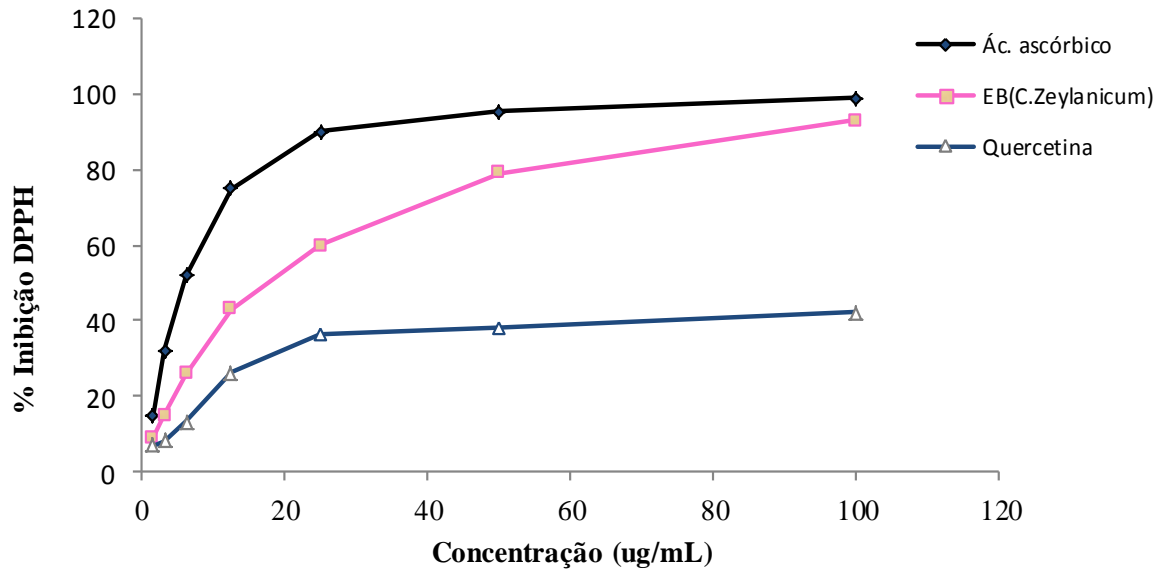


Figura 5 – Gráfico da inibição do ácido ascórbico e Quercetina do extrato da folha de *Cinnamomum Zeylanicum* nas diferentes concentrações de DPPH.

O DPPH é um radical livre estável que tem sido amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias puras (SOUSA et al., 2007; JUNG et al., 2008). O efeito de antioxidantes no sequestro do DPPH é devido a capacidade doadora de hidrogênio destas substâncias as quais são geralmente compostos fenólicos. No presente trabalho a maior concentração (100µ/mL) de extrato *C. zeylanicum* apresentou o percentual de inibição do DPPH de 92,99% já o ácido ascórbico, inibindo o radical livre DPPH em 98,99% e a quercetina 38,9%. Dessa forma, ao considerar os resultados verificou-se que o extrato apresenta um potencial antioxidante tão bom quanto o padrão já comercializado ácido ascórbico e melhor que a quercetina também já conhecida podendo ser um promissor antioxidante natural. Os flavonoides e outros compostos fenólicos presentes em plantas superiores são conhecidos por apresentarem potencial efeito antioxidante (OH et al., 2001; LIMA et al., 2006).

Os chás de boldo do Chile e Brasil apresentam pouca eficácia antioxidante, especialmente quando comparados à outros chás, tendo maior atividade o *Camelia sinensis* (chá verde), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Eugenia aromatica* (cravo), *Laurus nobilis* (louro) e *Camelia sinensis* (chá preto) (fermentada) (MORAIS et al., 2009).

Estudo desenvolvido demonstrou a capacidade antioxidante de pelo método de DPPH (125 µg/mL) do extrato metabólico das folhas de *Cinnamomum verum*. Neste estudo, foi observada intensa atividade frente a radicais livres. (MATHEW; ABRAHAM, 2006). Sendo assim, a canela, a qual é utilizada como um agente aromatizante em alimentos ou chá pode atuar como um potente antioxidante (RANJBAR et al., 2006).

Os resultados foram determinados às concentrações efetivas (CE50) e o Índice de Atividade Antioxidante (IAA), usando-se ácido ascórbico (AS) como referência (tabela 5).

Tabela 5 – Valores de concentração efetiva e índice de atividade antioxidante de extratos de *C. zeylanicum*.

Amostras	CE ₅₀ (µg/ml)	IAA (%)
C. Zeylanicum	12,88 ± 1,50	15,91
AS	9,95 ± 1,30	10,60

AS: ácido ascórbico, CE₅₀: Concentração efetiva, IAA: Índice de atividade antioxidante.

Segundo Reynertson et al. (2005) a intensidade da atividade antioxidante pode ser mensurada de acordo com a concentração eficiente (CE50) obtida utilizando os resultados de atividade antioxidante de diluições em série. O CE50 é a concentração de extrato necessária para reduzir 50% de radical DPPH e quanto menor o valor de CE50 maior é a atividade antioxidante. Extratos com valores de CE50 abaixo de 50 µg/ mL indicam elevada atividade antioxidante, de 50-100 µg/mL indicam moderada atividade, de 100-200 µg/ mL indicam baixa atividade e acima de 200 µg/ mL são considerados inativos (REYNERTSON et al., 2005). Desse modo, segundo avaliação da intensidade antioxidante sugeriu que o extrato das folhas de *C. zeylanicum* apresentou elevada atividade antioxidante similar ao ácido ascórbico.

Um estudo realizado testou a atividade antioxidante do extrato, frações e das substâncias puras de *Pseudopiptadenia contorta* e mostrou valores de CE50% bastante significativos. O extrato em acetona/ água (7:3) apresentou valor de CE50% semelhante ao da rutina, utilizada como padrão (14,40 ± 0,29 µg/mL e 12,90 ± 0,39 µg/mL, respectivamente). A fração 5, rica em taninos condensados, mostrou um alto poder antioxidante (CE50%= 8,74 ± 0,26 µg/mL). O flavonol composto purificado da fração 1 (myricetrina) mostrou um menor valor de CE50% do que os taninos condensados (7,67 ± 0,31 µg/ mL) (MOREIRA et al., 2002).

De acordo com a classificação do Índice de atividade antioxidante (IAA) é possível classificar a ação antioxidante como muito fraca (IAA < 0,5), fraca (IAA entre 0,5 e 1,0), moderada (IAA entre 1,0 a 2,0), forte (IAA entre 2,0 e 2,5) e muito forte (IAA > 2,5)

(SCHERER et al., 2009).O extrato da folha da canela demonstrou uma atividade antioxidante com IAA de 15,91%, muito forte.

Estudo realizado avaliou o Índice de Atividade Antioxidante (IAA) dos extratos etanólico de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. Os resultados apresentaram valores de IAA para ácido ascórbico (usado como referência) de 5,30; extrato de *P. arboreum* de 4,90, extrato de *P. dilatatum* de 3,20, respectivamente (SILVA et al., 2014).

Outro estudo utilizou este mesmo método para analisar a atividade antioxidante em extrato e frações de *Microlicia crenulata*. Os resultados revelaram que as frações hexânica e fração diclorometano FD $186,70 \pm 6,36$ $0,18 \pm 0,01$ e FH $496,70 \pm 38,88$ $0,07 \pm 0,01$ apresentaram um valor de CE50 muito alto e, conseqüentemente, um valor de IAA muito baixo e indicando fraca ação antioxidante. O extrato bruto (EB $15,39 \pm 0,04$ $2,23 \pm 0,01$) apresentou ação antioxidante muito forte (PEREIRA, 2013).

A canela contém compostos bioativos responsáveis pelo seu aroma e sabor como o cinamaldeído, cumarinas (TANAKA et al., 2008; WANG et al., 2013) e proantocianidinas, uma combinação de oligômeros e polímeros compostos por unidades de flavan-3-óis para as quais tem relatada a atividade antioxidante desta especiaria (ANDERSON et al., 2004; CAO et al., 2007).

3.5 Atividade Antimicrobiana

Atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *C. zeylanicum* analisado *in vitro* frente a cepas ATCC e isolados clínicos de bactérias está descrito na tabela 6.

Tabela 6 – Concentração Microbicida Mínima (CIM) do extrato de *C. zeylanicum*.

Microrganismos	Eritromicina	C. zeylanicum
<i>Bacillus cereus</i>	> 128	> 128
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 128	> 128
<i>Staphylococcus aureus</i>	> 128	64
<i>Staphylococcus epidermidis 102</i>	> 128	> 128
<i>Staphylococcus epidermidis 27</i>	> 128	> 128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 128	64
<i>Escherichia coli</i>	> 128	32
<i>Salamonella sp</i>	> 128	> 128
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	> 128	32

Os resultados foram interpretados de acordo com a classificação descrita por Cos et al. (2006), que considera que uma boa atividade para concentração inibitória mínima (CIM) para extratos >100 µg/mL e para compostos puros >25 µg/mL.

Conforme a (tabela 6) o extrato das folhas de *C. zeylanicum* apresentou maior atividade antibacteriana frente às bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae* 32 µg/mL. Para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentou 64 µg/mL de inibição no crescimento dos microrganismos. Segundo um estudo realizado, a atividade antibacteriana de *C. zeylanicum* apresentou uma inibição para as bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae* de 56 µg/mL, corroborando com os encontrados pelo nosso estudo de 32 µg/mL (MENDES et al., 2011).

C. zeylanicum é utilizada há muitos anos no tratamento de inflamações, diabetes, tosse, resfriados, distúrbios gastrointestinais, úlceras estomacais e também possui atividade antifúngica, antibacteriana, antiparasitária e larvicida (SAEED; TARIQ, 2008; LIMA et al., 2006). A canela tem demonstrado fortes resultados frente à *Staphilococcus aureus* meticiclina resistente (MANDAL et al., 2011). Além disso, estudos recentes revelou que a canela possui atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos e que quando utilizado em combinação com antibióticos demonstram potencial sinérgico favorável frente a bactérias multirresistentes (VOUKENG et al., 2012).

Em outro estudo realizou-se análise *in vitro* utilizando 28 extratos e óleos de plantas e alguns antibióticos na concentração 5% frente a bactérias Gram negativas, sendo que *C. zeylanicum* foi uma dessas plantas testadas e que apresentou atividade antimicrobiana (AL-MARIRI et al., 2014).

A atividade antimicrobiana de extratos e óleos vegetais deve-se a produtos do metabolismo secundário, flavonoides e saponinas, que isolados podem apresentar ação antimicrobiana. A diferença dos resultados de atividade antimicrobiana descritos na literatura sobre plantas pode estar relacionada com a quantidade de cada princípio ativo presente nos extratos, o uso de técnicas e procedimentos diferentes, bem como a época do ano da colheita do material (FERNANDES et al., 2011).

Dessa forma, os extratos de diversas plantas são conhecidos por produzir moléculas bioativas as quais reagem com outros organismos no ambiente e inibem o crescimento de bactérias e fungos. Isso porque a ampla variedade de metabólitos secundários, tais como taninos, terpenóides, cumarinas, alcaloides e flavonoides possuem atividade antimicrobiana *in vitro* (SHUKLA, 2011).

Além disso, alguns autores relatam que as formas de extração química de substâncias produzidas pela *C. zeylanicum* podem atuar na redução do crescimento de diversos

microrganismos (JHAM et al., 2005; VIEGAS et al., 2005). O cinamaldeído, oriundo de diferentes espécies vegetais foi bem relatado na literatura como antimicrobiano (FARIA et al., 2006; FILGUEIRAS; VANETTI, 2006; LEMOS et al., 2005).

3.6 Atividade antigenotóxica

3.6.1 Avaliação de parâmetros antigenotóxicos do extrato em culturas de leucócitos humanos

Foram avaliados os efeitos do peróxido de hidrogênio no extrato de *C. zeylanicum* em cultura de leucócitos humanos, avaliando parâmetros antigenotóxicos como: proliferação celular, inviabilidade celular, porcentagem de cromossomos anormais, índice de dano ao DNA e frequência de micronúcleos. Os resultados desses marcadores estão demonstrados na (figura 6).

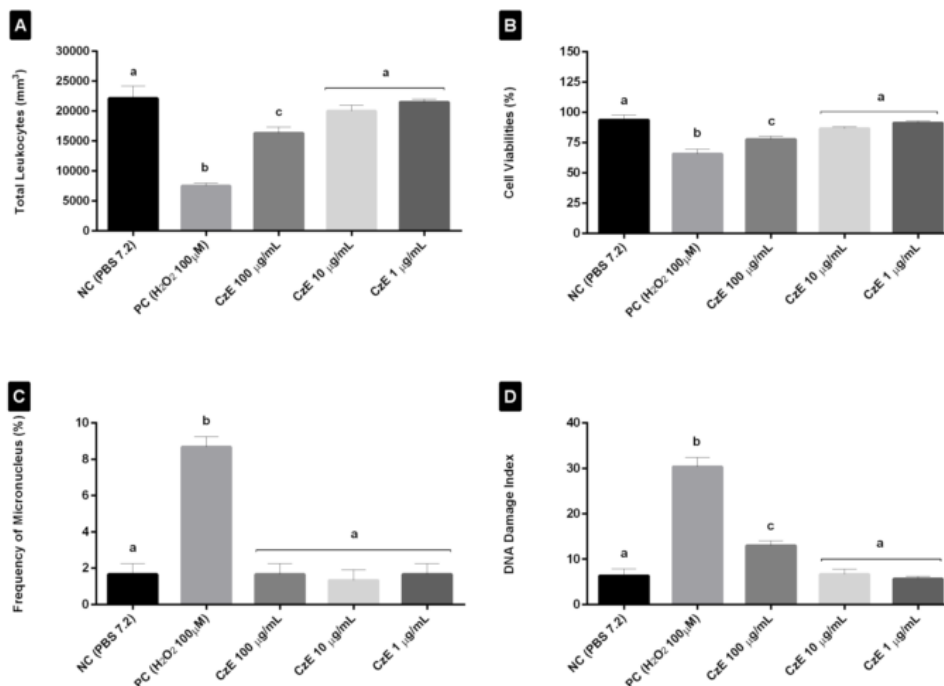


Figura 6 – Efeitos do extrato *C. zeylanicum* (canela) nos parâmetros antigenotóxicos de leucócitos humanos em cultura expostas a peróxido de hidrogênio.

Em: (A) proliferação de células; (B); inviabilidade célula; (C): DNA índice de dano; (D): frequência de micronúcleos. NC: Controle Negativo; controle; PC: Controle Positivo; concentrações de extrato CzE100 μ/ml; CzE10 μ/ml e CzE1 μ/ml Os dados são expressos como a média ± S.D. Os resultados foram confirmado por uma em triplicata. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes entre colunas (p < 0,05).

Na proliferação celular, Figura 6A, para as concentrações (CzE 1 µg/ml) e (10 µg/ml) o aumento celular foi similar ao controle negativo e diferente em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), enquanto que a concentração mais alta (CzE10µg/ml) demonstrou um decréscimo na proliferação celular, o qual pode ser comparado ao controle positivo.

Também foram avaliados os efeitos do peróxido de hidrogênio no extrato de *Ocimum basilicum* nas concentrações (DL5, D50/10 e DL50/100) em cultura de leucócitos humanos, avaliando parâmetros antigenotóxicos como, proliferação celular, inviabilidade celular, porcentagem de cromossomos anormais, índice de dano ao DNA e frequência de micronúcleos. Para proliferação celular as concentrações de DL50 e DL50/10 o aumento celular foi similar ao controle de ácido rosmarínico e diferente em relação ao controle positivo (peróxido de hidrogênio), enquanto que a concentração mais baixa (DL50/100) demonstrou um decréscimo na proliferação celular, o qual pode ser comparado ao controle positivo (GUEZ, 2014).

A Figura 6B mostra a porcentagem de células inviáveis para ambos os grupos controle e para as três concentrações de extrato testadas. O controle negativo apresentou apenas 93,67% de células inviáveis enquanto que o controle positivo foi de 65,67%. As concentrações (CzE 1µg/ml) e (CzE 10µg/ml) apresentaram, 91,33% 93,45%. Já na mais alta concentração (CzE 100µg/ml) houve uma redução de células inviáveis e foi obtido um valor de 77,67%. De acordo com Collins e colaboradores (2008), a alta viabilidade de células é requerida como uma condição prévia para que se tenha um bom desempenho no ensaio cometa.

Em outro estudo avaliaram o extrato de *Ocimum basilicum* L. nas concentrações (DL5, D50/10 e DL50/100) utilizando os mesmos parâmetro para inviabilidade celular. O controle negativo apresentou apenas 0,667% de células inviáveis enquanto que o controle positivo foi de 14%. O ácido rosmarínico apresentou 1,33% de 47 células inviáveis e para as outras concentrações de extrato foi DL50: 1.667%; DL50/10: 3.67%; DL50/100: 10.67% de células inviáveis (GUEZ, 2014).

O teste do cometa é um dos testes de genotoxicidade mais promissoras desenvolvidos para medir e analisar o dano ao DNA em células individuais (MUKHOPADHYAY et al., 2004). O teste foi utilizado como um parâmetro para avaliar o índice de danos no DNA (Figura 6D). A concentração (CzE1µg/ml) e (CzE 10µg/ml) apresentaram menor índice de dano 5,66% e 6,66% em comparação com o controle positivo 30,33%, ao passo que a maior concentração de CzE 100µ/ml apresentou percentual de 13%,e mostraram índices de danos inferiores comparado com o controle positivo respectivamente.

Em outro estudo avaliou-se o extrato de *Ocimum basilicum* L. nas concentrações (DL5, D50/10 e DL50/100) utilizando o mesmo parâmetro índice de dano ao DNA. Na menor concentração DL50/100, as células apresentaram o maior índice de dano ao ser comparado com o controle positivo, enquanto que para as outras duas concentrações de extrato DL50 e D50/10, mostraram um índice de dano de 44,45% e 19,18%, menor quando comparadas com o controle positivo (GUEZ, 2014).

O ensaio de micronúcleos fornece um índice conveniente e confiável de ambas as quebras cromossômicas e perda de cromossomas. Os micronúcleos são expressos em dividir as células que contêm ambos os intervalos de cromossomas que faltam centrômeros (fragmentos) acêntricos ou cromossomas inteiros que não são capazes de migrar para os polos durante a mitose (FENECH, 2000). Os resultados mostram a frequência de micronúcleos (MN) encontrados nos grupos de controle e três concentrações de extrato de planta em análise (Figura 3C). A frequência de MN não foi dependente da dose. As três concentração de extrato CzE 1 µ/mL; CzE 10 µ/mL e Cz E100 µ/mL mostraram frequências 1,66%, 1,67% e 1,33%, respectivamente inferiores ao controle positivo 8,66% de células com alteração.

No estudo em que avaliaram o extrato de *Ocimum basilicum* L. nas concentrações (DL5, D50/10 e DL50/100) utilizando o mesmo parâmetro frequência de micronúcleo, os resultados demonstrarão que a frequência de micronúcleos foi dose-dependente, ou seja, quanto menor a concentração do extrato do manjeriço, maior a frequência de micronúcleos (GUEZ, 2014).

Muitos vegetais apresentam substâncias com propriedades antígenotóxicas. Dentre elas estão os carotenoides (Vitamina A e licopeno), flavonoides, alcaloides (triptofol), compostos fenólicos (curcumina), ácido ascórbico (vitamina C), ácido elágico, ácido gálico, ácido tânico, ácido oleanólico, ácidos graxos insaturados, dentre outros (SASAKI et al., 1994; ANDERSON et al., 1995; NAKASUGI; KOMAI, 1998; SIPPEL et al., 1998; ANTUNES; ARAÚJO, 2000; NEJI et al., 2005; GUTERRES, 2009; BERNI et al., 2012; MARCHIORI et al., 2013).

Algumas pesquisas tem verificado o efeito antígenotóxico de óleos vegetais, dentre eles os azeites de canola e oliva, os quais, assim como o óleo de andiroba, apresentam elevados teores de ácidos graxos monoinsaturados e compostos. O ácido oleico, por exemplo, promove redução nos níveis de lipoperoxidação, além de possuir efeito antioxidante (TRUEBA et al., 2004; EVANGELISTA et al., 2004; COSTA, 2012).

Em um estudo realizado através do ensaio do micronúcleo, o óleo de *Acrocomia aculeata* (bocaiuva), rico em ácido oleico, é capaz inibir os danos genotóxicos promovidos

pela colchicina e verificou que tal efeito foi gerado pela redução de lipoperoxidação causada por este agente mutagênico (COSTA, 2012).

Apesar de inúmeros estudos investigarem o potencial antígenotóxico de vegetais, os mecanismos da antígenotoxicidade até o momento não estão totalmente esclarecidos, sendo difícil indagar sobre a natureza dos compostos químicos responsáveis por esta atividade (KNASMÜLLER et al., 2002; RESENDE et al., 2007; VINOD et al., 2011).

4 CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos da droga vegetal *C. zeylanicum* apresentaram-se em conformidade com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira (2010) e foram identificados teores fenólicos, flavonóides e taninos em sua matriz fitoquímica. Desse modo, cabe ressaltar que a determinação da maioria dos constituintes químicos de uma planta é necessário para que sejam asseguradas a confiabilidade e repetibilidade dos dados clínicos e farmacológicos.

A partir desse estudo, foi possível verificar que o extrato de *C. zeylanicum* age como um antioxidante com atividades superior ao do ácido ascórbico e da quercetina. Essas ações podem ser explicadas devido à composição do extrato, pela abundância de polifenóis e flavonóides, o qual possui potencial antioxidante bem estabelecido e conhecido na literatura.

Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato das folhas de *C. zeylanicum* apresentou maior atividade antibacteriana frente às bactérias *E. coli*, *K. pneumonia*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* sugerindo que a atividade antimicrobiana do extrato pode ser considerado como um potente antimicrobiano através de sua composição química. Isso está relacionado à presença de metabólitos que podem apresentar atividade antimicrobiana e é recomendável a continuação do estudo fitoquímico e microbiológico.

Nos parâmetros antígenotóxicos, todas as concentrações do extrato apresentaram-se efeitos benéficos em todos os testes aplicados, porém torna-se necessário destacar que a concentração CzE 1 µ/mL e CzE 10 µ/mL foi correspondente ao controle positivo capaz de reverter a um efeito de um agente genotóxico.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADWAN, G. et al. Antibacterial effects of nutraceutical plants growing in Palestine on *Pseudomonas aeruginosa*. **Turk J. of Biology**. v. 30, p. 239-242, 2006.

AGOSTINI-COSTA, T. S.; GARRUTI, D. S.; LIMA, L.; FREIRE, S.; ABREU, F. A. P.; FEITOSA, T. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 17, n. 2, p. 167-176, 1999.

AHN, J.; GRÜN, I. U.; MUSTAPHA, A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 1, p. 7-14, 2007.

AL-MARIRI, A.; SAFI, M. In Vitro Antibacterial Activity of Several Plant Extracts and Oils against Some Gram-Negative Bacteria. **Iran J Med Sci**. Mashhad, Teeran, v. 39, n. 1, p. 36-43, 2014.

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. Hemus: São Paulo, 1993. 341pp.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 551-562, 2004. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00278-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00278-4).

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, A.; EDWARDS, A. J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxic assays. **Mutation Research**, v. 329, p. 37-47, 1995.

ANDERSON, R.; BROADHURST, C.; POLANSKY, M.; SCHMIDT, W.; KHAN, A.; FLANAGAN, V.; GRAVES, D. Isolation and characterization of polyphenol type-A polymers from cinnamon with insulin-like biological activity. **J Agric Food Chem**, v. 52, n. 1, p. 65-70, 2004. doi: 10.1021/jf034916b.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, 2000.

ASOLINI, F. C.; TEDESCO, A. M.; CARPES, S. T. Atividade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 209-215, 2006.

BALESTRIN, J. F.; DIAS, G. F. J.; MIGUEL, G. O.; DALL STELLA, G. S. D.; MIGUEL, D. M. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 230-235, abr./jun. 2008.

BENZIE, I.; WACHTEL, S. **Herbal medicine – biomolecular and clinical aspects**. 2nd edition, CRC Press. New York, 2011.

BERNI, A.; GROSSI, M. R.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MUTHUKUMAR, S.; PAPESCHI, C.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. **Mutation Research**, v. 4, n. 746, p. 60-65, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2v/il. 5. ed. p. 718-723, 2010. 852p.

BUROW, M. E.; WELDON, C. B.; TANG, Y.; NAVAR, G. L.; KRAJEWSKI, S.; REED, J. C. et al. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. **Cancer Research**. v. 58, p. 4940-4946, 1998.

CAO, H.; POLANSKY, M.; ANDERSON, R. Cinnamon extract and polyphenols affect the expression of tristetraproline, insulin receptor, and glucose transporter 4 in mouse 3T3-L1 adipocytes. **Arch Biochem Biophys**, v. 459, n. 2, p. 214-222. 2007. doi: 10.1016/j.abb.2006.12.034.

CASOTI, R. **Estudo farmacognóstico de *Dithecoctenium echinatum* (Jacq.) Baill. 2012.** Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêutica) – Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêutica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CHAMKHA, M.; CATHALA, B.; CHEYNIER, V.; DOUILLARD, R. Phenolic composition of champagnes from Chardonnay and Pinot Noir vintages. **J. Agric. Food Chem.** n. 51, p. 3179-3184, 2003.

CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas; **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 52, p. 3583-3589, 2004.

CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; ROCHA, M. C. S. NPPM e LPN comprovam potencialidades terapêuticas do caneleiro. **Sapiência**, Teresina - PI: p. 5, 30 dez. 2006.

CHOI, D. W.; KIM, J. H.; CHO, S. Y.; HIM, D. H.; CHANG, S. V. Regulation and quality control of herbal drugs in Korea. **Toxicology**, v. 181-182, p. 581-586, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: **National Committee for Clinical Laboratory Standards**; 2003. M7-A6.

COLLINS, A. A.; OSCOZ, G.; BRUNBORG, I.; GAIVÃO, L.; GIOVANNELLI, M.; KRUSZEWSKI, C. C.; SMITH, R. STETINA, “The comet assay: Topical issues,” **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. **Ethnopharmacol**, v. 106, p. 290-302, 2006.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 2. ed. Lisboa; Fundação Calouste Gulbenkian, v. III 1032 p. 1982.

COSTA, G. L. de A. **Avaliação do potencial mutagênico, antimutagênico e antioxidante do óleo da polpa de *Acrocomia aculeata* (Arecaceae).** 2012, 67f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, 2012.

DE BRUYNE, T.; PIETER, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structures and biological activities. **Biochem Systemat Ecol**, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

DINIZ, M. F. M. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** 2000. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

DUFRENSE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **J Nutr Biochem.** v. 12, n. 7, p. 404-421, 2001.

EVANGELISTA, C. M.; ANTUNES, L. M.; FRANCESCATO, H. D.; BIANCHI, M. L. Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1291-1297, 2004.

FARIA, T. J.; FERREIRA, R. S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J. R. P.; ISHIKAWA, N. K.; BARBOSA, A. M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FARIA, T. J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5. ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS, Ed. UFSC, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, A. P.; RIBEIRO, G. E.; RUFINO, L. R. A.; SILVA, L. M.; BORIOLLO, M. F. G.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “in vivo”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “in vitro”. **Rev Med Minas Gerais.** v. 21, n. 3, p. 272-279, 2011.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A Fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829. 2010.

FILGUEIRAS, C. T.; VANETTI, M. C. D. Effect of eugenol on growth and listeriolysin production by *Listeria monocytogenes*. **Braz. arch. biol. technol.** Curitiba, v. 49, n. 3, p. 405-409, 2006.

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENI, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 47, p. 1035-1040, 1999. <http://dx.doi.org/10.1021/jf980496s>.

GINDRI, A. L.; SILVA, M. M.; BRUM, M. B.; ATHAYDE, L. S.; HOELZEL, M. L. Análise fitoquímica qualitativa das cascas e do miolo da raiz de *Ureca baccifera* (L.) Gaudich (Urticaceae). **Saúde (Santa Maria)**; v. 36, p. 63-70, 2010.

GUEZ, M. C. **Avaliação dos efeitos do extrato hidroalcoólico do manjeriço (*ocimum basilicum l.*) sobre parâmetros oxidativos, inflamatórios e genotóxicológicos em cultura de leucócitos humanos**”. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2014.

GUTERRES, Z. R. **Investigação das atividades Mutagênica, Antimutagênico e Antioxidante de extratos etanólicos de *Aoiueatrinervis*, *Nectandracissiflora*, *Ocoteaminarum* (Lauraceae) e dos Alcalóides *Triptofol*, *Ocoteína* e *Dicentrina***. 2009. 239f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2009.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetables tannins) as drugs and medicine: possible modes of action. **J Nat Prod.** v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

JHAM, G. N.; DHINGRA, O. D.; JARDIM, C. M.; VALENTE, V. M. M. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatol. Bras.**, v. 30, n. 4, p. 103-109, 2005.

JUNG, M. J.; HEO, S.; WANG, M-H. Free radical scavenging and total phenolic contents from methanolic extracts of *Ulmus davidiana*. **Food Chem**, v. 108, p. 482-487, 2008.

KNASMÜLLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B. J.; NOBIS, E. C.; SCHARF, G.; KASSIE, F. Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: Methodological aspects and extrapolation problems. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 1051-1062, 2002.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O. The bark and leaf essential oils of cinnamon (*Cinnamomum verum* Presl) grown at Paraná, Brazil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 281-285, 1997.

LEMOS, J. A. et al. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. toward *Cryptococcus neoformans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.

LEMOS, J. A.; PASSOS, X. S.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H.; SOUZA, L. K. H.; LEMOS, A. A.; SILVA, M. R. R. Antifungal activity from *Ocimum gratissimum* L. toward *Cryptococcus neoformans*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 1, p. 55-58, 2005.

LIMA, A. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 531-536, 2006.

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Rev. Bras. Farmacogn.** São Paulo, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

MACHADO, H. et al. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008. Disponível em: <<http://www.editoraufjf.com.br/revista/index.php/boletimcbr/article/viewFile/596/533>>.

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

MARCHIORI, P. M.; FREITAS, P. R.; KALIL, I. C.; BRASIL, G. A.; RONCHI, S. N. Efeitos quimiopreventivo e antimutagênico in vivo do extrato hidroetanólico de frutos de *Carica papaya* L. **Revista Cubana de plantas medicinales**, v. 18, n. 3, p. 381-390 2013.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects os *Cinnamomum verum* leaf extract assayed by different methodologies. **Food and Chemical Toxicology**. v. 44, p. 198-206, 2006.

MEIER, J. S.; ABDALLA, A. L.; VASCONCELOS, V. R.; KREUZER, M.; MARQUARDT, S. Effect of offering a multiple choice among Brazilian woody plants on intake and feeding behavior of experienced and inexperienced Santa Inês lambs. **Small Ruminant Research**. n. 121, 2014.

MENDES, L. S. S. **Estudo químico e atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* do óleo essencial das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn (canela)**. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, E. A. T. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. ZAHLB e *Lobelia stellfeldii* R. BRAGA. *Companulaceae*. **Tribuna Farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 13-39, 1979.

MOREIRA, L. D.; ENGELHARDT, L. R.; REIS, S. A.; SANCHES, M. E.; LEITÃO, G. S.; LEITÃO, G. G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). **Bras. Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 124-125, 2002. ISSN: 0102-695X.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D. K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. "Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in drosophila melanogaster using the alkaline comet assay," **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.

NASCIMENTO, J. E. et al. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 145-150, 2008.

NAKASUGI, T.; KOMAI, J. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant *Carqueja* (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2560, 1998.

NEGI, A. S.; DAROKAR, M. P.; CHATTOPADHYAY, S. K.; GARG, A.; BHATTACHARYA, A. K.; SRIVASTAVA, V.; KHANUJA, S. P. S. Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1243-1247, 2005.

OH, T. Y. et al. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis implication of antioxidants in its treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 30, p. 905-915, 2001.

PEREIRA, C. M. **Química e atividade biológica de *Microlíchia crenulata* (DC.) Mart: atividade antioxidante e antimicrobiana para a conservação de alimentos.** Tese (Doutorado em Ciências dos alimentos) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PEREIRA, R. S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, n. 2, p. 326-328, 2004.

RANJBAR, A. et al. Antioxidative stress potential of *Cinnamomum zeylanicum* in humans: A comparative cross-sectional clinical study. **Therapy**, v. 3, n. 1, p. 113-117, 2006.

RESENDE, F. A.; ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; SENEDESE, J. M.; SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, v. 634, p. 112-118, 2007.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications, Honolulu**, v. 3, p. 25-35, 2005.

SACHIN VETAL. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of type-A procyanidine polyphenols from bark of *Cinnamomum zeylanicum* in rats, Beijing **Academy of Food Sciences**, Pages 59-67, 2013.

SANDABE, U. K.; ONYELILI, P. A.; CHIBUZO, G. A. Phytochemical screening and effects of aqueous extract of *Ficus sycomorus* L. (Moraceae) stem bark on muscular activity in laboratory animals. **J. Ethnopharmacol.** v. 104, p. 283-285, 2006.

SAEED, S.; TARIQ, P. In vitro antibacterial activity of clove against gram negative bacteria. Pak. **J. Bot. Karachi**, v. 40, p. 2157-2160, 2008.

SANTOS-MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**. v. 24, p. 1410-1416, 2010.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella* entérica de origem avícola. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, 2007.

SASAKI, Y. F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y. Bioantigenotoxic effects of unsaturated fatty acids included in fish oil - docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 320, n. 1/2, p. 9-22, 1994.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SHUKLA, S. et al. Antimicrobial efficacy of *Raphanus sativus* root juice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 89-92, 2011.

SILVA, H. S.; SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H. Atividade antioxidante e fenólicos totais da *Cenostigma macrophyllum*. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. Águas de Lindóia: Unstituto de Química da USP, 2006.

SILVA, H. R.; SILVA, C. C. S. M.; NETO, L. B. C.; LOPES, J. A. D. L.; CITÓ, A. M. G. L.; CHAVES, M. H. Constituintes químicos das cascas do caule de *Cenostigma macrophyllum*: ocorrência de colesterol. **Quím. Nova**. v. 30. n. 8, 2007.

SILVA, J. A.; OLIVEIRA, F. F.; GUEDES, E. S.; BITTENCOURT, M. A. L.; OLIVEIRA, R. A., Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Rev. bras. plantas med.** v. 16, n. 3, supl. 1, Botucatu: 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 6. ed., p. 1102, 2010.

SINGH, N.; MCCOY, M.; TICE, R.; SCHNEIDER, E.; A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Exp. Cell Res.** v. 175, p. 184-191, 1995.

SINGH, N. N. Meditation: nature and applications. In: N. N. Singh (Ed.), **Psychology of meditation**. New York, NY: Nova. p. 1-9, 2014.

SIPPEL, C.; LEHMANN, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. O ácido tânico e sua relação com a anti ou co-genotoxicidade: dependência da sequência de administração e do metabolismo da genotoxina. In: **X Scientific Initiation Meeting**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

SOUSA et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**. v. 30, p. 351-355, 2007.

TAGURI, T.; TAKASHI, T.; KOUNO, I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Japão, v. 29, n. 11, p. 2226-2235, 2006.

TAMAYO, C. Fitoterapia basada en la evidencia. **Revista de Fitoterapia**, v. 6, (S1): p. 55-60, 2006.

TANAKA, T.; MATSUO, Y.; YAMADA, Y.; KOUNO, I. (2008). Structure of polymeric polyphenols of cinnamon bark deduced from condensation products of cinnamaldehyde with catechin and procyanidins. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 14, p. 5864-5870. doi: 10.1021/jf800921r.

TOSHIO, F.; KIYOSHI, K.; SUMIO, T. Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from *Morus* species against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. **Fitoterapia**. v. 76, n. 7, p. 708-711, 2005.

TRUEBA, G. P.; SÁNCHEZ, G. M.; GIULIANI, A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in câncer. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2029-2044, 2004.

VASCONCELOS, E. M. Dispositivos associativos de luta e empoderamento de usuários, familiares e trabalhadores em saúde mental no Brasil. In: **Vivência**, n. 32, Natal, Ed. UFRN, 2007.

VELIOGLU, Y. S.; NAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4113-4117. 1998. <http://dx.doi.org/10.1021/jf9801973>.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V. Toxicidade de Óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Hort. Bras.**, v. 23, n. 4, p. 915-919; 2005.

VINOD, V.; TIWARI, P. K.; MESHARAM, G. P. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of neem (*Azadirachta indica*) seed oil in the in vitro Ames Salmonella/microsome assay and in vivo mouse bone marrow micronucleus test. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 931-937, 2011.

VOUKENG, I. K. et al. Antibacterial and antibiotic-potential activities of the methanol extract of some Cameroonian spices against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. **BMC Research Notes**. London, v. 5, p. 299, 2012.

WANG, H-F.; WANG, Y-K.; YIH, K-W. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, p. 509-522, 2008.1

WANG, Y.; AVULA, B.; NANAYAKKARA, N.; ZHAO, J.; KHAN, I. Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 18, p. 4470-4476, 2013. doi: 10.1021/jf4005862.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International, Essex**, v. 33, n. 6, p. 449-459, 2000a.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides 2007. In: Simões CMO, (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis /Porto Alegre: Editora da UFSC/UFRGS; 2007. p. 577-614.

4.2 MANUSCRITO II

Análise fitoquímica por HPLC-DAD e Desenvolvimento de formulação Creme-gel contendo extrato *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Canela): Avaliação em modelo experimental de dermatite de contato.

Jocelene Filippin Cossetin¹, Pedro Henrique Doleski², Roberta Rosso³, Alessandra Guedes⁴, Daniela B. Rosa Leal², Cristiane de Bona da Silva¹, Marta Palma Alves¹, Melânia Palermo Manfron¹

¹*Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

²*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.*

³*Curso de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900. Santa Maria - RS, Brasil.*

⁴*Curso de Biologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, 97105-900. Santa Maria - RS, Brasil.*

*As correspondências devem ser dirigidas Prof^a Dr^a Melânia Palermo Manfron

Departamento de Farmácia Industrial Centro de Ciências da Saúde/UFSM

Av. Roraima nº 1000, Camobi, Santa Maria/ RS Cep: 97105-900

Tel: (55) 32208238/(55)32209368/ (55) 99712136

Endereço de E-mail: melaniapalermo@gmail.com.

RESUMO

Cinnamomum zeylanicum Blume é uma planta nativa da Ásia, pertencente à família Lauraceae, conhecida popularmente como Canela possui compostos químicos, como aldeído cinâmico, eugenol, e uma variedade de polifenóis. A partir do extrato hidroetanólico 70% (extrato bruto) das folhas de *C. zeylanicum* foi identificado dois compostos químicos, hidróxicumarina e cinamaldeído com tempos de retenção 2,5 mim e 5,6 mim respectivamente. Os compostos foram determinados e analisados por CLAE/DAD e seus espectros comparados com a literatura. As formulações semissólidas do tipo creme-gel incorporado a diferentes concentrações de extrato de *C. zeylanicum*. O creme-gel contendo o extrato apresentou valores de pH adequado (6,0-6,5), características organolépticas, espalhabilidade e viscosidade em conformidade com o preconizado quanto a caracterização físico-química para aplicação tópica. Em relação à eficácia *in vivo*, o modelo de dermatite de contato foi capaz de causar dano tecidual comprovada pelas alterações nas atividades das enzimas do sistema purinérgico, as quais participam da modulação da resposta inflamatória. A indução da dermatite de contato alérgica foi realizada com sulfato de níquel 5,0%. Os ratos foram divididos, aleatoriamente em 6 grupos com 5 animais e tratados respectivamente com G1: tratados com creme-gel base; G2: creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 5%; G3 creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 10%; G4: creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 15%; Controle Positivo: tratado com creme-gel dexametasona 0,05% e G6: Sem indução e tratamento. A formulação creme-gel 5% e 10 % apresentaram efeitos semelhantes à dexametasona em relação as enzimas E- NTPDase e E-ADA sugerindo uma atividade antiinflamatória na dermatite de contato. O creme-gel contendo o extrato nas concentrações 5% e 10% se mostrou promissor, podendo ser utilizado para o tratamento da dermatite de contato.

Palavras-chave: Dermatite de contato. *In vivo*. *Cinnamomum zeylanicum* Blume. E-NTPDase. Creme-gel. Caracterização físico-química. HPLC-D

1 INTRODUÇÃO

A dermatite de contato é uma doença inflamatória de pele que pode ser induzida pela exposição a agentes químicos de baixo peso molecular, com propriedades pró-inflamatórias e antigênicas (BONNEVILLE et al., 2007; ROWLAND et al., 2001; SAINT-MEZARD et al., 2004). É caracterizada por apresentar eritema pruriginoso intenso, edema, e até mesmo vesículas nos locais de contato do agente na pele. A dermatite de contato alérgica é causada por uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV mediada pela resposta imune das células T, a partir de um mecanismo de infiltração e ativação de monócitos e/ou macrófagos (KAPLAN; IGYÁRTÓ; GASPARI, 2012).

Os corticoides tópicos são fármacos muito usados no tratamento de patologias inflamatórias, proliferativas ou de causa imunológica da pele. Entre os utilizados está a dexametasona e seus derivados (COSTA et al., 2005). O dipropionato de dexametasona possui ação anti-inflamatória, vasoconstritora, antiproliferativa e imunossupressora, sendo empregado no tratamento de doenças de pele. Entretanto, os demais corticosteroides podem causar efeitos adversos locais e sistêmicos, relacionados à potência do fármaco, pois quanto mais potente, maior será a eficácia terapêutica, bem como a incidência desses efeitos indesejados (ROCHA et al., 2004).

A partir disso, nos últimos anos, o interesse em plantas medicinais para a terapia de distúrbios dermatológicos tem se intensificado (DATTINER, 2004). Os extratos de plantas têm sido utilizados em aplicações tópicas como terapia antienvelhecimento, para o tratamento de feridas e de outras doenças de pele (PAJONK et al., 2006). Como exemplos dessas plantas podem ser citadas *Glycine max* (soja) (IZUMI et al., 2007), *Camellia sinensis* (chá verde) (HSU, 2005; PAJONK et al., 2006), *Carica papaya* (mamão) (HEWITT et al., 2000; STARLEY et al., 1999) e *Aloe vera* (babosa) (RICHARDSON et al., 2005)

O interesse do mercado nacional por novos medicamentos e inovação tem intensificado a busca por formas farmacêuticas fitoterápicas, incluindo as de uso tópico. Dentre os fitoterápicos com aplicação tópica são citadas na literatura géis contendo *Aloe barbadensis* para tratamento de acne, *Calêndula officinalis* formulação de gel e pomada para tratar processos inflamatórios e cicatrização (MACHADO et al., 2010; ROVERONI-FAVARETTO; LODI; ALMEIDA, 2009). Encontram-se géis e cremes com *Curcuma longa* ou com *Hamamelis virginiana* para tratar prurido, dermatite, inflamação e acne; *Cordeia verbenaceae* para inflamações (SILVA; COUTO; BRESOLIN, 2012).

Dessa forma é importante continuar o processo direcionado para a investigação científica e tecnológica na área de plantas, buscando soluções na privilegiada biodiversidade brasileira, através da descoberta e desenvolvimento de novas moléculas com atividade terapêutica, ou no desenvolvimento de fitoterápicos genuinamente nacionais. A exemplo disso, encontra-se a espécie *Cinnamomum zeylanicum* composta por um grande grupo de substâncias químicas que podem ser uma fonte promissora de matéria-prima vegetal e medicamentos fitoterápico.

Cinnamomum zeylanicum Blume (*Cinnamomum verum* J. S. Presl.), conhecida como “canela-da-índia” e “canela-do-ceilão” é originária de algumas regiões da Índia e do Ceilão. A parte interna da casca do tronco e dos ramos, representa a canela do comércio, com vasto uso mundial na perfumaria e na culinária, devido suas propriedades aromáticas e condimentares (COSTA, 1975; ALMEIDA,1993). Na Farmacopeia Brasileira, encontram-se as espécies *C. zeylanicum* e que é citada como fitoterápicos (BRASIL, 2011). O óleo essencial da casca é rico em aldeído cinâmico e das folhas, em eugenol usado na preparação de medicamentos (LIMA et al., 2005). *C. zeylanicum* apresentam através de sua composição química atividades farmacológicas como antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante. O uso da casca da planta é indicado como aperiente, antispasmodico, antidiarreico, antipruriginoso e antiespasmódico (BRASIL, 2011). Ao extrato das folhas são descritas atividades antioxidante, antibiótica e antifúngica (WANG; WANG; YIH, 2008; DIAS, 2009; RANASINGHE et al., 2013).

Assim, o objetivo desse trabalho foi realizar a análise fitoquímica por CLAE do extrato das folhas de *C. zeylanicum*, incorporar em formulação creme-gel extrato de canela em diferentes concentrações e avaliar o creme-gel quanto às características físico-químicas. Além disso, foi avaliada seus efeitos *in vivo* através da análise da atividade de enzimas do sistema purinérgico (E NTPDase e E-ADA), as quais possuem relação com o processo inflamatório, em um modelo de dermatite de contato.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Coleta do material vegetal

Aproximadamente 600g de folhas foram coletadas da espécie *C. zeylanicum* na cidade de Cruz Alta, na Localidade de Capão Grande, Latitude -28° 45' 34" Sul e longitude 53° 32' 07" Oeste nos meses de junho e julho de 2013. Uma amostra está depositada no herbário do Departamento da Biologia (SMDB) UFSM sob-registro 16.750.

2.2 Obtenção do extrato

As folhas de *C. zeylanicum* foram secas em estufa de ar circulante à temperatura de aproximadamente de 40°C e reduzido a pó, por meio de moinho de facas. O extrato hidroalcoólico (70%) das folhas foi obtido por maceração com renovação de solventes por um período de 30 dias. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado. Calculou-se o rendimento total do extrato, de acordo com a fórmula (1):

$$Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Re = Rendimento total do extrato (%);

P_{ext} = Peso do extrato seco (g);

P_{folhas} = Peso das folhas secas moídas (g).

2.3 Condições Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

As análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) foram realizadas no sistema de CLAE (Shimadzu, Kyoto, Japão), com auto-injetor (SIL-20A) equipado com bombas alternativas (Shimadzu LC-20AT) com integrador (CBM 20A), detector UV/VIS por arranjo de diodos (SPD-M20A) e software LC solution SP1. As análises foram realizadas em fase reversa utilizando coluna C18 (4,6 mm x 150 mm) carregada com partículas de 5µm de diâmetro. A fase móvel utilizada composta por metanol: acetonitrila: água contendo 1,0% de ácido acético (14: 26: 60) com gradiente isocrático. O extrato e a fase móvel foram filtrados através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore), e, em seguida, desgaseificada por banho de ultra-sons, antes de usar. A amostra de *C. zeylanicum* foram analisadas a uma concentração de 10 mg/ml. O fluxo foi de 0,2 ml/min, volume de injeção de 10 µl e os comprimentos de onda foram de 254 nm para cinamaldeído e 280 nm Hidróxi-cumarina. As soluções padrões de referências foram preparadas na fase móvel de CLAE nas concentrações de 0,031-0,250 mg.ml⁻¹ para cinamaldeído e Hidróxicumarina 0,100-0,250 mg.ml⁻¹. Os picos cromatográficos foram confirmados por comparação do tempo de retenção e espectros de DAD com os padrões de referência.

2.4 Preparação da formulação Creme-gel

A formulação foi manipulada em um único lote nas quantidades suficientes para a realização dos testes. As matérias primas utilizadas foram adquiridas pelo mesmo fornecedor para evitar possíveis variações químicas ou físicas que poderia causar interferências na instabilidade do sistema, alterando os resultados finais.

Para o preparo do creme base, foram aquecidas separadamente as substâncias em dois graus, onde no primeiro foram aquecidos os componentes da fase oleosa (cera não iônica, vaselina líquida e propilparabeno) a uma temperatura de 70°C, e no outro foi aquecido as substâncias da fase aquosa (metilparabeno, propilenoglicol e água destilada) a temperatura de 75°C. Em seguida, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa e agitou-se moderadamente até a completa formação do creme. Posteriormente, a velocidade da agitação foi reduzida até a mistura adquirir a consistência adequada e alcançar a temperatura de 35°C, corrigiu-se o pH para 6,0, deve-se ressaltar que o pH recomendado é 5,5-6,5. Após o término da manipulação foi obtido 2000 g de base Polawax® que foi incorporado com gel Carbopol 30%.

Para o preparo do gel foi pesado o Carbopol 940 P® e transferido para um gral de porcelana onde o mesmo foi triturado com o auxílio de um pistilo. Foi adicionada ao Carbopol 940 P®, em pequenas quantidades a água destilada onde previamente o EDTA foi solubilizado. Foi realizada a mistura de forma unilateral, e em seguida foi acrescentado o metilparabeno previamente solubilizado no propilenoglicol. Esse sistema apresentava-se parcialmente gelificado devido a sua estrutura ácida pH 3, sendo posteriormente neutralizado com uma solução de NaOH 20%, até o valor de pH 6 obtendo um gel base propriamente dito.

Após o prepararo das formulações foram adicionados 70% de creme base Polawax e 30 % de gel Carbopol para obtenção da formulação creme- gel. O extrato de *C. zeylanicum* foi incorporado nas concentrações de 5%, 10% e 15% para analisar posteriormente as características organolépticas, pH, espalhabilidade e viscosidade.

Tabela 1 – Composição quali-quantitativa dos creme-gel para a avaliação da eficácia *in vivo* em modelo de dermatite de contato

Base Creme Polawax®.	Quantidades (%)
Cera auto emulsionante não iônico	16
Vaselina líquida	4,5
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,05
Água destilada qsp	2000g
Carbopol 940P®	1
Propilenoglicol	5
Metilparabeno	0,15
EDTA	0,09
Água destilada qsp	

2.5 Caracterização físico-química do creme-gel

A análise das características organolépticas das formulações semissólidas foi analisada quanto às características físicas, ou seja, aparência, consistência, cor e odor, apresentadas pelas amostras armazenadas em T.A, as quais serão consideradas como padrão. A amostra foi descrita segundo critérios já referenciados por Alves (2006), mudança aspecto relativo à aparência, cor e odor da amostra. O pH das formulações foi determinado em potenciômetro (Seven Easy, Mettler Toledo, Brazil) previamente calibrado com soluções tampão de 4,0 e 7,0.

A espalhabilidade das formulações semissólidas foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Borguetti e Knorst (2006) e modificada por Rigo e colaboradores (2012). Uma placa de vidro com orifício (1,0 cm) foi colocada sobre uma outra placa de vidro sem orifício. A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com auxílio de espátula. Cuidadosamente, foi retirada a placa molde e placas de vidro de peso (1g) foram depositadas, individualmente, sob a amostra em intervalos de um minuto. Em cada tempo de análise, a imagem obtida foi capturada com auxílio de digitalizador. O software Image J (Versão 1.47, National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para calcular as áreas obtidas a partir das imagens digitalizadas. O fator de espalhabilidade (Fe) foi calculado, (equação abaixo) o qual expresso à capacidade de expansão de uma formulação em uma superfície plana quando um grama de peso é adicionado sobre a mesma. As análises foram realizadas em triplicata, a temperatura ambiente.

$$Fe = A / P \quad (2)$$

Onde:

FE (mm²/g) = fator de espalhabilidade

A = área máxima de espalhabilidade

P = peso total adicionado

As características reológicas da formulação semissólida foram avaliadas com auxílio de um viscosímetro rotacional Brookfield, modelo RV DVI+ com 10 velocidades. A média da viscosidade foi dada em centipoise (cp) (ALVES, 2006).

2.6 Avaliação da eficácia *in vivo*

2.6.1 Indução de dermatite de contato e tratamento

Para a indução de dermatite, foram utilizados 30 ratos *Wistar* heterogênicos, pesando entre 200 a 250g e idade média de seis semanas. O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) sob o parecer n.º.7432010715. Os ratos foram divididos, aleatoriamente em 6 grupos com 5 animais em cada G1: Controle; G2: controle com Dexametasona; G3: creme-gel; G4: creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 5%; G5: creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 10%; G6: creme-gel contendo extrato *C. zeylanicum* 15%.

A indução da dermatite de contato alérgica foi realizada com Sulfato de níquel 5,0%, conforme descrito em Brum et al., (2005). Seis dias após a sensibilização inicial nas orelhas foi iniciado a indução com 5 aplicações em intervalos de 72 h cada aplicação, durante 15 dias. Logo foi iniciado os tratamentos com aplicação de 3 g das formulações por via tópica uma vez ao dia com aplicação em cada orelha por um período de 7 dias. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados com após coleta de sangue com EDTA como anticoagulante para a determinação da atividade da E-NTPDase e E-ADA.

2.6.2 Atividade das ecto-enzimas E-NTPDase e E-ADA

2.6.2.1 Isolamento de células mononucleares ricas em linfócitos

Os linfócitos foram isolados do sangue total coletado com EDTA e separados com Ficoll-Hystopaque conforme Böyum (1968). A viabilidade destas células foi estimada através

da enzima lactato desidrogenase citosólica (LDH) presente na amostra antes e depois da incubação a 37°C e comparada à atividade total da enzima em células lisadas com 0,1% Triton X-100 como descrita por Bergmeyer (1983) e pela coloração com o corante Azul de Tripam.

2.6.2.2 Determinação de proteína

A proteína será determinada pelo método de Comassie Blue usando albumina bovina conforme o padrão descrito por Bradford (1976).

2.6.2.3 Atividade da E-NTPDase

Após o isolamento de linfócitos, a atividade de E-NTPDase foi determinada conforme Leal et al. (2005), medindo a quantidade de fosfato inorgânico liberado (Pi), utilizando um ensaio colorimétrico. O meio reacional continha 0,5 mM de CaCl₂, 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de glicose e tampão Tris 50 mM-HCl (pH 8,0) em um volume final de 200 µL. Células mononucleares intactas (20 µL) suspensas em solução salina foram adicionadas ao meio de reação (2-4 µL de proteína) e pré-incubadas durante 10 min a 37°C. A reação foi iniciada pela adição do substrato (ATP ou ADP) a uma concentração final de 2 mM e finalizada com 200 µL de ácido tricloroacético a 10 % para proporcionar uma concentração final de 5 %. As amostras foram mantidas em gelo durante 10 minutos antes do ensaio da libertação de Pi (CHAN et al., 1986), usando verde de malaquita como reagente colorimétrico e KH₂PO₄ como padrão. A absorbância foi medida a 630 nm em espectrofotômetro (Biospectro SP - 22). As reações de controle foram realizadas por adição da preparação de enzima após a adição de ácido tricloroacético para corrigir a hidrólise não enzimática de nucleotídeos. Todas as amostras foram processadas em triplicata e a atividade específica foi expressa em nanomoles de Pi liberada por minuto por miligrama de proteína.

2.6.2.4 Atividade da E-ADA

Foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Giusti e Galanti (1984), baseando-se na medição direta da formação de amoníaco produzido quando adenosina desaminase atua em excesso de adenosina, onde 25 µL de células mononucleares reagem com 21 mM de adenosina, em pH 6,5, e incubadas a 37° C durante 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de 106,2 mM de fenol e 167,8 mM de nitroprussiato

de sódio e uma solução de hipoclorito. Sulfato de amônio de 75 μ M foi usado como padrão. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e a quantidade de amônia produzida foi medida a 620 nm. A atividade de ADA foi expressa em U/L. Uma unidade (1U) de ADA é definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1mmol de amônia por minuto de adenosina em condições padronizadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Obtenção do extrato

Os extratos secos obtidos das folhas de *C. zeylanicum* apresentou um rendimento de 24,49%. Vasconcelos e colaboradores (2007) em seu estudo realizado utilizou o mesmo solvente (hidroalcoólico) e obteve rendimento de 19% das folhas de *Cissus sicyoides*. Já Casoti (2012) obteve um rendimento de extrato bruto de 22,94% a partir da extração hidroalcoólica de *Dithecotenum echinatum*. Desse modo, o rendimento dos extratos obtidos a partir das plantas varia de acordo com fatores relacionados com a planta e com os métodos de extração e líquidos extratores utilizados (DINIZ, 2000).

3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

Na composição química do extrato de *C. zeylanicum* foi analisada a presença de Hidróxicumarina e Cinamaldeído. O extrato foi analisado por cromatografia em condições semelhantes aos padrões comerciais obtendo-se o tempo de retenção de 2,5 e 5,6 min de hidróxicumarina e cinamaldeído, respectivamente (figura1).

Em um estudo em que realizaram simultânea determinação de cinamaldeído e eugenol, em piperina e canela foi utilizada uma combinação de UV e detector eletroquímico em modo gradiente isocrático fase móvel composta metanol acetonitrila e água (28:12:60) com tempo de retenção de 10,2 min para cinamaldeído (KERMASHA et al., 1996). Outro estudo utilizou o método isocrático e fase móvel composta metanol acetonitrila e água contendo 1,5% de ácido acético (28:12:60), em que obteve um tempo de retenção de 5,95 min para o cinamaldeído (KIM et al., 2007).

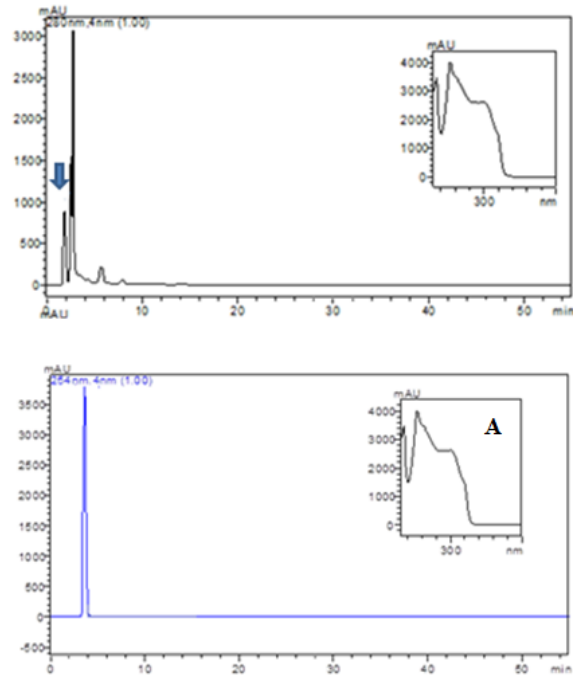


Figura 1 – Representação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato das folhas de *C. zeylanicum* e do composto a Hidróxicumarina (A) identificado

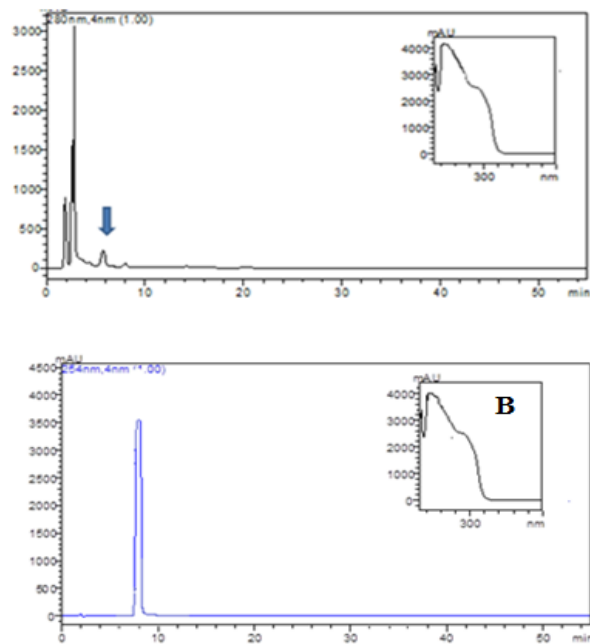


Figura 2– Representação do perfil cromatográfico por CLAE-DAD do extrato das folhas de *C. zeylanicum* e do composto a Cinamaldeído (B) identificado.

O uso de fase móvel compreendendo acetonitrila-metanol- água no presente trabalho de pesquisa mostra uma melhor resolução componentes de diferentes presentes na *C. zeylanicum*. O metanol e o acetonitrila utilizado na fase móvel são miscível água, tem

baixa viscosidade, baixa tensão superficial, e estão prontamente disponíveis na forma pura. O comprimento de onda selecionado para análise foi 254-280 nm, o que produz uma melhor sensibilidade, tanto para os padrões como para as amostras.

Um método de HPLC foi relatado na literatura para a determinação de cinamaldeído, cumarina e álcool de cinamilo de *C. zeylanicum* Blume (ARCHER, 1988). A coluna utilizada no método relatado é coluna RP-8 de fase reversa Chromosorb (250 mm x 7 mm, 5 µm), que elui em cinamaldeído 9,3-9,5 min devido ao comprimento da coluna maior. A coluna utilizada no presente trabalho de pesquisa é Inertsil ODS-3V C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), que, sendo menor no comprimento, elui cinamaldeído de em 5,95min, tornando este método mais rápido e econômico.

3.3 Caracterização físico-química do creme-gel

3.3.1 Determinação das características organolépticas e pH das formulações semissólidas

Todas as formulações apresentaram-se homogêneas em relação à cor, odor e pH, mantendo as características específicas de cada concentração nos 30 dias de análise. Com exceção a formulação creme-gel com 15% de extrato que apresentou odor forte e característico e uma diminuição no pH durante os 30 dias, podendo estar relacionado com da alta concentração presente de extrato.

As formulações creme-gel contendo extrato de *C. zeylanicum* apresentaram características organolépticas satisfatórias com coloração, aspecto homogêneo e odor característico durante o período de armazenamento. O pH das formulações apresentou valores em torno de 6,5, compatível com a aplicação tópica (SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2013). Outra pesquisa encontraram valores de pH para bases Lanette®, Hostacerin® e Polawax®, de 6,3, 6,3 e 6,1, respectivamente. Após incorporação da *Propolis Wax* nas três bases, foi observado que não existiu variação no pH (BITTENCOURT et al., 2014).

Tabela 2 – Características organolépticas e valores de pH das formulações semi-sólidas (n=3).

Formulações	Cor	Odor	pH ±DP
CR-GLB-7D	Branca	Inodoro	6,72± 0,01
CR-GLB14D	Branca	Inodoro	6,77± 0,02
CR-GLB-30D	Branca	Inodoro	6,70± 0,02
CR-GL5%-7D	Verde-claro	suavemente/doce	6,20± 0,01
CR-GL5%-14D	Verde-claro	suavemente/doce	6,25± 0,03
CR-GL5%-30D	Verde-claro	suavemente/doce	6,29± 0,05
CR-GL10%-7D	Verde	Adocicado	6,10± 0,07
CR-GL10%-14D	Verde	Adocicado	6,08± 0,04
CR-GL10%- 30D	Verde	Adocicado	6,04± 0,02
CR-GL15%- 7D	Verde-escuro	forte e característico	5,80± 0,02
CR-GL5%-14D	Verde-escuro	forte e característico	5,76± 0,03
CR-GL5%-30D	Verde-escuro	forte e característico	5,70± 0,03

OBS: CR-GLB-7D =Creme-gel base 7 dias de tratamento, CR-GLB-14D =Creme-gel base 14dias de ratamento, CR GLB-30D =Creme-gel base 30 dias de tratamento, CR-GL5%-7D = Creme-gel c/ extrato de canela 5% 7 dias de tratamento , CR-GL5%-14D = Creme-gel c/ extrato de canela 5% 14 dias de tratamento , CR-GL5%-7D = Creme-gel c/ extrato de canela 5% 30 dias de tratamento , CR-GL10%-7D = Creme-gel c/ extrato de canela 10% 7 dias de tratamento ,CR-GL10%-14D = Creme-gel c/ extrato de canela 10% 14dias de tratamento , CR-GL10%-30D = Creme-gel c/ extrato de canela 10% 14 dias de tratamento, CR-GL15%-7D = Creme-gel c/ extrato de canela 15% 7 dias de tratamento , CR-GL15%-14D = Creme-gel c/ extrato de canela 15% 14 dias de tratamento e CR-GL15%-30D = Creme-gel c/ extrato de canela 15% 30 dias de tratamento.

De acordo com a figura 3, pode-se observar que as formulações contendo somente o creme-gel base apresentaram inicialmente uma coloração branca. Já as formulações com extrato à 5%, 10% e 15% (figura4), apresentou, odor característico do extrato incorporado e aspecto cremoso, brilhante e límpido. Após os 30 dias observou-se que não houve alteração na coloração, aparência e consistência das formulações, armazenadas em temperatura ambiente. O mesmo foi encontrado em outro estudo em que onde a característica organoléptica como odor antes e após a incorporação do extrato de *Propolis Wax* nas bases creme-gel não foi alterada e a alteração da cor foi devido à característica intrínseca do extrato incorporado (BITTENCOURT et al., 2014).

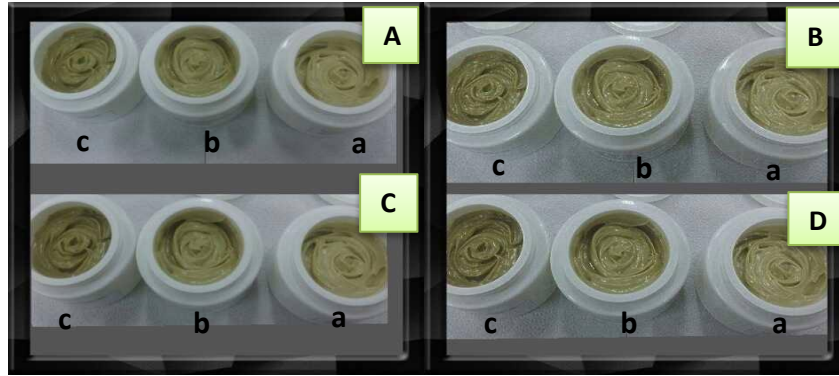


Figura 3 – Formulação crème-gel base 3 – Creme-gel: após o preparo (A), Creme- gel após 7 dias de análise (B), Creme- gel após 14 dias de análise (C), Creme- gel Após 30 dias de análise.

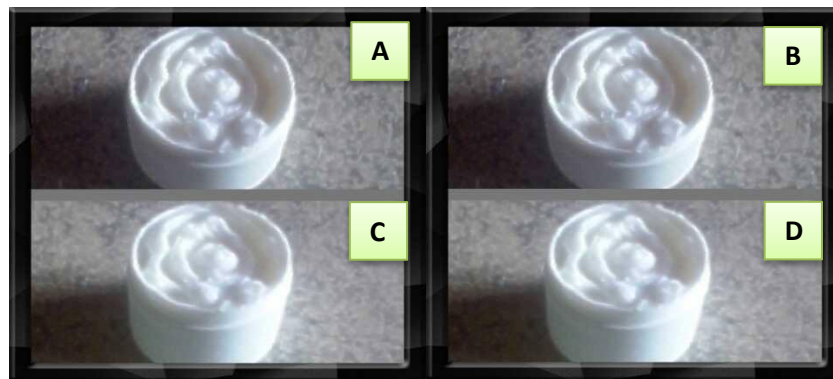


Figura 4 – Avaliação das formulações [Creme-gel c/extrato 5% (a); Creme-gel c/extrato 10% (b) e Creme-gel c/extrato 15% (c)] nos seguintes tempos determinados: após o preparo (A); após 7 dias de preparo (B); após 14 dias de preparo (C) e após 30 dias de preparo (D).

3.3.2 Avaliação da viscosidade das formulações semissólidas

A avaliação da viscosidade ajuda a determinar se um produto apresenta a consistência ou fluidez fornecendo informações do comportamento do produto ao longo do tempo (BRASIL, 2010). A viscosidade para o creme gel base e os incorporado com extrato da folha de canela nas concentrações de 5%, 10% e 15% estão expresso na tabela 3.

Tabela 3 – Resultados da Viscosidade das formulações semissólidas em estudo.

Formulação	Tempos de análise cp±DP		
	7 dias	14 dias	30 dias
CR-GB	15227± 878	14667 ± 890	16293±880
CR-GEX5%	7760 ± 450	6140 ± 435	6633±448
CR-GEX10%	7213 ± 332	6373 ±328	7200±320
CR-GEX15%	8000 ± 415	7167 ± 410	6600±420

Formulações: CR-GB: Creme-gel somente base; CR-GEX5%: Creme-gel c/extrato5%; CR-GEX10%: Creme-gel c/extrato10%; CR-GEX15%: Creme-gel c/extrato 15%

Os resultados correspondem a média da viscosidade em centipoise (cp) e elas se mantiveram durante o período de estudo sem diferenças estatísticas. A formulação base apresentou maior viscosidade. Houve uma diminuição da viscosidade da base quando comparada com a formulação que foi desenvolvida com o extrato de canela nas concentrações 5%, 10%, e 15%. Os extratos vegetais podem ser incorporados em diferentes formulações cosméticas e, dependendo da classe química de seus ativos, podem ser responsáveis pela atividade do produto. Assim como podem também alterar a forma farmacêutica e o comportamento reológico da preparação (ARCHONDO, 2003). O mesmo comportamento foi encontrado na formulação creme-gel contendo extrato de *Propolis Wax* não a apresentaram alterações bruscas quanto desempenho reológico, e devido a essa característica são amplamente utilizados como veículos (BITTENCOURT et al., 2014).

Extratos são preparações concentradas de consistência líquida e quando submetidas ao processo de liofilização, que consiste em retirar o solvente da amostra, tornam-se secos por sublimação de água a pressão inferior, em misturas solidificadas ou congeladas sem sofrer desnaturação do produto final. Dependendo da droga vegetal, não apresenta ao final uma aparência de pó seco e sim com cristais que podem ser açúcares da espécie, esses quando são incorporados em formulações podem alterar a viscosidade devido a essa característica do extrato obtido pelo presente trabalho (POMBEIRO, 1980).

3.3.3 Avaliação da espalhabilidade das formulações semissólidas

A espalhabilidade das amostras foi determinada acompanhada em relação à estabilidade, durante os 30 dias, a qual foi submetida à temperatura de $(25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C})$. Foram analisadas a espalhabilidade do creme-gel base e as formulações creme-gel contendo o extrato de *C. zeylanicum*.

Tabela 4 – Resultados da espalhabilidade das formulações semissólidas em estudo.

Formulação	Tempo de análise mm ± DP		
	7dias	14 dias	30 dias
CR-GB	14127± 853	12667 ± 845	11291±823
CR-GEX5%	7160 ± 450	6889 ± 425	6633±418
CR-GEX10%	7211 ± 332	7209 ±318	7200±320
CR-GEX15%	8000 ± 415	8010 ± 410	8019±420

Formulações: CR-GB: Creme-gel somente base, CR-GEX5%: Creme-gel c/extrato5%, CR-GEX10%: Creme-gel c/extrato10%, e CR-GEX15%: Creme-gel c/extrato 15%.

Os resultados correspondem à média da espalhabilidade em centipoise (mm) e se mantiveram com pequenas alterações, não apresentando valores diferentes significativos estatisticamente. A formulação base apresentou maior espalhabilidade. Houve uma diminuição da espalhabilidade da base quando o extrato de canela nas concentrações 5%, 10%, e 15%. O mesmo comportamento foi encontrado na formulação creme-gel contendo extrato de *Propolis Wax* não a apresentaram alterações significativos estatisticamente possuindo propriedades adequadas quanto à espalhabilidade para o uso tópico, pois se deformam facilmente quando aplicados (BITTENCOURT et al., 2014).

3.4 Determinação das atividades das E-NTPDase e da E-ADA

A enzima E- NTPDase é responsável por hidrolisar nucleotídeos di e trifosfatados a seus monofosfonucleotídeos correspondentes no meio extracelular. O AMP gerado por essa enzima é apartir do ATP, então hidrolisado pela enzima E-nucleotidase à adenosina, que por sua vez é degradada até inosina pela enzima adenosina desaminase (GODING, 2000; ZIMMERMANN, 2001; YEGUTKIN, 2008). A atividade dessas enzimas tem importante papel na manutenção da homeostasia normal, prevenindo a excessiva agregação plaquetária e estando relacionadas à resposta inflamatória, à disfunção endotelial e à consequente geração de lesão aterosclerótica (YEGUTKIN, 2008).

A primeira NTPDase identificada foi a NTPDase-1, como proteína CD39, que está ancorada à membrana via dois domínios transmembrana e que hidrolisa os nucleotídeos ATP e ADP em proporções semelhantes (ZIMMERMANN, 2001). A NTPDase-1 é um marcador de ativação de linfócitos, sendo também expressa em neutrófilos, monócitos, células dendríticas e em um subconjunto de células T ativadas. Através da modulação da sinalização purinérgica a enzima desempenha um papel importante no controle da resposta imune celular

(DEAGLIO et al., 2007; ROBSON et al., 2006). Dessa forma foi avaliada a hidrólise de nucleotídeos da adenina pela E-NTPDase em linfócitos de ratos com dermatite de contato tratados com creme-gel, creme-gel contendo extrato de *C. zeylanicum* nas concentrações 5%, 10% e 15% e dexametasona.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram um aumento na atividade da E-NTPDase para o nucleotídeo ATP no grupo com Cr Gel, Dex, 5 e 10% de extrato quando comparado ao o grupo controle. Estudos sugerem que as respostas inflamatórias resultam da liberação de ATP e ADP pela sensibilização dos queratinócitos, funcionando como mediadores imunológicos, estimulando os linfócitos T a liberarem citocinas pró-inflamatórias. Esse processo seria regulado pela E- NTPDase através da hidrólise do ATP e ADP em AMP (KÜNZLI et al., 2008).

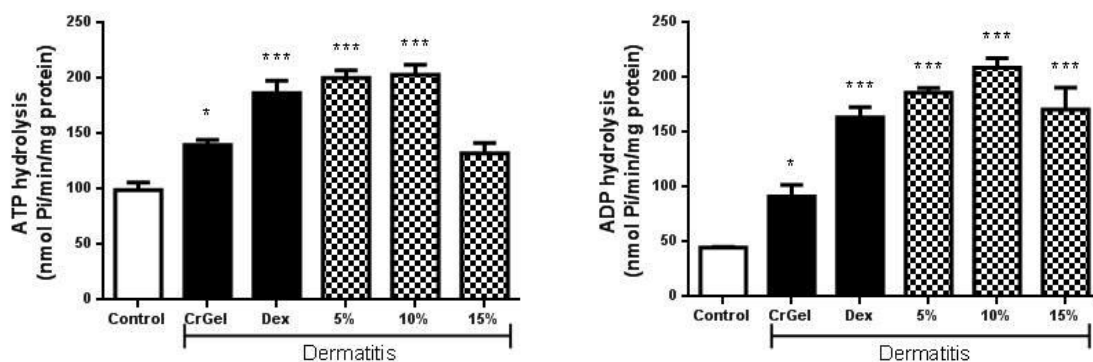


Figura 5 – Hidrólise do ADP e ATP pela E-NTPDase em linfócitos

Grupo controle S/dermatite; CrGel Creme-gel base; Dex: dexametasona, 5%:Creme-gel C/5% de extrato de *C. Zeylanicum*; 10%: Creme-gel C/10% de extrato de *C. Zeylanicum* e15%: Creme-gel C/15% de extrato de *C. Zeylanicum*, As barras representam à média \pm EPM de atividade em nmol de Pi/min/mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$) para letras diferentes, ($n = 5$).

Considerando que em um processo patológico, como a dermatite de contato, ocorre uma liberação de altas concentrações de ATP no meio, logo o aumento da atividade da E-NTPDase no grupo CrGel conduz à hidrólise dos nucleotídeos ATP na tentativa de reduzir a concentração deste nucleotídeo, já que o ATP liberado para o meio extracelular em altas concentrações ativa os receptores pró-inflamatórios purinérgico tipo P2 e contribui para danos nos tecidos e inflamação (DI VIRGILIO, 1995). Desse modo os resultados aqui descritos sugerem a presença de processo inflamatório de hipersensibilidade, onde há ativação dos linfócitos T, sendo responsáveis pela atividade aumentada da enzima, que de acordo com outros trabalhos poder ser desencadeados por agentes irritantes, como na dermatite de contato.

Nos grupos com dermatite de contato tratados com creme-gel de diferentes concentrações, pode-se observar que estes apresentaram um aumento na atividade da E-NTPDase em relação ao grupo controle e o grupo CrGel corroborando com os resultados encontrados na literatura com a utilização deste mesmo protocolo (BRUM et al., 2009; FONTANA et al., 2011).

Deste modo, foram observados resultados semelhantes a dexametasona, nos quais a atividade da E-NTPDase foi maior nos grupos tratados (figura 5), quando utilizadas as formulações creme-gel contendo 5% e 10% de extrato de *C. zeylanicum*. Estes resultados sugerem uma possível atividade anti inflamatória do extrato, semelhante a atividade da dexametasona.

A E-ADA é uma enzima reguladora da proliferação e diferenciação dos linfócitos e monócito-macrófagos no sistema imune, e alterações em sua atividade têm sido consideradas um indicador de distúrbios imunológicos (HITOGLU et al., 2001; POURSHARIFI et al., 2009). Na Figura 6, pode-se observar que o grupo CrGel apresentou maior atividade da enzima, reduzindo a concentração de adenosina, um anti-inflamatório endógeno, contribuindo para o processo inflamatório. Já para os grupos das formulações creme-gel contendo 5%, 10% e 15% de extrato de *C. zeylanicum* tratados foi observada uma menor atividade, mostrando-se semelhantes ao grupo controle. Sendo assim, todos os tratamentos com o extrato *C. zeylanicum* diminuíram a atividade da E-ADA a níveis semelhantes ao controle sem dermatite, provavelmente na tentativa de aumentar as concentrações extracelulares de adenosina, a qual possui efeitos anti-inflamatórios. A dexametasona não apresentou esse efeito, permanecendo com níveis semelhantes aos dos animais não tratados.

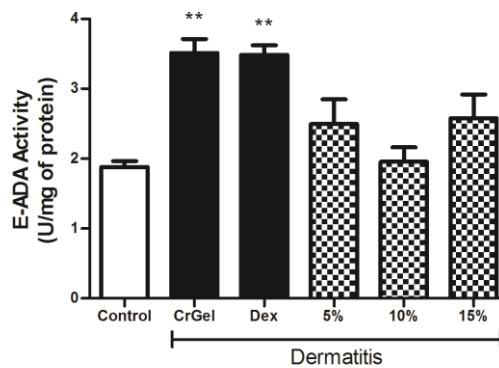


Figura 6 – Atividade da E-ADA em linfócitos

Grupo controle S/dermatite; CrGel Creme-gel base; Dex: dexametasona, 5%:Creme-gel C/5% de extrato de *C. Zeylanicum*; 10%: Creme-gel C/10% de extrato de *C. Zeylanicum* e15%: Creme-gel C/15% de extrato de *C. Zeylanicum*, As barras representam à média \pm EPM de atividade em U/Lde Pi/min/mg de proteína. ANOVA seguido pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$).

4 CONCLUSÃO

O extrato de *C. zeylanicum* apresenta em sua composição fitoquímica compostos como hidróxicumarina e cinamaldeído e mantém-se estável aos parâmetros físico-químicos para aplicação tópica. Sugere-se uma possível ação antiinflamatória *in vivo* uma vez que apresentou os mesmos efeitos da dexametasona sobre a atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA no modelo de dermatite de contato. Dessa forma a formulação desenvolvida com o extrato de *C. zeylanicum* neste trabalho, configura-se como uma nova plataforma para a obtenção de um fitoterápico destinado para o tratamento tópico de doenças inflamatórias.

5 REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, E. R. 1993. **Plantas Medicinais Brasileiras**. São Paulo: Hemus (Eds.), 341p.

ALVES, M. P. et al. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2006.

ARCHER, A. W. Determination of cinnamaldehyde, coumarin and cinnamyl alcohol in cinnamon and cassia by highperformance liquid chromatography. **J. Chromatogr.** v. 447, p. 272-276, 1988.

ARCHONDO, A. E. D. L. **Sistematização do desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo extrato de Centella asiática L.** (Urban). [Tese] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP; 2003.

BITTENCOURT1, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. M.; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semisólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, 2014.

BONNEVILLE, M.; CHAVAGNAC, C.; VOCANSON, M. et al. Skin Contact Irritation Conditions the Development and Severity of Allergic Contact Dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 127, p. 1430-1435, 2007.

BORGHETTI, G. S.; KNORST, M. T. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 4, p. 531-537, 2006.

BOURS, M. J. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 2, p. 358-404, 2006.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplementum**, v. 97, p. 77-89, 1968.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 5. ed. v. 2, p. 718-723, 2010.

BRUM, L. M. et al. Atividade da NTPDase de linfócitos na dermatite de contato antes e após tratamento com dexametasona nanoestruturada. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 876-884, 2009.

CASOTI, R. **Estudo farmacognóstico de *Dithecotenum echinatum* (Jacq.) Baill. 2012**. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêutica)-Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêutica, Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

CHAN, K. M.; DEIFERT, D.; JUNGER, K. D. A direct colorimetric assay for the Ca²⁺ ATPase activity. **Anal Biochem**, v. 157, n. 2, p. 375-380, 1986.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Vol I, Fundação Calouste Gulbenkian (3. ed.), Lisboa. 295 p. 1975.

COSTA, A. D.; MACHADO, S.; SELORES, M. Corticóides tópicos. Considerações sobre a sua aplicação na patologia cutânea. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 21, p. 367-373, 2005.

DATTNER, A. M. Herbal and complementary medicine in Dermatology. **Dermatol Clin**; v. 22, n. 3, p. 325-332 2004.

DEAGLIO, S. et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, p. 1257-1265, 2007.

DIAS, V. L. N. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** João Pessoa, PB: 2009. Originalmente apresentada como tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 2009.

DINIZ, M. F. M. **Ensaio toxicológicos pré-clínicos com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl.** Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. **Drug Development Research**, v. 59, p. 171-174, 2003.

DI VIRGILIO, F. The P2Z purinoreceptor: An intriguing role in immunity, inflammation and cell death. **Immunology Today**, v. 16, p. 524-528, 1995.

FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

GIUSTI, G.; GALANTI, B. **Methods of Enzymatic Analysis.** Verlag Chemie, Weinheim, p. 315-323. 1984.

GODING, J. W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 67, p. 285-311, 2000.

HEWITT, H.; WHITTLE, S.; LOPEZ, S.; BAILEY, E.; WEAVER, S. Topical use of papaya in chronic skin ulcer therapy in Jamaica. **West Indian Med**, v. 49, n. 1, p. 32-33, 2000.

HITOGLU, S. et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 411-416, 2001.

HSU, S. Green tea and the skin. **J Am Acad Dermatol**; v. 52, n. 6, p. 1049-1059, 2005.

IZUMI, T.; SAITO, M.; OBATA, A.; ARII, M.; YAMAGUCHI, H.; MATSUYAMA, A. Oral intake of soy isoflavone aglycone improves the aged skin of adult women. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**; v. 53, n. 1, p. 57-62, 2007.

KAPLAN, D. H.; IGYÁRTÓ, B. Z.; GASPARI, A. A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 114-124, 2012.

KERMASHA, S.; GOETGHEBEUR, M.; MONFETTE, A.; METCHE, M.; ROVEL, B. Inhibitory effects of cysteine and aromatic acids on tyrosinase activity. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, p. 349-353, 1993.

- KIM, D.; KIM, C.; KIM, M. et al. Suppression of age-related inflammatory NF- κ B activation by cinnamaldehyde. **Biogerontology**, v. 8, p. 545-554, 2007.
- KÜNZLI, B. M. et al. Disordered pancreatic inflammatory responses and inhibition of fibroses in CD39-null mice. **Gastroenterology**, v. 134, p. 292-305, 2008.
- LEAL, D. B. R. et al. HIV infection is associated with increased NTPDase activity that correlates with CD39-positive lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1746, p. 129-134, 2005a.
- LIMA, M. P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, 2005.
- LUO, W.; STRAVERS, J.; DUFFIN, K. Lessons Learned from Using a Web-based Interactive Landform Simulation Model (WILSIM) in a General Education Physical Geography Course, **Journal of Geoscience Education**, v. 53, p. 489-493, 2005.
- MACHADO, M. A. N.; CONTAR, C. M. M.; BRUSTOLIM, J. A.; CANDIDO, L.; AZEVEDO-ALANIS, L. R.; GREGIO, A. M. T.; TREVILATTO, P. C.; DE LIMA, A. A. S. Management of two cases of desquamative gingivitis with clobetasol and *Calendula officinalis* gel. **Biomedical Papers**, v. 154, n. 4, p. 335-338, 2010.
- PAJONK, F.; RIEDISSER, A.; HENKE, M. McBRIDE, W.; FIEBICH, B. The effects of tea extracts on proinflammatory signaling. **BMC Med**, v. 1, n. 4, p. 28, 2006.
- POMBEIRO, A. J. L. Técnicas e operações unitárias em química laboratorial. Lisboa; **Fundação Calouste Gulbenkian**, 1980, p. 345.
- POURCHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 e ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13, p. 1438-1443, 2009.
- RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 275-284, 2013.
- RICHARDSON, J.; SMITH, J. E.; MCINTYRE, M.; THOMAS, R.; PILKINGTON, K. Aloe vera for preventing radiation-induced skin reactions: a systematic literature review. **Clin Oncol (R coll Radiol)**, v. 17, n. 6, p. 478-484, 2005.
- RIGO, L. A. et al. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 10, p. 1387-1391, 2012.
- ROBSON, S. C.; SÉVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationship and pathophysiological significance. **Purinergic Signalling**, v. 2, n. 2, p. 409-430, 2006.
- ROCHA, N.; HORTA, M.; SELORES, M. Terapêutica Tópica em Dermatologia Pediátrica. **Nascer e Crescer—Revista do Hospital de Crianças Maria Pia**, v. 13, n. 3, 2004.

ROVERONI-FAVARETTO, L. H. D.; LODI, K. B.; ALMEIDA, J. D. Topical *calendula officinalis* L. successfully treated exfoliative cheilitis: a case report. **Cases Journal**, v. 2, n. 9077, 2009.

ROWLAND, T. L.; MCHUGH, S. M.; DEIGHTON, J. et al. Differential effect of thalidomide and dexamethasone on the transcription factor NF-kappa **B. Int Immunopharmacol**, v. 1, p. 49-61, 2001.

SAINT-MEZARD, P.; BERARD, F.; DUBOIS, B. et al. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact Dermatitis. **Eur J Dermatol**, v. 14, p. 131-138, 2004.

SCHMID-WENDTNER, M. H.; KORTING, H. C. The PH of the skin surface and its impact on the barrier function". **Skin pharmacology and physiology**, v. 19, n. 6, p. 296-302, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864974>. Acesso em: 15 de agosto de 2013.

SILVA, R. M. L.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M. B. Medicinal plants and pharmaceutical technology. In: CECHINEL FILHO, V. **Plant bioactives and drug discovery: principles, practice and perspectives**. New Jersey: John Wiley e Sons, 2012, p. 359-393.

STARLEY, I. F.; MOHAMMED, P.; SCHNEIDER, G.; BICKLER, S. W. The treatment of paediatric burns using topical papaya. **Burns**; v. 25, n. 7, p. 636-639, 1999.

VASCONCELOS, E. M. Dispositivos associativos de luta e empoderamento de usuários, familiares e trabalhadores em saúde mental no Brasil. **Vivência**, n. 32, Natal, Ed. UFRN, 2007.

WANG, H-F.; WANG, Y-K. YIH, K-W. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, p. 509-522, 2008.

YEGUTKIN, G. G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recente developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

5 DISCUSSÃO GERAL

Quanto aos parâmetros de controle de qualidade das drogas vegetais e mesmo quando são tratadas adequadamente podem apresentar material de origens diversas, como outras partes da planta, restos de outros vegetais ou mesmo areia e terra. De acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) os limites preconizados para a presença de impurezas em drogas vegetais não pode exceder 2%. Para *C. zeylanicum* foi encontrado 0,02% de impurezas valor dentro dos limites e especificações, caracterizando a qualidade da amostra.

Com relação ao índice de intumescência que fornece os teores de mucilagem da droga, o valor encontrado em *C. zeylanicum* foi de 15,10 ml. Esse índice pode ser diferente para outros estudos variando de acordo com a planta determinada como, por exemplo, foi observado por Frasson e colaboradores (2003) com *Caesalpinia ferrea* que encontrou o índice de intumescimento de 1,5 mL, valor inferior do encontrado para *C. zeylanicum* sugerindo a presença de mucilagem no material vegetal analisado.

A determinação de água em drogas vegetais de acordo com os parâmetros farmacopéicos o qual não deve ser superior a 14% pode possibilitar um adequado estado de conservação. Essa determinação pode ser obtida pelo método gravimétrico sendo esse utilizado pelo presente trabalho e o resultado obtido para *Cinnamomum Zeylanicum*, foi 9,05% denotando estar de acordo com os compêndios oficiais. A amostra nesse quesito estaria de acordo com o permitido, ou seja, ideal para que fungos e bactérias, além das próprias enzimas do vegetal, não atuem devido à baixa atividade de água (RODRIGUES; SANDINI; PEREZ, 2010).

Ainda sobre a avaliação dos parâmetros de qualidade foi determinado o teor de cinzas totais de *Cinnamomum zeylanicum* e apresentou um valor de 2,16%, um valor relativamente baixo que denota cuidado na coleta e nos processos de secagem e armazenamento, uma vez que esse valor deve ser considerado juntamente com o percentual de elementos estranhos. As cinzas insolúveis em ácido clorídrico de *Cinnamomum zeylanicum* (0,67%) estão dentro dos teores aceitos pela Farmacopéia Brasileira 2010 que permite um valor de até 1%. As cinzas insolúveis podem indicar contaminação ambiental ou presença de substâncias silicosas, areia e terra silícea.

Quanto à análise fitoquímica a partir da detecção de compostos de metabolismo secundário, os extratos das folhas de *C. zeylanicum* revelou a presença de polifenóis, taninos e flavonóides. Os polifenóis e flavonoides dosados no extrato desta espécie foram superiores aos valores para taninos. Dias (2009) verificou os mesmos grupos de compostos presentes nos

extratos das folhas de *C. zeylanicum* como saponinas, dos heterosídeos fenólicos simples e dos flavonoides. Dentro do grupo dos heterosídeos fenólicos simples encontram-se derivados de fenilpropanoides, como o eugenol e o aldeído cinâmico.

Além disso, as dosagens de metabólitos secundários de *C. zeylanicum* apresentaram altos teores de polifenóis, flavonoides e taninos. Para outra espécie o extrato hidroetanólico das folhas de *Annona squamosa*, foram encontrados altos teores em relação à concentração de polifenóis totais, flavonoides totais e taninos condensados (BRITO et al., 2008). Estas substâncias são conhecidas por apresentarem relevantes atividades, devido ao seu poder antioxidante, anti-inflamatório, anti-aterogênico, antitrombótico, antimicrobiano, vasodilatador e analgesia (WOLLGAST2 et al., 2000).

O potencial antioxidante do extrato bruto de *C. zeylanicum* foi de 92,99% semelhante ao ácido ascórbico 98,99% nas concentrações 100 µg/mL. Esse resultado demonstra que a planta em estudo mais eficiente quando comparada com *Arctium lappa* (90,79%) (LIMA et al., 2006). Esta maior atividade possivelmente é devido aos polifenóis e flavonóides. Estudos in vitro e in vivo também demonstram que alguns compostos antioxidantes presentes em plantas, como os flavonóides, apresentam atividade antiinflamatória marcante, o que tem despertado grande interesse na investigação destes compostos como agentes antiinflamatórios (HERNANDEZ et al., 2007; CALIXTO et al., 2003).

Em um estudo avaliaram a capacidade antioxidante e a atividade de eliminação de radicais livres demonstrando atividade do extrato metabólico das folhas de *Cinnamomum verum*. Neste estudo, foi observada intensa atividade frente a radicais livres, especialmente pelo método de DPPH (125 µg/3mL) e ABTS (concentrações acima de 75 µg/1,1 mL), resultando em um promissor uso frente a inibição da peroxidação lipídica em emulsões de ácido linoleico (MATHEW et al., 2006).

A atividade antimicrobiana de *C. zeylanicum* apresentou maior atividade antibacteriana contra as bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae* 32 µg/mL. Para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentou MIC 64 µg/mL de inibição no crescimento do microrganismo para as bactérias. Segundo um estudo realizado, a atividade antibacteriana do de *C. zeylanicum* avaliado em diversas concentrações obteve-se uma inibição para as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae* de 56 µg/mL. Esse resultado pode ter sido influenciado por vários fatores, entre eles, a concentração de flavonoides e taninos que apresentam a habilidade de inativar enzimas e complexarem-se com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias, configurando os prováveis mecanismos de sua ação antimicrobiana (MENDES et al., 2011; GONÇALVES et al., 2000; SILVA et al., 2012).

Nesse sentido, a atividade antimicrobiana observada pode ser atribuída aos produtos do metabolismo secundário, como terpenóides e compostos fenólicos, sendo os flavonoides e saponinas, que em sua forma pura também exibem ação antimicrobiana. Com isso, a diferença dos achados de atividade antimicrobiana descritos na literatura sobre plantas pode estar relacionada com a quantidade de cada princípio ativo presente nos extratos, o uso de técnicas e procedimentos diferentes, bem como a época do ano em que foi feita a colheita do material (FERNANDES et al., 2011).

Além da atividade antimicrobiana, o efeito antígeno-tóxico também foi avaliado sendo realizado a partir de análise de reversão do dano genotóxico induzido por peróxido de hidrogênio em cultura de leucócitos humanos tratados com extrato de *C. zeylanicum*. Os parâmetros antígeno-tóxicos utilizados para avaliar essa atividade foram: a proliferação celular, inviabilidade celular, índice de dano ao DNA e frequência de micronúcleos. Quanto aos resultados para a proliferação celular, as concentrações de CzE1 $\mu\text{g/mL}$, CzE10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento celular similar ao controle negativo (PBS7,2) e diferente em relação ao controle positivo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) enquanto que a concentração mais alta CzE100 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou um decréscimo na proliferação celular, o qual pode ser comparado ao controle positivo (H_2O_2).

Para a determinação da porcentagem de células inviáveis para ambos os grupos controle e para as três concentrações de extrato testadas. O controle negativo apresentou apenas 93,67% de células inviáveis enquanto que o controle positivo foi de 65,67%. As menores concentrações de extrato CzE 1 $\mu\text{g/mL}$ e CzE 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram 91,33% e 86,67% de células inviáveis. Já na mais alta concentração de extrato CzE 100 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou um decréscimo. De acordo com Collins e colaboradores (2008), a alta viabilidade de células é requerida como uma condição prévia para que se tenha um bom desempenho no ensaio cometa.

O ensaio cometa é um dos ensaios genotóxicos mais promissores e foi desenvolvido para determinar e analisar o dano causado ao DNA, utilizando células isoladas (MUKHOPADHYAY et al., 2004). O teste foi utilizado como um parâmetro para avaliar o índice de dano ao DNA. Todas as concentrações CzE 1 $\mu\text{g/mL}$, CzE 10 $\mu\text{g/mL}$ e CzE 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram baixo índice de dano 5,55%, 6,66% e 13% ao ser comparado com o controle positivo que apresentou 30,33%.

Foi avaliado também neste trabalho o teste do micronúcleo que fornece um índice confiável que representa perdas ou quebras cromossômicas. O micronúcleo é expresso em células no processo de divisão, as quais possam conter quebras cromossômicas com falta de

centrômeros (fragmentos acêntricos) e/ou cromossomos inteiros, porém, que não são capazes de migrar para os pólos durante a mitose (FENECH, 2000). A frequência de micronúcleos não foi dose-dependente, ou seja, todas as concentrações de extrato de canela apresentaram baixa frequência de micronúcleos.

A atividade antígeno-tóxica observada pode ser atribuída também aos carotenoides (vitamina A e licopeno), flavonoides, alcaloides, compostos fenólicos (curcumina), ácido ascórbico (vitamina C), ácido elágico, ácido gálico, ácido tânico, ácido oleanólico, ácidos graxos insaturados, dentre outros (SASAKI et al., 1994; ANDERSON et al., 1995; NAKASUGI; KOMAI, 1998; SIPPEL et al., 1998; ANTUNES; ARAÚJO, 2000; NEJI et al., 2005; GUTERRES, 2009; BERNI et al., 2012; MARCHIORI et al., 2013).

Na composição química do extrato de *C. zeylanicum* foi analisada a presença de Hidróxicumarina e Cinamaldeído. O extrato foi analisado por cromatografia em condições semelhantes aos padrões comerciais obtendo-se o tempo de retenção de 2,5 e 5,6 min de hidróxicumarina e cinamaldeído, respectivamente.

A partir do desenvolvimento da primeira parte do presente trabalho foi possível propor uma formulação semissólida contendo *C. zeylanicum* a partir do extrato obtido das folhas. Para isso, cremes-géis foram preparados com diferentes concentrações (5, 10 e 15%) e caracterizados quanto ao pH, viscosidade e espalhabilidade. Os valores de pH obtidos das formulações em geral encontraram-se na faixa de 6,50 à 5,7, compatíveis com a aplicação tópica (BRASIL, 2010). A incorporação do extrato de *C. zeylanicum* a base ocasionou uma diminuição do pH, e pode estar relacionada ao pH do extrato 4,5. Outra pesquisa encontraram valores de pH para bases Lanette®, Hostacerin® e Polawax®, de 6,3, 6,3 e 6,1, respectivamente (BITTENCOURT et al., 2014).

Quanto a viscosidade se manteve com pequenas alterações, não apresentando valores significativos estatisticamente. A formulação base apresentou maior viscosidade, quando comparados com viscosidade da base contendo o extrato de canela nas concentrações 5%, 10%, e 15%. A espalhabilidade durante o período de 30 dias de análise do creme-gel base e da formulação contendo o extrato mantiveram sem alterações significativas. O mesmo comportamento foi encontrado na formulação creme-gel contendo extrato de *Propolis Wax* uma vez que não apresentaram alterações quanto desempenho reológico, e devido a essa característica são amplamente utilizados como veículos. As formulações semissólidas possuem propriedades adequadas quanto à espalhabilidade para o uso tópico, pois se deformam facilmente quando aplicados. No caso das formulações testadas, uma pequena

tensão é capaz de diminuir acentuadamente a viscosidade. Desta forma, o material flui com facilidade (BITTENCOURT et al., 2014).

Por fim, foi avaliado a atividade antiinflamatória *in vivo* dos géis-creme utilizando o modelo experimental de dermatite de contato. Nesse estudo, avaliou-se a atividade da E-NTPDase e da E-ADA. Para melhor comparação, além da formulação base creme-gel, foram preparadas formulações com extrato nas concentrações 5%, 10% e 15% e com dexametasona 0,05%.

Quanto à atividade da E-NTPDase, que serve como marcador de ativação linfocitária, os resultados mostraram um aumento na atividade da E-NTPDase para os grupos tratados com a formulação creme-gel contendo 5% e 10% de extrato de *C. zeylanicum* apresentando atividade similar ao grupo tratado com dexametasona quando comparado ao grupo creme-gel (CrGel) e o grupo controle, corroborando com os resultados encontrados na literatura com a utilização deste protocolo (BRUM et al., 2009; FONTANA et al., 2011). A maior atividade da E-NTPDase pode ser estimulada por um aumento na concentração do ATP extracelular.

A ADA é uma enzima essencial para a proliferação e diferenciação dos linfócitos e monócito-macrófago no sistema imune, e alterações em sua atividade têm sido consideradas um indicador de distúrbios imunológicos (HITOGLU et al., 2001; POURSHARIFI et al., 2009). Pode-se observar que o grupo tratado com dexametasona quando comparado ao grupo creme-gel (CrGel) apresentou maior atividade da enzima. Já para os grupos tratados com a formulação creme-gel contendo 5% e 10% de extrato de *C. zeylanicum* foi observada uma diminuição, mostrando-se semelhantes ao grupo controle. Sendo assim, todos os tratamentos reverterem à atividade da enzima, ou previnem.

6 CONCLUSÕES

- Na análise fitoquímica do extrato etanólico, das Folhas de *C. zeylanicum* identificou-se de metabolitos como alcalóides, saponina, flavonoides e cumarinas. Na composição a espécie apresentam teores de compostos fenólicos, flavonóides e taninos.
- Os parâmetros físico-químicos preconizados pela Farmacopeia Brasileira permitem estabelecer parâmetros de qualidade para *C. zeylanicum*.
- Hidróxicumarina e Cinamaldeido identificados nas folhas de canela por CLAE.
- O extrato das folhas de *C. zeylanicum*, apresentou uma expressiva atividade antioxidante devido à presença de fenólicos encontrados. Como também apresentou forte capacidade de redução de sequestro de radicais livres do DPPH sendo mais eficaz que o controle positivos quercetina e ácido ascórbico com atividade antioxidante já conhecidos .
- Na avaliação dos parâmetros genotóxicológicos, todas as concentrações do extrato de *C. zeylanicum* apresentaram-se eficácia revertendo o dano genotóxico causado pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em todos os testes aplicados, porém torna-se necessário destacar que as concentrações correspondente ao valores (CzE1µg/mL e valor CzE10µg/mL) que sobressaíram nos resultados sendo protetores que os controles.
- O extrato de *C. zeylanicum* apresentou através do estudo dos valores de CIM observou-se atividade antibacteriana eficiente frente às bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae* 32 µg/mL. Para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentou 64 µg/mL de inibição no crescimento dos microrganismos. Os resultados do presente trabalho ressalva o papel antimicrobiano desta espécie vegetal, sugerindo-a como possível utilização como antimicrobiano natural.
- A formulação creme-gel base e as contendo concentrações de 5%, 10% e 15% extrato de *C. zeylanicum* apresentaram resultados satisfatórias quanto as características organolépticas, pH, espalhabilidade, propriedades reológica
- O ensaio *in vivo* da dermatite de contato demonstrou que a formulação creme-gel nas concentrações 5% e 10% de extrato de *C. zeylanicum* demonstraram melhor eficácia quanto a atividade dermatológica que o fármaco acetato de dexametasona, já comercializado, comprovando a atividade anti-inflamatória do extrato das folhas de

canela em formulação tópica sendo como uma nova plataforma para a obtenção de um fitoterápico destinado para o tratamento tópico de doenças inflamatórias.

- Considerando os dados obtidos, é interessante aprofundar a investigação das atividades biológicas das folhas de *C. zeylanicum*, especialmente procederem à avaliação da capacidade antioxidante *in vivo* e através de outras metodologias, além de realizar a elucidação estrutural de principais compostos isolados responsáveis por tal atividade.
- Nossos resultados sugerem que a canela o pode agir como antígeno tóxica surgindo como uma possível alternativa no tratamento médico, no entanto, são necessários estudos de farmacodinâmica para avaliar sua atividade *in vivo*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. Cadernos Temáticos da **Química Nova na Escola**. São Paulo, v. 3 n. 5, p. 10-15, 2001.
- ANDERSON, A. A. Chromium and polyphenols from cinnamon improve insulin sensitivity. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 67, p. 48-53, 2008.
- ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, A.; EDWARDS, A. J. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in vitro and in vivo genotoxic assays. **Mutation Research**, v. 329, p. 37-47, 1995.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, 2000.
- ASONGALEM, E. A.; FOYET, H. S.; NGOGANG, J.; FOLEFOC, G. N.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Erigeron floribundus* **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 301-308, 2004.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARRY, B. H. Breaching the skin barrier to drugs. **Nat. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 165-167, 2004.
- BASILE, A.; SORBO, S.; GIORDANO, S.; RICCIARDI, L.; FERRARA, S.; MONTESANO, D.; CASTALDO COBIANCHI, R.; VUOTTO, M.; FERRARA, L. Antibacterial and allelopathic activity of extract from *Castanea sativa* leaves. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. S110-S116, 2000.
- BERNI, A.; GROSSI, M. R.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MUTHUKUMAR, S.; PAPESCHI, C.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. **Mutation Research**, v. 4, n. 746, p. 60-65, 2012.
- BITTENCOURT, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. M.; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semisólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, 2014.
- BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. Minnesota. 2001.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2v/il. 5. ed. p. 718-723, 2010. 852p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. Brasília: MMA/SBF. Brasília. 2012. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em 20 de out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portal da Saúde: Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME)**. 2013b. Disponível em: Acesso em: Fev. de 2015.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 2010. 416 p.

BRITO, H. O.; NORONHA, E. P.; FRANÇA, L. M.; BRITO, L. M. O.; PRADO, M. S. A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa*. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BRUM, L. M. et al. Atividade da NTPDase de linfócitos na dermatite de contato antes e após tratamento com dexametasona nanoestruturada. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p. 876-884, 2009.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. Paris: Lavoisier. 1995.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds f plant origin. Part I. action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor KB (NF-KB). **Planta Medica**. v. 69, p. 973-983, 2003.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L sobre *cândida* spp. **Revista de odontologia da UNESP**, v. 39, n. 3, p. 179-184, 2010.

CATALAN, A. A. S.; GOPINGER, E.; LOPES, D. C. N.; GONÇALVES, F. M.; ROLL, A. A. P.; XAVIER, E. G.; AVILA, V. S.; ROLL, V. F. B. Aditivos fitogênicos na nutrição animal: *Panax ginseng*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, PT, p. 15-22, 2012.

CHIN, Y. W.; BALUNAS, M.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 2, p. 239-253, 2006.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

COLLINS, R. A.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, I.; GAIVÃO, L.; GIOVANNELLI, M.; KRUSZEWSKI, C. C. SMITH, R. "The comet assay: Topical issues," **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 143-151, 2008.

COOK, N.; SAMMAN, S. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v, 12 p. 564-582. 1999.

CUSHNIE, T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International journal of antimicrobial agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Ottawa: J. Wiley, 2002. 507 p.

DIAS, V. L. N. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn**. João Pessoa, PB: 2009. Originalmente apresentada como tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba, 2009.

EINBOND, L. S. et al. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28. Jan. 2004.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manole; 2001.

ETHUR, L. Z. et al. Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí-RS. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 121-128, 2011.

FERNANDES, A. P.; RIBEIRO, G. E.; RUFINO, L. R. A.; SILVA, L. M.; BORIOLLO, M. F. G.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Pyrostegia venusta* na mutagênese “in vivo”, e avaliação antimicrobiana, e interferência no crescimento e diferenciação celular “in vitro”. **Rev Med Minas Gerais**, v. 21, n. 3, p. 272-279, 2011.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, L. A.; LEITE, J. P. V. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 206-251, 2008.

FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 241-249, 2011.

FRANZENER, G.; MARTINEZ-FRANZENER, A. S.; STANGARLIN, J. R.; CZEPAK, M. P.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividades antibacteriana, antifúngica e indutora de fitoalexinas de hidrolatos de plantas medicinais. Semina: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 29-38, 2007.

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M. Caracterização físico-química e biológica do caule de *Caesalpinia ferrea* Mart. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 35-39, jan./jun. 2003.

GONCALVES et al. **A cura está na natureza: Medicina natural**. São Paulo: Editora Brasil. 2000; 21 p. 544.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p 1-93, 2006.

GUTERRES, Z. R. **Investigação das atividades Mutagênica, Antimutagênico e Antioxidante de extratos etanólicos de Aoiueatrineris, Nectandracissiflora, Ocoteaminarum (Lauraceae) e dos Alcalóides Triptofol, Ocoteína e Dicentrina**. 2009. 239f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, 2009.

HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. **Plantas Medicinai**s. São Paulo: Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente. Divisão Técnica Escola Municipal de Jardinagem, 2010.

HERNÁNDEZ, V.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; GINER, R. M.; RIOS, J. L. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. **Life Sciences**, v. 81, p. 480-488, 2007.

HITOGLU, S. et al. Adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in patients with juvenile rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Clinical Rheumatology**, v. 20, n. 6, p. 411-416, 2001.

HOSSEINZADEH, H.; YOUNESI, H. M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. **BMC Pharmacology**, v. 2 n. 7, p. 1-8, 2002.

JANTAN, I. B. Chemical composition of the essential oils of *Cinnamomum Cordatum* Kosterm. **Flavour Fragr J**, v. 17, p. 212-14, 2002.

JANTAN, I. B. The essential oils of *Cinnamomum rhyncophyllum* Miq. Os naturais sources of benzyl benzoate, safrole and methyl (E)-cinnamate. **Flavour Fragr J**, v. 19, p. 260-262, 2004.

JIRSCHITZKA, J.; SCHMIDT, G. W.; REICHEL, M.; SCHNEIDER, B. et al. Plant tropane alkaloid biosynthesis evolved independently in the Solanaceae and Erythroxylaceae. **Proc Natl Acad Sci, USA**. v. 109, n. 26, p. 10304-10309, 2012.

KIM, H. L.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. Y.; KIM, H. P. Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264.7 and Their structure-Activity Relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 759-765, 1999.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P Fitoterápicos: um mercado promissor. **Ver. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 30, p. 241-248, 2009.

LIMA, M. P. et al. Constituintes voláteis das folhas e dos galhos de *Cinnamomum zeylanicum* Blume (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 35, n. 3, 2005.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS N. M. P.; DE SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 197-201, 2006.

LIMA, S. G. V.; LIMA, A. F.; DONAZZOLO, J. L. Resgate do conhecimento popular e uso de plantas medicinais na promoção da saúde em Sananduva - RS. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 1, 2007.

LIMA, C. P. et al. Conteúdo polifenólicos e atividade antioxidante dos frutos da palmeira Juçara (*Euterpe edulis Martius*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 321-326, 2012.

LOCHER, C. P. et al. Anti-microbial activity and anti-complement activity of extracts obtained from selected Hawaiian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 23-32, nov. 1995.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Computação gráfica Osmar Gomes. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MACHADO, L. H. B. **Raizeiros de Goiânia: As representações entremeadas nos usos e nas redes de distribuição e comercialização das plantas medicinais em Goiânia – GO**. Dissertação (Mestre em Geografia). Instituto de Estudos Sócio-Ambientais/IESA – UFG, Goiânia, 2008.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. D. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. p. 33-39, 2008.

MACHADO, M. A. N.; CONTAR, C. M. M.; BRUSTOLIM, J. A.; CANDIDO, L.; AZEVEDO-ALANIS, L. R.; GREGIO, A. M. T.; TREVILATTO, P. C.; DELIMA, A. A. S. Management of two cases of desquamative gingivitis with clobetasol and *Calendula officinalis* gel. **Biomedical Papers**, v. 154, n. 4, p. 335-338, 2010.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 2, p. 263-275, 2007.

MANDALARI, G.; BENNETT, R.; BISIGNANO, G.; TROMBETTA, D.; SAIJA, A.; FAULDS, C.; GASSON, M.; NARBAD, A. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2056-2064, 2007.

MANGA, H. M.; BRKIC.; MARIE, D. E. P.; QUETI-LECLERCQ, J. *In vivo* anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach end Thon) Mull. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 209-214, 2004.

MARCHIORI, P. M.; FREITAS, P. R.; KALIL, I. C.; BRASIL, G. A.; RONCHI, S. N. Efeitos quimiopreventivo e antimutagênico in vivo do extrato hidroetanólico de frutos de *Carica papaya* L. **Revista Cubana de plantas medicinales**, v. 18, n. 3, p. 381-390, 2013.

MATHEW, S.; ABRAHAM, E. In vitro antioxidant activity and scavenging effects os Cinnamomum verum leaf extract assayed by different methodologies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 198-206, 2006.

MCSWEENEY, C. S.; PALMER, B.; MCNEILL, D. M.; KRAUSE, D. O. Microbial interaction with tannins; nutritional consequence for ruminants. **Animal Freed Science and Technology**, p. 91, p. 83-93, 2001.

MELLO, A. F. S.; MACHADO, A. C. Z.; INOMOTO, M. M. Potencial de controle da erva de- Santa-Maria sobre *Pratylenchus brachyurus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 513-516, 2006.

MENDES, S. M.; BOREGAS, K. G. B.; LOPES, M. E.; WAQUIL, M. S.; WAQUIL, J. M. Respostas da lagarta-do-cartucho a milho geneticamente modificado expressando a toxina Cry 1 A(b). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, p. 239-244, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, PNPIC, SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 92 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIN, E. L. C. Use patterns and Knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil s semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173-183, 2006a.

MORRISON, K. C.; HERGENROTHER, P. J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. **Natural Product Report**, 2013.

MUKHOPADHYAY, I.; CHOWDHURI, D. K.; BAJPAYEE, M.; DHAWAN, A. Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in drosophila melanogaster using the alkaline comet assay, **Mutagenesis**, v. 19, n. 2, p. 85-90, 2004.

NAKASUGI, T.; KOMAI, J. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal Plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 2560, 1998.

NEGI, A. S.; DAROKAR, M. P.; CHATTOPADHYAY, S. K.; GARG, A.; BHATTACHARYA, A. K.; SRIVASTAVA, V.; KHANUJA, S. P. S. Synthesis of a novel plant growth promoter from gallic acid. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 1243-1247, 2005.

OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. **A normatização de fitoterápicos no Brazil / Brazilian phytotherapeutic regulation**. Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas-UFPR. p. 1-13, dez., 2007.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte, MG. **Revista Brasileira de Planas Medicinai**s, v. 14, n. 2, p. 311-320, 2012.

- ONWUKAEME, N. D. Anti-inflammatory activities of flavonoids of *Baphia nítida* Lodd (Leguminosae) on mice ad rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 121-124, 1995.
- ORDÓÑEZ, A. A. L.; ORDÓÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 378, p. 51-58, 2009.
- ORHAN, D. D.; ÖZÇELIK, B.; ÖZGEN, S.; ERGUN, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 496-504, 2010.
- OUSSALAH, M. et al. Inhibitory e Vects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: E.coli O157:H7, Salmonella Typhimurium, Staphylococcus aureus and Listeria monocytogenes. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.
- OZAKI, A. T.; DUARTE, P. C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária em cães e gatos. **Infarma**, v. 18, n. 11/12, p. 17-25. 2006.
- PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A. D. B.; CHORGHAE, M. Ayurved and natural products drug Discovery. **Curr Sci**. v. 86, p. 789-99, 2004.
- PETTIT, R.; DIAS, R. Conversion of tetracyclic triterpenes to steroids. **Canadian of chemistry**, v. 47, p. 1091-1092, 1969.
- POURCHARIFI, P. et al. Adenosine deaminase in patients with primary immunodeficiency syndromes: the analysis of serum ADA1 e ADA2 activities. **Clinical Biochemistry**, v. 42, n. 13, p. 1438-1443, 2009.
- RAHMATULLAH, M. et al. A survey of medicinal plants in two areas of Dinajpur district, Bangladesh including plants which can be used as functional foods. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, n. 4, p. 862-876, 2009.
- RANASINGHE, P. et al. Medicinal properties of ‘true’cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*): a systematic review. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 275-284, 2013.
- RANE, M. M.; MENGI, S. A. Comparative effect of oral Administration and topical application of alcoholic extract of Terminalia arjuna bark on incision and excision wounds in rats. **Fitoterapia**, v. 74, p. 553-558, 2003.
- RANJBAR, A. et al. Antioxidative stress potential of Cinnamomum zeylanicum in humans: A comparative cross-sectional clinical study. **Therapy**, v. 3, n. 1, p. 113-117, 2006.
- RODRIGUES, R. M.; SANDINI, M. T.; PEREZ, E. Avaliação farmacognóstica de folhas de Eugenia uniflora L., Myrtaceae (Pitangueira), advindas da cidade de Guarapuava, PR. **Biosaúde**, Londrina, v. 12, n. 1/2, 2010.

ROVERONI-FAVARETTO, L. H. D.; LODI, K. B.; ALMEIDA, J. D. Topical Calendula officinalis L. successfully treated exfoliative cheilitis: a case report. **Cases Journal**, v. 2, n. 9077, 2009.

ROYER, A. F. B. **Capim cidreira (Cymbopogon citratus Stapf) na dieta hídrica pré abate de frangos de corte**. 2013. 102p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Grande Dourados – MS. Programa de pós-graduação em Zootecnia. Dourados, MS. 2013. 102p.

SALA, A.; RECIO, M. C.; SCHINELA, G. R.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; CERDANICOLAS, M.; RIOS, J. L. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. **European Journal of Pharmacology**, v. 461, p. 53-61, 2003.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evid Based complement Alternat Med**. v. 5, p. 1-12, 2008.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O.; GUERRA, M. P. et al. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. - primeira reimp. - Porto Alegre /Florianópolis: Editora da UFRGS/editora da UFSC, 1096. 2004.

SASAKI, Y. F.; SAKAGUCHI, M.; YAMAGISHI, T.; YAMADA, H.; SHIRASU, Y. Bioantitumor effects of unsaturated fatty acids included in fish oil - docosahexaenoic acid, docosapentaenoic acid, and eicosapentaenoic acid – in cultured Chinese hamster cells. **Mutation Research**, v. 320, n. 1/2, p. 9-22, 1994.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future microbiology**, v. 7, n. 8, p. 979-990, 2012.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de plantas medicinais no controle de doenças de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 554-556, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Extratos e óleos essenciais de plantas medicinais na indução de resistência. In: CAVALCANTI, L. S.; DI PIERO, R. M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S. F.; RESENDE, M. L. V.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógena e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. Cap. 5, p. 125-138.

SILVA, C. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXEIRA, H. Ação antimicrobiana de extratos de plantas medicinais sobre espécies fitopatogênicas de fungos do gênero Colletotrichum. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 57-60, 2008.

SILVA, R. M. L.; COUTO, A. G.; BRESOLIN, T. M. B. Medicinal plants and pharmaceutical technology, In: CECHINEL FILHO, V. **Plant bioactives and drug discovery principles practice and perspectives**. New Jersey: John Wiley e Sons, p. 359-393, 2012.

SILVA, T. L.; OLIVEIRA, L. L. D. S. S. Principais plantas medicinais utilizadas no tratamento de ectoparasitas. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO (JEPEX), 13. , 2013, Recife. **Anais eletrônicos**. Recife: UFRPE, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, Florianópolis: Ed. da UFSC, 6. Ed., p. 1102, 2010.

SIPPEL, C.; LEHMANN, M.; REGULY, M. L.; ANDRADE, H. H. R. O ácido tânico e sua relação com a anti ou co-genotoxicidade: dependência da sequência de administração e do metabolismo da genotoxina. In: **X Scientific Initiation Meeting**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

SLOWING, K.; CARRETERO, E.; VILLAR, A. Anti-inflammatory activity of leaf extracts of *Eugenia jambos* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p. 9-11, jun., 1994.

SMITH, D. B.; JACOBSON, B. H. Effect of a blend of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo –controlled, double-blind, multiclinical trials. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 10, n. 3, p. 147-156, 2011.

SOARES, D. G.; ANDREAZZAM, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SUGAMOTO, K.; MATSUSITA, Y.-I.; MATSUI, K.; KUROGI, C.; MATSUI, T. Synthesis and antibacterial activity of chalcones bearing prenyl or geranyl groups from *Angelica keiskei*. **Tetrahedron**, v. 67, n. 29, p. 5346-5359, 2011.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VESSALA, M.; HEMMATIA, M.; VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 135, p. 357-364, 2003.

WANG, H-F.; WANG, Y-K.; YIH, K-W. DPPH free-radical scavenging ability, total phenolic content, and chemical composition analysis of forty-five. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, p. 509-522, 2008.

WOLLGAST, J.; ANKLAN, E. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? **Food Research International, Essex**, v. 33, n. 6, p. 449-459, 2000a.