

**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO –**  
**PPGAD**  
**NÚCLEO DE ELETROFOTOQUÍMICA E MATERIAIS POLIMÉRICOS – NEMP**  
**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM NA VEICULAÇÃO DE**  
**FITOTERÁPICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA**  
***Arnica montana***

**Débora Giseli Urnau Cerutti**

**Lajeado, fevereiro de 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO –  
PPGAD  
NÚCLEO DE ELETROQUÍMICA E MATERIAIS POLIMÉRICOS – NEMP  
DISSERTAÇÃO

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM NA VEICULAÇÃO DE  
FITOTERÁPICOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA  
*Arnica montana***

Débora Giseli Urnau Cerutti

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Ambiente e  
Desenvolvimento para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador(a): Profa. Dra. Simone Stulp

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Périco

Lajeado, fevereiro de 2009

## DEDICATÓRIA

### *PAI*

As coisas que amamos,  
As pessoas que amamos são  
Eternos até certo ponto.  
Duram o infinito variável  
No limite do nosso poder  
De respirar a eternidade  
Pensá-las é pensar que não  
Acabam nunca, dar-lhe moldura de  
granito.  
De outra maneira se tornam absoluta,  
Numa outra (maior) realidade.

***Carlos Drummond de Andrade.***

Pela sua imensa capacidade de estimular a busca incansável de nossos sonhos, dedico mais este trabalho a você, a fim de que saiba que apesar da sua ausência, continuo sonhando e buscando.

## **AGRADECIMENTO**

A Deus que conhece o meu caminho e guia os meus passos;

A minha família: Adilson e Geórgia, mãe, irmãos e sobrinhos, por transmitirem tranqüilidade e dar suporte familiar, mas principalmente pelo amor, compreensão, incentivo e lealdade, virtudes que são ensinadas muito mais pelo exemplo do que pelos livros;

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Stulp, pela dedicação, exemplo profissional e principalmente paciência por ensinar técnicas analíticas a uma fisioterapeuta, em um laboratório de química;

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Périco, pela disponibilidade, valiosa colaboração na análise estatística dos dados e pelo exemplo de vida;

Ao Prof. Dr. Eduardo Ethur, pela amizade e auxílio no desempenho de várias tarefas ao longo do trabalho;

Aos estagiários Cristiano Pockmann da Silva e Sandro Marmitt;

A aluna e estagiária Paula Bianchetti, uma das principais responsáveis pela possibilidade de conclusão em tempo hábil deste trabalho, a qual agradeço profundamente o empenho e dedicação;

A colega e amiga Ana Graciela Ventura Antunes pela colaboração em todas as etapas da pesquisa, através de olhares críticos e sugestivos que permitiram o delineamento na construção dos resultados;

A minha coordenadora Prof<sup>a</sup> Ms. Magali Grave, pelo incentivo e apoio incondicional, além das acolhidas em sua residência semanalmente;

Ao coordenador e colega Prof. Ms. Dênis Barnes, por me incentivar a dar sequência ao seu trabalho envolvendo estudos sobre ultra-som;

A D & D (A casa do esteticista), que gentilmente cedeu o equipamento de ultra-som (dgm eletrônica) utilizado nos experimentos;

E, por fim, aos meus alunos, pelos quais dedico a minha vida profissional e busca pelo conhecimento.

## RESUMO

A *Arnica montana* é um fitoterápico comumente utilizado com fins medicinais devido ao efeito anti-inflamatório que possui. Da mesma forma, o equipamento de Ultra-som Terapêutico (UST) é utilizado na Fisioterapia para controlar sinais inflamatórios como dor e edema, além de, através da fonoforese, veicular substâncias através da pele devido a sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular, proporcionando desta forma, aumento da absorção de substâncias de uso terapêutico. Considerando os efeitos da *Arnica montana*, da técnica de fonoforese através do ultra-som e o desenvolvimento tecnológico de medicamentos de origem vegetal, o objetivo geral da presente pesquisa é investigar o potencial de degradação da *Arnica montana* quando submetida ao uso de UST, através de fonoforese, por meio de técnicas de espectrofotometria, voltametria cíclica e amperometria. Para esta análise, foram utilizadas amostras de extrato glicólico de *Arnica montana* na diluição de 100 mL/L. O ultra-som foi aplicado no modo contínuo e pulsado (a 100 Hz com ciclos de duração de pulso de 20%) na intensidade de 1,0 W/cm<sup>2</sup>, nos tempos de 0, 5, 15, e 25 minutos. As técnicas de espectrofotometria, voltametria cíclica e amperometria foram realizadas antes e após a exposição das amostras ao Ultra-Som, construindo-se curvas analíticas comparadas às curvas obtidas na ausência de radiação. Os resultados demonstram possibilidade de detecção da degradação da *Arnica montana* através das técnicas analíticas utilizadas. Sendo assim, concluiu-se que a ação física e química do US, tanto contínuo quanto pulsado, promove alteração eletroquímica do substrato estudado (*Arnica montana*) envolvendo o solvente (água) e também o extrato. A degradação do extrato de Arnica (formação de subprodutos) permite sugerir o aumento da mobilidade molecular, fator este positivo no que se refere ao uso do US, através da técnica de fonoforese.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ultra-som. Fonoforese. *Arnica Montana*. *Espectrofotometria*. *Amperometria*. *Voltametria cíclica*.

## ABSTRACT

*Arnica montana* is a phytotherapeutic commonly used for a medicinal purpose due to its anti-inflammatory effects. The ultrasound equipment is used the same way in Physiotherapy to control inflammatory signs like pain and edema, besides propagating substances through the skin, by phonophoresis, due to its capacity of altering the cell membrane permeability, this way providing substance absorption increasing. Considering the *Arnica montana* effects, from phonophoresis technique through the ultrasound and the medicines technological development of vegetal origin, this study's general aim is to investigate *Arnica montana* degradation when undergone to the therapeutic ultrasound use through phonophoresis using Amperometry and cyclic and cyclic voltammetry techniques. Samples of *Arnica montana* glycolic extract in a glycolic extract in a 100 mL/L dilution were used. The ultrasound was put into practice at pulsate and continuous mode (at a 100 Hz with 20% pulse duration cycles) at a 1.0 W/cm<sup>2</sup> intensity and in times of 0, 5, 15 and 25 minutes. The cyclic voltammetry and amperometry were performed before and after the *Arnica montana* samples exposure to ultrasound, thus forming analytic curves compared to the ones obtained in the absence of radiation. As a result it was concluded that the ultrasound physical and chemistry's action provides electrochemistry alteration of studied substrate (*Arnica montana*) involving solvent (water) and extract as well. Furthermore, the findings show the possibility of *Arnica montana* possibility of degradation detection through cyclic voltammetry and/or amperometry techniques.

**KEY-WORDS:** Ultrasound. Phonophoresis. *Arnica Montana*. Cyclic voltammetry. amperometry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Representação esquemática do tecido antes da aplicação do US (à esquerda) e formação de bolhas gasosas em azul (cavitação), força física que acentua permeabilidade da pele (à direita).....	20
FIGURA 2 - Fórmula estrutural da helenalina.....	28
FIGURA 3 - Fórmula estrutural da isoquercetina.....	29
FIGURA 4 - Equipamento de ultra-som utilizado nos experimentos.....	30
FIGURA 5 - Equipamento de ultra-som terapêutico utilizado nos experimentos...	32
FIGURA 6 - Espectrofotômetro utilizado nos ensaios de varredura UV/vis.....	35
FIGURA 7- Potenciostato utilizado nos ensaios eletroquímicos.....	36
FIGURA 8 - Célula eletroquímica utilizada nos experimentos.....	37
FIGURA 9 - Espectro UV/Vis do extrato de Arnica em diferentes concentrações.	40

FIGURA 10 - Valores de Absorbância x Concentração do extrato de <i>Arnica Montana</i> .....	41
FIGURA 11 - Espectro UV/Vis do extrato de <i>Arnica</i> 100 mL/L, em diferentes tempos de exposição ao US.....	42
FIGURA 12 - Voltamograma cíclico de solução de extrato <i>Arnica montana</i> antes e após a aplicação de ultra-som – 5 minutos, $v = 50$ mV/s.....	43
FIGURA 13 - Voltamograma cíclico de solução de extrato <i>Arnica montana</i> antes e após a aplicação de ultra-som – 15 minutos, $v = 50$ mV/s.....	44
FIGURA 14 - Zoom da janela eletroquímica -500 + 500 mV.....	44
FIGURA 15 - Espectro UV/Vis “ <i>ex situ</i> ” imediato (do extrato de <i>Arnica</i> 100mL/L, US contínuo, $d= 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , solução 100mL/L., em diferentes tempos de exposição ao US.....	47
FIGURA 16 - Leitura “ <i>in situ</i> ”:corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo, $d= 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , solução 100mL/L.....	48
FIGURA 17 - Leitura “ <i>in situ</i> ”:corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo, $d= 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , solução 100mL/L.....	48
FIGURA 18 - Leitura <i>ex situ</i> imediato: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo, $d = 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , diluição de 100mL/L.....	49
FIGURA 19 - Leitura <i>ex situ</i> imediato: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo, $d = 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , diluição de 100mL/L.....	50
FIGURA 20 - Leitura <i>ex situ</i> (1 hora após): corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo, $d = 1,0$ W/cm <sup>2</sup> , diluição de 100mL/L.....	50

FIGURA 21 - Leitura <i>ex situ</i> (1 hora após): corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , diluição de 100mL/L.....	51
FIGURA 22 - Espectro UV/Vis “ <i>ex situ imediato</i> ” do extrato de <i>Arnica</i> 100mL/L, US pulsado, 100 Hz, 20% $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , em diferentes tempos de exposição ao US.....	52
FIGURA 23 - Espectro UV/Vis “ <i>ex situ após 1 hora</i> ” do extrato de <i>Arnica</i> 100mL/L, US pulsado, 100 Hz, 20% $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , em diferentes tempos de exposição ao US.....	53
FIGURA 24 - Leitura <i>in situ</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L.....	54
FIGURA 25 - Leitura <i>in situ</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L.....	55
FIGURA 26 - Leitura <i>ex situ imediato</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L.....	56
FIGURA 27 - Leitura <i>ex situ imediato</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L..	56
FIGURA 28 - Leitura <i>ex situ após repouso de 1 hora</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L.....	57
FIGURA 29 – Leitura <i>ex situ após repouso de 1 hora</i> : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L.....	58
FIGURA 30 – Valores de corrente x tempo de degradação da <i>Arnica montana</i> ....	61

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de absorvância “ <i>ex situ</i> ” imediato, “ <i>ex situ</i> ” após 1 hora de soluções filtradas em comprimento de onda de 275 nm.....	54
TABELA 2 - Análise de variância entre os tratamentos contínuos <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> , com diferença de 1 hora, para cada um dos potenciais utilizados (V) e para os quatro diferentes tempos (0, 5, 15 e 25min). F = valor da análise de variância; P = probabilidade.....	59
TABELA 3 - Análise de variância entre os tratamentos pulsados <i>ex situ</i> e <i>in situ</i> , com diferença de 1 hora, para cada um dos potenciais utilizados (V) e para os quatro diferentes tempos (0, 5, 15 e 25min). F = valor da análise de variância; P = probabilidade.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERA	Área Radiação Efetiva, do inglês Effective Radiation Área
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IEC	Internacional Eletrochemical Comission
OMS	Organização Mundial de Saúde
POA	Processos Oxidativos Avançados
US	Ultra-Som
UV	Ultra-Violeta
VIS	Visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 Objetivo geral.....	25
2.3 Objetivos específicos.....	25
<b>3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>27</b>
3.1 Tipo de pesquisa.....	27
3.2 Amostragem.....	27
3.3 Frascos, vidrarias e aparelhagens gerais.....	29
3.4 Matérias-primas.....	30
3.5 Equipamentos.....	30
3.5.1Terapia por ultra-som.....	30
3.5.1.1 Ultra-som.....	30
3.5.1.2 Ultra-som terapêutico.....	31
3.5.1.3 Aferição do equipamento.....	33
3.5.2 Equipamentos para a análise instrumental.....	33
3.5.2.1 Espectrofotometria.....	34
3.5.2.2 Voltametria cíclica e amperometria.....	35
3.6 Descrição do procedimento.....	37

<b>3.7 Análise estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Banho de ultra-som não terapêutico.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.1 Espectrofotometria.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.2 Análise eletroquímica – voltametria cíclica.....</b>	<b>42</b>
<b>4.2 Ultra-som terapêutico.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2.1 Ultra-som contínuo.....</b>	<b>47</b>
<b>4.2.2 Ultra-som pulsado.....</b>	<b>52</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>66</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No contexto atual, a procura de um contorno corporal harmônico, com cicatrizes cada vez menores, através de cirurgia plástica, tem sido alvo de interesse de inúmeros pacientes. Conseqüentemente todos os profissionais que atuam na área, passam a desenvolver e aprimorar técnicas que visem a minimização dos efeitos ocasionados pelo trauma cirúrgico. Desta forma, a procura de novos e melhores métodos de tratamento, com segurança, eficácia e qualidade, constitui uma importante fonte de inovação em saúde.

Todavia, sem dúvida, a busca pelo êxito terapêutico pelos profissionais da área da saúde, concorre com a insuficiência de pesquisas e materiais científicos publicados.

Nesse contexto, as dificuldades e entraves existentes para a ampliação de opções terapêuticas, que incluem a necessidade de aproximação com o desenvolvimento de pesquisas, terminam por dificultar a previsão dos riscos relacionados aos procedimentos e aos elevados graus de incerteza em relação aos resultados esperados.

Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, no início da década de 1990, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população de países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais como um cuidado básico de saúde. A utilização destas plantas é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade, sendo que no

Brasil, as plantas medicinais da flora nativa necessitam de estudos sobre a comprovação de suas propriedades farmacológicas, considerando que sua utilização está fortemente vinculada ao uso popular e propagadas por comerciantes (Veiga Junior; Pinto, 2005).

Várias plantas vêm ganhando também, a aceitação por parte dos profissionais da área cosmética e dos consumidores. O uso de extratos vegetais em produtos cosméticos tem sido cada vez mais motivado pelos pesquisadores e formuladores da área. Porém, é preciso cautela e um estudo minucioso da eficácia de cosméticos contendo extratos vegetais para a obtenção de produtos de alta qualidade (Chorilli et al, 2004).

Segundo a OMS, planta medicinal pode ser definida como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (Veiga Junior; Pinto, 2005).

De acordo com a Vigilância Sanitária, portaria nº 6/MS/SNVS, de 31 de janeiro de 1995, fitoterápico é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnósticos, com benefício para o usuário. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade: é o produto final acabado, embalado e rotulado” (ANVISA, 2005).

A *Arnica montana*, popularmente conhecida como Arnica, é uma planta herbácea da família das compostas, nativa das regiões montanhosas da Europa. O primeiro registro escrito sobre os poderes curativos desta planta apareceu na Alemanha do século XII, com Santa Goettingen, preconizando seu emprego em ferimentos. No início do século XVIII a Arnica estava consagrada pela medicina oficial e era largamente empregada em toda a Europa (Teske,Trentini, 1997).

Estudos fitoquímicos de sua composição registram a presença de lactonas sesquiterpênicas (helenalina e diidrohelenalina), ácidos graxos (acético, isobutírico, 2-metilbutírico, metacrílico), flavonóides (isoquercetina, luteolina-7-glucosídeo, astragalina), óleos fixos (ácido oléico, ácido láurico, ácido palmítico), ácidos diversos

(fórmico, caféico, angélico, málico), triterpenos (arnidol, pradiol, arnisterina), derivados do ácido cinâmico (ácido clorogênico), óleos essenciais, xantofilosídeos, carotenóides, ceras, poliacetilenos, resinas, taninos, cumarinas, inulina, arnicina, fitosterina e o alcalóide Arnicaína (Teske, Trentini, 1997; Bisset, 1994; Oliveira, Akisue, 1989).

Estudos pré-clínicos com a Arnica 6CH (homeopatia) na inflamação aguda (promovida pela aplicação de carragenina) e crônica (promovida pela administração de nistatina) demonstram eficácia quando é realizado um pré-tratamento com o medicamento. Com este pré-tratamento foi observada, também, a redução do edema e da permeabilidade vascular provocada pela histamina (Macêdo et al., 2004).

É frequentemente empregada por via tópica no tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões, pela aplicação sobre a área afetada com auxílio de algodões ou compressas embebidas em tinturas ou maceração em álcool de suas folhas e rizomas (Harry, Matos, 2002). Na homeopatia é utilizada em qualquer tipo de manifestação traumática, tanto físicas (hematomas ou equimoses causadas por traumatismos e torções ou por esforço muscular excessivo), quanto mentais (causadas por estresse, fadiga ou acontecimentos marcantes). Apresenta-se também como um excelente remédio para o coração e a circulação (Vannier, Poirier, 1987; Voisin, 1984; Tetau, 1979).

Fenner et al (2004), em um levantamento bibliográfico etnobotânico realizado em obras publicadas a partir de 1840 sobre plantas de uso popular com atividade anti-fúngica, citam a *Arnica montana* como uma planta da família vegetal Asteraceae, nome científico *Arnica montana* L., nome popular Arnica, com ação anti-séptica, sendo que a parte vegetal utilizada é a raiz e os capítulos florais, tendo como referências os seguintes autores e anos de publicação sobre o assunto: (Caminhoá, 1877, além de Moreira Filho e Golltcher, 1972).

Gonçalves, Lúcio e Gil (2007), atribuem ao uso da *Arnica montana*, efeitos analgésicos, antiinflamatórios, anti-sépticos, estimulante do crescimento capilar, hipotensora e antimicrobiana, tendo como marcadores flavonóides, óleos voláteis, taninos e resinas.

Os flavonóides, presentes em sua composição, são compostos polifenólicos de baixo peso molecular e através de sua capacidade de modular atividades enzimáticas interferem no funcionamento de alguns sistemas celulares proporcionando ações anti-inflamatórias, cicatrizantes, anti-oxidantes, dentre outras (Kanashiro et al, 2005; Aguiar, 2005)

É importante ressaltar que, apesar de plantas medicinais e fitoterápicos, serem frequentemente consideradas como inócuas, Oliveira & Gonçalves (2006), realizaram uma extensa revisão bibliográfica e, selecionaram aquelas que , a partir de relatos da literatura, apresentassem potencial de toxicidade, dentre elas a *Arnica montana*.

A Arnica deve ter seu uso oral evitado devido à toxicidade das lactonas sesquiterpênicas. Os riscos da planta ao ser utilizada na forma oral são possível ocorrência de náuseas e irritação gástrica e, com doses muito elevadas, pode ocorrer dispnéia. A helenalina diminui a reabsorção de cálcio, provavelmente por ação estabilizadora de membrana, o que é responsável pelos efeitos tóxicos. Externamente pode provocar dermatite edematosa, com formação de vesículas e sensibilização (Teske, Trentini, 1997; Bisset, 1994; Voisin, 1984).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária alerta para o fato de que a fabricação e a comercialização de produtos fitoterápicos só poderão ser feitas após autorização de funcionamento da empresa e registro de produtos junto ao órgão competente do Sistema Único de Saúde, de acordo com a Portaria 1585/MS de 26.08.94 (D.O.U de 29.08.94). É necessário a apresentação de estudos científicos que comprovem a segurança e a eficácia terapêutica do produto fitoterápico, sendo que produtos que foram registrados em épocas, cujo conhecimento científico era incipiente, torna-se necessário rever processos e adequá-los aos requisitos de segurança, eficácia e qualidade e, portanto as bulas e rótulos deverão conter, obrigatoriamente, os seguintes dizeres: "produto em estudo para avaliação científica das indicações terapêuticas e da toxicidade, o uso deste produto está baseado em indicações tradicionais" (ANVISA, 2005).

No que se refere a produtos a base de Arnica, produzidos pelas empresas de fitoterápicos, os extratos alcoólicos e glicólicos são os mais utilizados, para fins analgésicos, anti-inflamatórios, cicatrizantes, entre outros (Tetau, 1993).

Um fator de extrema relevância é a época em que uma droga é coletada, considerando o fato de que seus constituintes ativos não são constantes durante todo o ano. Ou seja, podem ocorrer variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, sendo o caso das lactonas sesquiterpênicas produzidas em *Arnica montana*, considerada o princípio ativo anti-inflamatório essencial da planta. Além disso, plantas jovens também acumulam helenalina, responsável pelos efeitos tóxicos da planta (Gobbo-Neto, Lopes, 2005).

O ultra-som (US) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada na prática da fisioterapia. As ondas ultra-sônicas são geradas por transdutores que convertem energia elétrica em energia mecânica e vice-versa, graças a materiais piezoelétricos, que geram efeitos de mesmo nome, os efeitos piezoelétricos (Kitchen, 2003).

O equipamento terapêutico se caracteriza por apresentar uma frequência de 1 a 3 MHz, intensidade entre 0,01 a 3,0 W/cm<sup>2</sup>, nos modos contínuo e pulsado (Guirro, Santos, 1997). A intensidade da radiação é um fator essencial para o sucesso da terapia, bem como seu tempo de aplicação. A quantidade de energia total depositada sobre um tecido biológico depende dos seguintes parâmetros: potência acústica; tempo; frequência e área de radiação efetiva do transdutor (ERA). A ERA compreende todos os pontos nos quais a intensidade ultra-sônica é igual ou superior a 5% da intensidade ultra-sônica máxima espacial, expressada em centímetros quadrados, sendo que existem dois padrões que especificam métodos para sua medida que são o Food and Drug Administration – FDA que aplica-se aos equipamentos usados nos Estados Unidos e o INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION, relevante para todos os aparelhos do mundo. Porém, no Brasil, não existem laboratórios que prestem serviços com regularidade para a medição da ERA, e dessa forma, são as próprias indústrias fabricantes que quantificam a ERA de seus equipamentos (Guirro, Santos, 2002; Guirro et al, 1997).

O US produz dois efeitos fundamentais ou primários no organismo: efeito mecânico e efeito térmico, que prevalecerão de acordo com o regime de pulso aplicado, contínuo ou pulsado bem como da energia depositada. No US contínuo a emissão do feixe ultra-sônico se dá de forma contínua, sendo que no US pulsado, a emissão é interrompida de forma periódica, intercalando pausas. Portanto, na modalidade pulsada poderão obter-se efeitos térmicos mínimos, estabelecendo-se uma modulação de conjunto de pulsos. Já na modalidade contínua, doses baixas podem praticamente não elevar a temperatura dos tecidos. Nesse sentido, só ocorrerá diferença de temperatura entre os dois regimes de pulso caso a energia depositada no modo contínuo seja maior (Agne, 2004; Guirro & Guirro, 2002).

Isso posto, as ondas ultra-sônicas que atingirão uma determinada região dependem de vários fatores, tais como: intensidade; frequência; regime de pulso; área do transdutor; tempo de aplicação; técnica de aplicação e agente de acoplamento. Na prática clínica não há dose padronizada, porém, sabe-se que doses superiores a  $1,0 \text{ W/cm}^2$  podem provocar lesões (Guirro et al, 1996).

O ultra-som terapêutico tem sido aplicado a uma grande variedade de condições traumáticas e inflamatórias agudas e subagudas, reumatóides e artríticas crônicas, tecido fibroso cicatricial excessivo e para o alívio da dor (Low, Reed, 2001).

A pele é um órgão que protege o organismo da entrada de substâncias nocivas ao organismo, evita a evaporação excessiva da água, além de possuir a função de barreira (Chorilli et al, 2005).

A transmissão transdérmica oferece uma forma viável de permeação de fármacos quando a droga não pode ser utilizada por via oral ou injetável, no entanto a pele possui uma barreira eficaz que não permite a permeação fácil de drogas. Essa propriedade de barreira da pele é atribuída à camada córnea que é formada por uma bicamada lipídica que aumenta a resistência de transporte de íons e corneócitos (Campos, 2004).

Devido a dificuldade de penetração de drogas pela pele, agentes químicos e físicos vêm sendo pesquisados para que se torne mais fácil a permeação de agentes farmacológicos (Campos, 2004), para tanto sugere-se o uso de US (Mitragotri, 1995), pois a ação de uma força física acentua a permeabilidade da pele

(Ueda et al, 1996), assim como os efeitos térmicos podem alterar estruturas químicas da pele (Hippius et al., 1998).

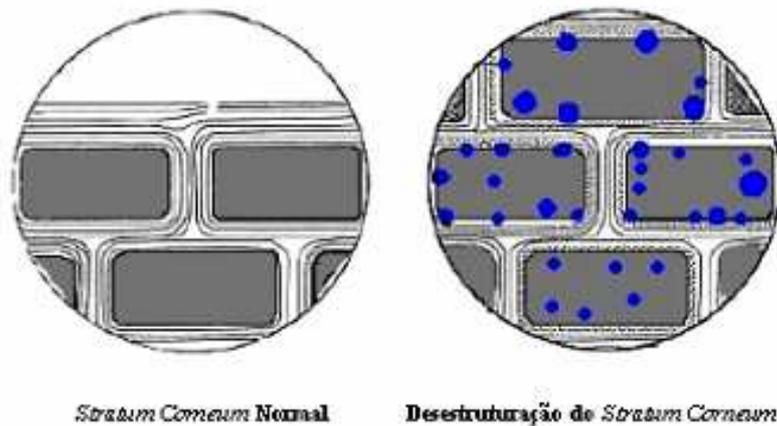


FIGURA 1- Representação esquemática do tecido antes da aplicação do US (à esquerda) e formação de bolhas gasosas em azul (cavitação), força física que acentua permeabilidade da pele (à direita)

Fonte: Cárnio, 2006.

Chorilli et al (2004) afirma que a presença de promotores de permeação, atuando por mecanismos diversos, pode proporcionar variações no fluxo de uma substância através da pele, mediante modificações na estrutura das membranas celulares, alteração dos coeficientes de difusão e dos coeficientes de partilha estrato córneo-veículo, influenciando no conteúdo hídrico ou ainda por diminuição das tensões de interface. Tais promotores, todavia, devem apresentar-se inócuos, não interferindo nos princípios ativos nem modificando as características físicas e sensoriais próprias de cada produto, devendo também apresentar efeito imediato e reversível.

Atualmente, o transporte de substâncias mediado por US, é tido como um método eficiente de administração localizada de drogas. Fonoforese é o termo que descreve a capacidade do US de promover a penetração de substâncias através da pele, uma vez que é capaz de alterar os potenciais de membrana (Borges, 2006).

A fonoforese é, portanto, a utilização de um campo de energia ultra-sônica, com frequência entre 20 kHz a 3 MHz, para a facilitação da penetração cutânea,

sendo que o aumento da permeação se dá através da desestruturação da barreira lipídica da camada mais externa da pele. A aplicação da técnica se dá através da utilização de um gel ou creme medicamentoso como meio de acoplamento entre o cabeçote do ultra-som e a área a ser tratada (Low, Reed, 2001).

Rosim et al apud Fusaro (2006), define fonoforese como penetração de medicamento pela pele normal através de irradiação de ultra-som. Relata que várias aplicações clínicas de fonoforese são executadas diariamente devido aos efeitos benéficos do US na aplicação tópica de medicamentos.

Segundo Rosado & Rodrigues (2003), a veiculação de drogas transdérmicas tem sido um importante meio de administração, mas ainda está limitado pelo pequeno número de drogas com um perfil satisfatório.

É importante ressaltar, que por ser uma modalidade tão amplamente utilizada, torna-se necessário que compreenda-se completamente seus efeitos biológicos e modo de ação, para que seja utilizado efetivamente com segurança. Porém, sabe-se que existem grandes inconsistências no uso do US, devido ao limitado número de pesquisas e resultados documentados (Robinson, Snyder-Macckler, 2001).

Neste sentido ressalta-se a falta de consonância entre os autores que realizam estudos acerca da fonoforese com substâncias diversas, conforme o que segue: Fusaro (2006) realizou um estudo com o objetivo de verificar a influência do ultra-som na absorção de diclofenaco dietilamônio (Cataflam Emulgel, Novartis) após fonoforese em voluntários sadios, onde a concentração plasmática de diclofenaco foi mensurada pelo HPLC (high performance liquid chromatography) durante um período de 8h após as aplicações, e demonstrou que a aplicação transdérmica de diclofenaco dietilamônio pela fonoforese, em uma única aplicação, não induz aumento da concentração plasmática quando comparada a aplicação sem ultra-som. Polacow et al (2005), após estudar os efeitos dos tratamentos com ultra-som (US) e d-pantenol (d-p) na reparação tegumentar em ratos por meio de análise histométrica e histopatológica concluiu que o ultra-som acelera o processo de reparo, porém, essa associação dos tratamentos, US+d-p, não mostrou resultados significantivos em relação ao tratamento com US isolado. Em contrapartida, Koeke (2003), em um estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra som

terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona, através do reparo tecidual do tendão de ratos, concluiu que o tratamento com fonoforese mostrou-se o método mais eficiente, induzindo a penetração transcutânea de hidrocortisona. Para Campos (2004), o ultra-som também mostrou-se importante acentuador da permeação cutânea à cafeína.

As vantagens em utilizar essa modalidade de tratamento consistem na ação localizada da droga e conseqüentemente na ausência de efeitos colaterais decorrentes de ação sistêmicas, logicamente se a droga não tiver esse tipo de ação. Além de ser de importante relevância o fato desse tipo de tratamento contar com a somatória dos efeitos inerentes ao US, associados aos efeitos da droga (Guirro & Guirro, 2002; Low, Reed, 2001).

Em química, o uso do US está dividido em duas áreas, processos homogêneos e heterogêneos . Os homogêneos podem ser induzidos por um colapso parcial ou total (cavitação) de pequenas bolhas acopladas a flutuações de pressão induzidas pelo US, que têm se mostrado como fonte local de alta energia e, dessa forma, suficiente para clivagem homolítica de compostos presentes na, ou próximos à fase de vapor dentro da bolha. As espécies geradas sob estas condições tais como, radicais hidroxila, halogêneos e outros radicais causam processos químicos nas proximidades das bolhas presentes na solução. Quanto aos processos heterogêneos, estes incluem erosão de superfícies sólidas, induzida por cavitação assimétrica, e uma mudança drástica no transporte de massa. A cavitação assimétrica é responsável pela danificação e limpeza da superfície que, em alguns casos, mostra a presença de partículas ou filmes aderentes (Garbellini, Salazar-Banda e Avaca, 2008; Avaca, 2007).

Além disso, a técnica de US pode ser utilizada na extração de compostos tais como terpenos, os quais estão presentes na estrutura química da *Arnica montana* (Peres et al., 2005). Vale ressaltar que o US também pode ser utilizado em tratamentos de efluentes (Tauber et al., 2005), em sistemas envolvendo Processos Oxidativos Avançados (POA) que são tecnologias capazes de gerar espécies altamente oxidantes (Silva et al., 2008).

Isso posto, torna-se necessário, verificar o efeito da técnica de fonoforese sobre a estrutura de compostos de fitoterápicos, de forma que a presença do veículo (US), não interfira nas propriedades da substância (*Arnica montana*).

As técnicas eletroanalíticas mostram-se bastante promissoras, viabilizando a obtenção de picos bem definidos, que permitem estimar a capacidade antioxidante de matérias-primas vegetais, bem como a detecção de espécies orgânicas (Gonçalves, Lúcio e Gil, 2007; Stulp, Silva e Marmitt, 2008).

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica que consiste em variar linearmente o potencial aplicado em uma célula eletroquímica e registrar a densidade de corrente (corrente por unidade de área) resultante. A avaliação do comportamento da solução eletrolítica (eletrólito e analito a ser analisado) é feita pela análise dos picos de corrente presentes no intervalo de varredura de potenciais frente ao eletrodo de trabalho utilizado. Esses picos de corrente são associados às reações eletroquímicas de oxidação e redução do sistema (Noel e Vasu, 1990).

A espectrofotometria é uma técnica de análise instrumental, onde ao se passar uma luz de intensidade e comprimento de onda determinados através de uma solução ensaio, a transmitância da solução será o coeficiente entre a intensidade de luz que atravessa a solução e a intensidade da luz incidente (Lei de Lambert). A absorvância, isto é, a capacidade de absorver a luz, pode ser obtida por leitura direta nos espectrofotômetros (Mansur et al., 1986).

O fato de a Fisioterapia, especialmente na área de Dermato-Funcional, utilizar-se de métodos e técnicas muitas vezes baseados apenas em evidências clínicas, torna o estudo importante, na medida em visa analisar o efeito da otimização da penetração de uma substância com ação anti-inflamatória cientificamente comprovada, que pode ser uma técnica eficaz no tratamento de pós-operatórios de cirurgias plásticas.

Portanto, considerando a possibilidade de otimização dos efeitos da terapia por US, através da fonoforese, associada aos efeitos da *Arnica montana*, e também a escassez de estudos relevantes na área, justifica-se a realização desta pesquisa, utilizando-se para tanto métodos de análise quantitativa, mais especificamente a espectrofotometria UV/Vis, a amperometria e a voltametria cíclica, com o intuito de

avaliar o potencial de degradação do extrato de *Arnica montana* submetido a radiação de US, modulado em diferentes tipos de pulsos e tempos, na dose de 1,0 W/cm<sup>2</sup>, através da construção de curvas analíticas, analisadas comparativamente antes e após a exposição do extrato às radiações.

Sendo assim, a realização desta pesquisa permitirá, a partir da divulgação dos dados obtidos, que os profissionais que atuam na área possam ser beneficiados com o conhecimento acerca dos reais efeitos da terapia sobre o extrato (*Arnica montana*), proporcionando uma análise crítica sobre esta forma de tratamento.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial de degradação do extrato glicólico de *Arnica montana* quando submetida ao uso de Ultra-Som Terapêutico, através de fonoforese.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar o efeito do ultra-som contínuo sobre o extrato glicólico de *Arnica montana*;
- Investigar o efeito do ultra-som pulsado sobre o extrato glicólico de *Arnica montana*;
- Determinar o potencial de degradação do extrato glicólico de *Arnica montana*;
- Verificar a possibilidade de detecção da degradação do extrato glicólico de *Arnica montana* através das técnicas de espectrofotometria, voltametria cíclica e/ou amperometria;

- Avaliar a importância da utilização do ultra-som terapêutico na permeação cutânea;
- Discutir a possibilidade de utilização da somatória dos efeitos da fonoforese e da *Arnica montana* como método complementar de tratamentos pós-operatórios de cirurgias plásticas.

## **3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **3.1 Tipo de pesquisa**

Trata-se de uma pesquisa com abordagem qualitativa, do tipo experimental, realizada no laboratório de físico-química da UNIVATES, que busca investigar o efeito do ultra-som terapêutico, pela técnica de fonoforese, em amostras de extrato glicólico de *Arnica montana*, através dos métodos de voltametria cíclica, amperometria e espectrofotometria de absorção ultravioleta, utilizando para tanto a análise da degradação dos extratos.

De acordo com Haddad (2004), o estudo experimental se caracteriza pelo fato do pesquisador, determinar exposição ou não e, num segundo momento, verificar a ocorrência ou não do efeito dessa exposição.

Brevidelli e Domenico (2006), explicam que a partir do momento em que existe a intenção de buscar significados e interpretá-los a partir de um contexto próprio, natural, delinea-se a abordagem qualitativa do estudo. Também foi realizada uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de conhecer outras referências publicadas sobre o assunto em questão.

### **3.2 Amostragem**

As amostras utilizadas para a análise foram obtidas a partir de extrato glicólico de *Arnica montana*, produzido pelo Laboratório Schreibmann Ltda®, lote

4652, fabricado em 10/2005, com validade de 5 anos.

Vale ressaltar, que na aquisição do produto foi solicitada a entrega do laudo técnico do extrato (ANEXO A), pois conforme Maciel et al (2006), os extratos são instáveis ao longo do tempo, podendo ocorrer degradação de substâncias, e, portanto, torna-se necessário a comprovação dos prazos de validade pela empresa fabricante.

Além disso, de igual relevância deve ser considerada a data de fabricação dos extratos, pois segundo Gobbo-Neto e Lopes (2005), a época em que uma droga é coletada pode interferir diretamente em seus constituintes ativos, e, dessa forma, podem ocorrer variações sazonais de praticamente todas as classes de metabólitos secundários.

Para possibilitar a leitura espectrofotométrica e amperométrica, dentro dos limites de leitura dos equipamentos, as amostras do extrato para o banho de ultra-som não terapêutico foram preparadas a partir de diluições em água deionizada de 10, 30, 50, 80 e 100 mL/L e as amostras para a aplicação subaquática de ultra-som terapêutico foram preparadas a partir de diluições em água deionizada de 100 mL/L. Nas figuras 1 e 2, pode-se verificar a estrutura básica de princípios ativos, presentes na composição química da *Arnica montana* (helenalina e isoquercetina).

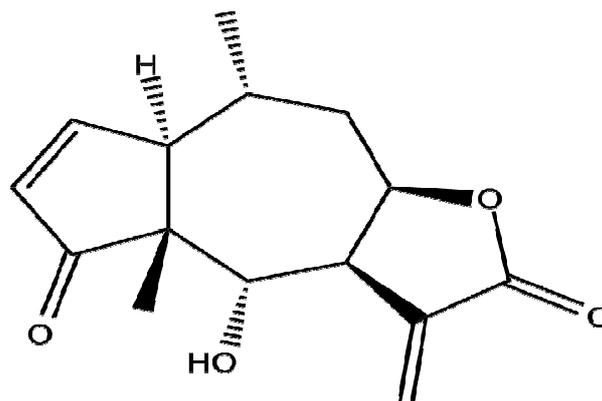


FIGURA 2 - Fórmula estrutural da helenalina

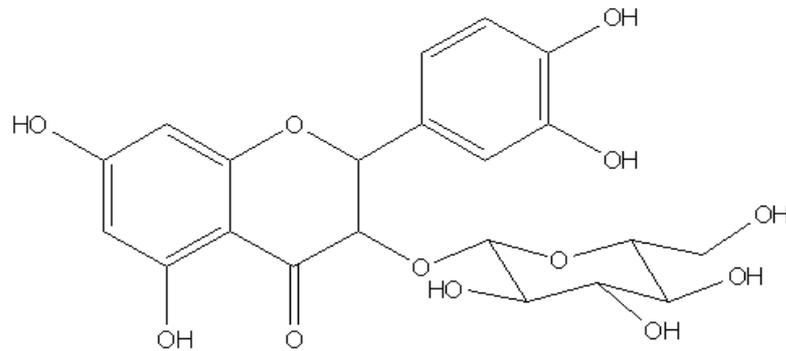


FIGURA 3 - Fórmula estrutural da isoquercetina

### 3.3 Frascos, vidrarias e aparelhagens gerais

Foram utilizados durante as análises os seguintes instrumentos:

- Balões volumétricos 100 mL;
- Beckers 100 mL;
- Beckers 200 mL;
- Bastão de vidro;
- Célula eletroquímica de um compartimento;
- Eletrodo de referência (Ag/ AgCl);
- Frasco lavador;
- Pinça;
- Pipetas graduadas 10 mL;
- Placa de platina (Tamanho 50 x 20 mm, espessura de 0,5 mm): eletrodo de trabalho para ensaios voltamétricos;
- Fio de platina (espessura de 0,5 mm): eletrodo de trabalho e contra-

eletrodo para ensaios amperométricos.

### 3.4 Matérias-primas

- Extrato glicólico de *Arnica Montana*;
- Água destilada e deionizada.

### 3.5 Equipamentos

#### 3.5.1 Terapia por ultra-som

##### 3.5.1.1 Ultra-som

Inicialmente foram realizados testes prévios utilizando um equipamento de ultra-som do laboratório de físico-química da UNIVATES, marca UNIQUE, modelo USC 1450, com frequência ultra-sônica de 25 kHz, potência de 150 W, nos tempos de aplicação de 5 e 15 minutos, em cada uma das concentrações preparadas para a amostragem.



FIGURA 4 - Equipamento de ultra-som utilizado nos experimentos

### 3.5.1.2 Ultra-som terapêutico

Posteriormente, considerando a necessidade de utilizar parâmetros de ultra-som terapêutico, compatíveis com a prática clínica fisioterapêutica, o equipamento utilizado para as análises foi fornecido pela empresa DGM eletrônica Ltda., sendo que as características técnicas fornecidas pelo manual de instrução do equipamento são:

- Alimentação: 110V/ 220V ~ 60 Hertz;
- Consumo máximo: 50 V. A;
- Modo de operação: contínuo;
- Classificação: classe I - tipo BF;
- Fusível externo: 1A/110V / 0,5A/220V, tipo 20AG;
- Fusível interno: 1A/110V ~ tipo 20AG;
- Temporizador: de 01 a 30 minutos;
- Frequência de ultra-som: 3 MHz.
- Modo de emissão do ultra-som:
  - Contínuo;
  - Pulsado a 100 Hz com ciclos de duração do pulso de:
    - 50% - 5,0 ms on / 5,0 ms off (1/2);
    - 20% - 2,0 ms on / 8,0 ms off (1/5);
    - 10% - 1,0 ms on / 9,0 ms off (1/10);
    - 5% - 0,5 ms on / 9,5 ms off (1/20).
  - Pulsado a 48 Hz com ciclos de duração do pulso de:
    - 50% - 10,4 ms on / 10,4 ms off (1/2);

20% - 4,1 ms on / 16,7 ms off (1/5);

- Pulsado a 16 Hz com ciclos de duração do pulso de:

50% - 31,25 ms on / 31,25 ms off (1/2);

20% - 12,5 ms on / 50,0 ms off (1/5);

- Intensidade de potência: 0,1 a 2,0 W/cm<sup>2</sup>

- ERA (Effective Radiaton Area): 3,5 cm<sup>2</sup>;

- Dimensões: 440mm X 270mm X 125mm (LxPxA);

- Peso: (aprox. s/ transdutor) 4,0 kg.



FIGURA 5 - Equipamento de ultra-som terapêutico utilizado nos experimentos

Foram adotados os seguintes parâmetros de terapia por ultra-som:

- Modo contínuo;

- Modo pulsado a 100 Hz com ciclo de duração de pulso de 20% ;

- Tempos: 0, 5, 15 e 25 minutos;

- Intensidade: 1,0 W/cm<sup>2</sup>.

- Técnica de aplicação: subaquática. O cabeçote será submerso nas amostras de diferentes concentrações, com variações de modo, tempo e intensidade, conforme descrito anteriormente.

### 3.5.1.3 Aferição do equipamento

Para que a potência de saída no transdutor fosse compatível com o valor indicado no painel do equipamento, visando resultados de maior confiabilidade, a indústria fabricante do equipamento realizou a aferição e calibração do equipamento de ultra-som terapêutico, emitindo um laudo de calibração.

De acordo com Guirro e Santos (1997), mais de 50 % dos equipamentos em uso, nas clínicas e departamentos de fisioterapia, estão fora das especificações postuladas pela Internacional Eletrotechnical Commission (IEC), o que pode comprometer a segurança e eficiência da terapia ultra-sônica.

As leituras para a análise instrumental, foram realizadas nos tempos determinados de aplicação do Ultra-som, “*in situ*” (durante o tratamento), “*ex situ* imediato” (imediatamente após o tratamento) e “*ex situ* após um tempo de repouso de 1 hora” após o tratamento.

Todas as análises foram realizadas em triplicata (Ribani, 2004).

### 3.5.2 Equipamentos para a análise instrumental

Para as análises do potencial de degradação dos extratos de *Arnica montana*, foram utilizados equipamentos analíticos do Laboratório de físico-química da UNIVATES, representados por um Espectrofotômetro de feixe duplo e um Potenciostato. As análises foram realizadas antes da exposição dos extratos à terapia por ultra-som, bem como após o término da mesma, construindo-se curvas analíticas a partir dos resultados obtidos.

Conforme Cienfuegos e Vaitsman (2000), quase todas as propriedades características de um determinado elemento ou substância podem servir de base para estabelecer um método analítico instrumental. Portanto, foram determinados como métodos de análise instrumentais das amostras, a espectrofotometria de absorção ultravioleta, através da absorção de luz em diferentes regiões do espectro eletromagnético, a amperometria e a voltametria cíclica, através da condutividade das soluções, determinando o potencial de corrente.

### **3.5.2.1 Espectrofotometria**

As medições para a análise através da espectrofotometria foram realizadas nas porções do espectro correspondentes ao ultravioleta (UV), visível (VIS), medindo-se a energia radiante absorvida, através do equipamento Espectrofotômetro marca Femto, modelo 700 plus com faixa espectral de 195 a 1100 nm.

De acordo com Jeffery et al (1992), quando a luz monocromática ou heterogênea incide sobre um meio homogêneo, uma parcela desta luz incidente é refletida, uma outra parcela é absorvida e o restante é transmitido.

Em se tratando de uma solução, torna-se importante citar a Lei de Beer, que estabelece uma relação entre a concentração do constituinte corado e a transmissão ou absorção da luz, ou seja, a intensidade de um feixe de luz monocromática diminui exponencialmente com a concentração da substância absorvedora.

Dessa forma, pode-se considerar que o método permite avaliar o efeito do ultra-som sobre as amostras, pois se ocorrer degradação da substância quando submetida à terapia por ultra-som, conseqüentemente ter-se-á uma redução ou modificação da energia radiante absorvida.

Vale ressaltar que, a seleção do comprimento de onda para a construção das curvas de calibração foi realizada através de varredura em toda a faixa espectral do equipamento, verificando-se os picos de absorbância.



FIGURA 6 - Espectrofotômetro utilizado nos ensaios de varredura UV visível

### 3.5.2.2 Voltametria cíclica e amperometria

A análise voltamétrica, foi realizada através de um potenciostato, sendo que os experimentos foram realizados antes e após a exposição dos extratos à terapia por ultra-som, construindo-se curvas voltamétricas a partir dos resultados obtidos.

O potenciostato utilizado foi da marca Microquímica, modelo MQPG – 01, interfaceado via placa com computador. Após a otimização das condições de aplicação do ultra-som nas medidas voltamétricas, foram construídas curvas analíticas e comparadas às curvas obtidas na ausência da radiação. A célula eletroquímica utilizada foi uma célula convencional de um compartimento, sendo o eletrodo de trabalho um fio de platina, o contra-eletrodo um fio de platina e como eletrodo de referência, utilizou-se o Ag/AgCl.

A janela eletroquímica utilizada foi de - 1800 mV a + 1800 mV, com velocidade de varredura de 50 mV/ s. Os resultados obtidos foram analisados comparativamente.

Após os ensaios de voltametria cíclica, foram realizados ensaios amperométricos de aplicação de potencial constante, nos potenciais de 0,39 V e 0,5

V em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100mL/L, nos modos de aplicação de terapia por ultra-som contínuo e pulsado a 100 Hz e ciclos de duração de pulso de 20%, intensidade de  $1,0 \text{ W/ cm}^2$ , nos tempos de 0, 5, 15 e 25 minutos.

O experimento foi realizado com o auxílio de uma fonte de tensão CIDPE EQ030 e para a medição da corrente utilizou-se um Multímetro Digital Metex M-4650B. A célula eletroquímica utilizada foi a mesma dos ensaios voltamétricos.

De acordo com Jeffery (1992), a voltametria estuda as relações entre voltagem, a corrente e o tempo, durante a eletrólise em uma célula. A técnica envolve o estudo da influência das variações da voltagem aplicada sobre a corrente que passa pela célula, podendo também investigar a variação da corrente com o tempo. Ou seja, o procedimento permite verificar degradação de substâncias através de variações do potencial de corrente, comparando-se os resultados antes e após a aplicação do ultra-som.



FIGURA 7 - Potenciostato utilizado nos ensaios eletroquímicos

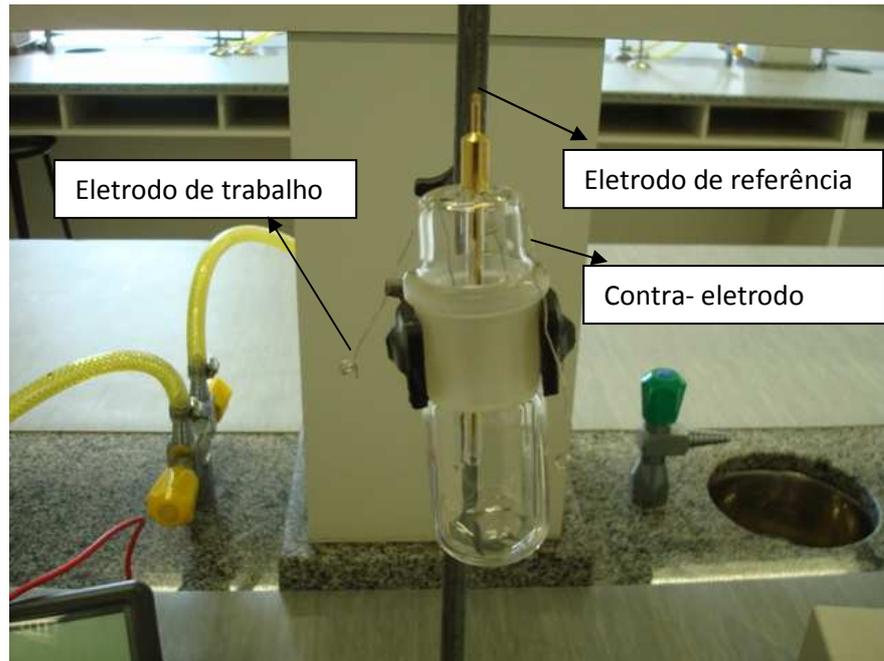


FIGURA 8 - Célula eletroquímica utilizada nos experimentos

### 3.6 Descrição do procedimento

- **Preparo das amostras:** As amostras foram preparadas a partir do extrato glicólico de *Arnica montana*, nas diluições de 100 mL/L para a aplicação do ultra-som terapêutico;

- **Análise instrumental antes da aplicação do ultra-som:** Cada uma das amostras foi avaliada através de espectrofotometria (absorbância x comprimento de onda) e amperometria (valor de corrente);

- **Terapia por ultra-som:** Foi aplicado o ultra-som terapêutico em cada uma das amostras, em diferentes modulações (modo contínuo e modo pulsado a 100 Hz com ciclos de duração de pulso de 20%), tempos (0, 5, 15 e 25 minutos) e intensidade ( $1,0 \text{ W/cm}^2$ );

- **Análise instrumental após a aplicação do ultra-som:** Cada uma das amostras foi novamente avaliada através de espectrofotometria (absorbância x comprimento de onda), amperometria (valor de corrente), construindo-se curvas analíticas a partir dos resultados encontrados;

- **Resultados:** os resultados obtidos a partir das análises instrumentais foram analisados comparativamente.

### **3.7 Análise estatística**

Os dados obtidos a partir dos resultados das triplicatas, nos testes de “antes-depois”, com as diferentes concentrações de *Arnica montana*, as diferentes freqüências utilizadas e a forma de aplicação (pulsada ou contínua), tiveram a significância testada pela análise de variância ANOVA (Zar, 1999).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Serão apresentados, inicialmente, os dados obtidos a partir da análise instrumental das amostras dos extratos de *Arnica montana*, através de espectrofotometria e voltametria cíclica, antes e após um banho de ultra-som não terapêutico, cujas análises foram realizadas no período de outubro de 2007 a janeiro de 2008.

Posteriormente serão apresentados os dados pertinentes a aplicação de ultra-som terapêutico nas amostras de *Arnica montana*, através de espectrofotometria e amperometria. Estas análises foram realizadas no período de março de 2008 a janeiro de 2009.

Os resultados serão analisados e discutidos comparativamente.

### **4.1 Banho de ultra-som não terapêutico**

#### **4.1.1 Espectrofotometria**

Os gráficos apresentados abaixo foram obtidos a partir da análise da absorbância das amostras em diferentes concentrações (com diluição de 10 vezes) em comprimentos de onda previamente selecionados, através de varredura em toda a faixa espectral (195-1100 nm), sendo considerado o valor de 280 nm como o pico de absorbância máxima.

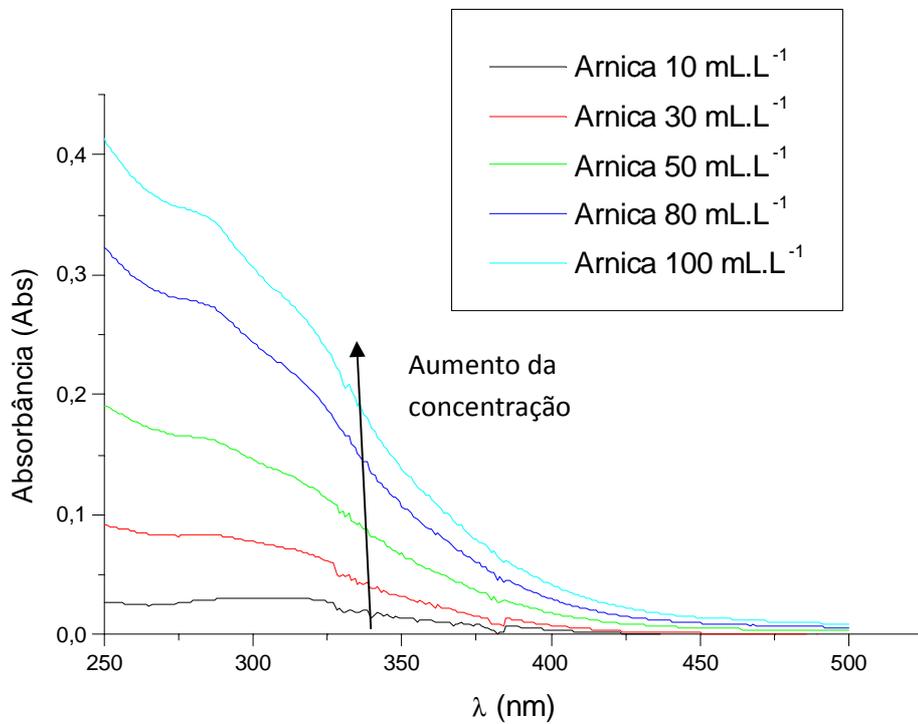


FIGURA 9 - Espectro UV/Vis do extrato de Arnica em diferentes concentrações

A FIGURA 9 apresenta o espectro de absorbância do extrato de *Arnica montana* em diferentes concentrações. Neste espectro pode ser verificada a banda de absorção característica de carbonos orgânicos aromáticos (Alves et al., 2007), em regiões próximas a 280 nm (Souza, Daniel, 2005). Na FIGURA 8, verifica-se o comportamento da Absorbância x Concentração do extrato de *Arnica montana* no comprimento de onda de 280 nm.

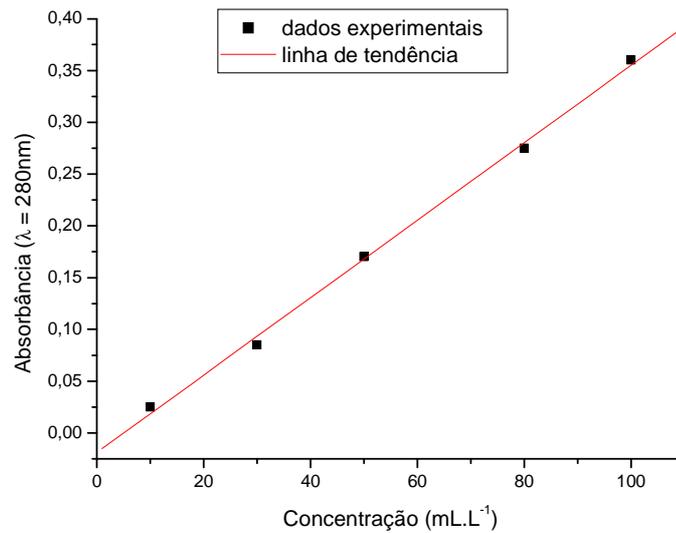


FIGURA 10 - Valores de Absorbância x Concentração do extrato de *Arnica montana*

Avaliando a FIGURA 10 pode-se verificar a existência de um comportamento linear. A equação da reta (linha de tendência linear) é  $y = 0,00374 x - 0,01889$ , onde o x representa a concentração da solução de *Arnica montana* e o y sua absorbância.

Na FIGURA 11, tem-se o espectro de absorbância do extrato de Arnica (100 mL/L) após exposição ao ultra-som, nos tempos de aplicação de 1, 5, 15 e 25 minutos.

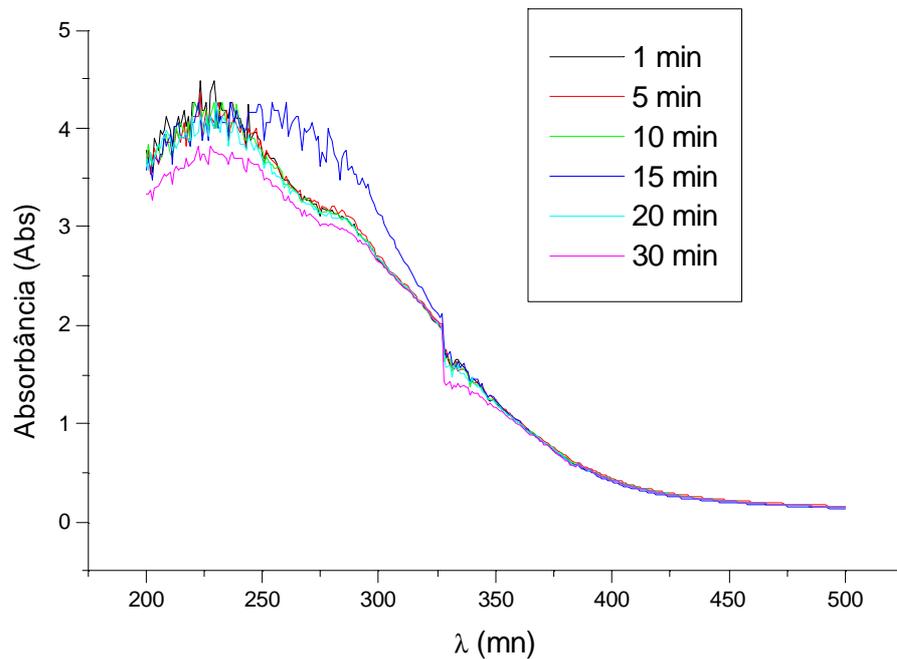


FIGURA 11 - Espectro UV/Vis do extrato de *Arnica* 100 mL/L, em diferentes tempos de exposição ao US

Avaliando a FIGURA 11, pode-se verificar que ocorre decréscimo das bandas características ao longo do tempo, podendo indicar alterações do extrato em função da aplicação da onda sônica.

#### 4.1.2 Análise eletroquímica – voltametria cíclica

Os ensaios de caracterização eletroquímica, por meio da utilização da técnica de voltametria cíclica, foram realizados em solução de extrato *Arnica montana* (100 mL/L), antes e após a aplicação de um banho de ultra-som não terapêutico, por um tempo de 5 e 15 minutos, na velocidade de varredura de 50 mV/s. Todos os potenciais medidos são em relação ao eletrodo de Ag/AgCl.

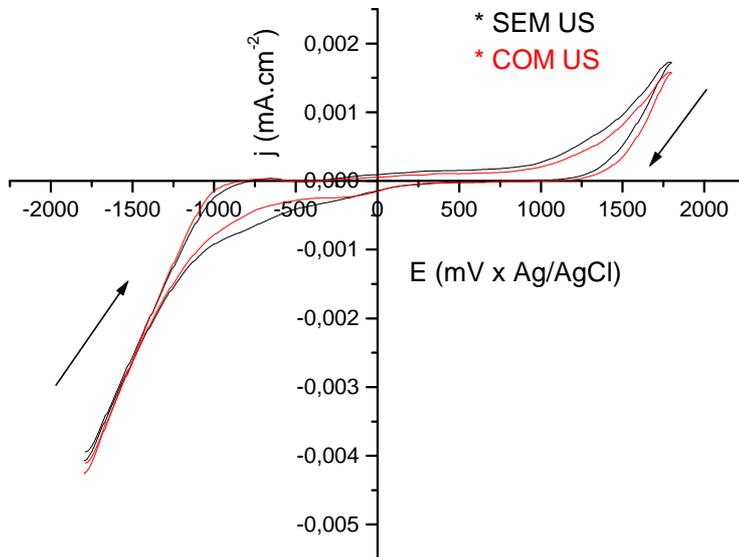


FIGURA 12 - Voltamograma cíclico de solução de extrato *Arnica montana* antes e após a aplicação de ultra-som – 5 minutos,  $v = 50 \text{ mV/s}$

Avaliando a FIGURA 12, verifica-se que houve alteração eletroquímica, após exposição por 5 minutos de US não terapêutico, pela visualização da alteração da área do voltamograma.

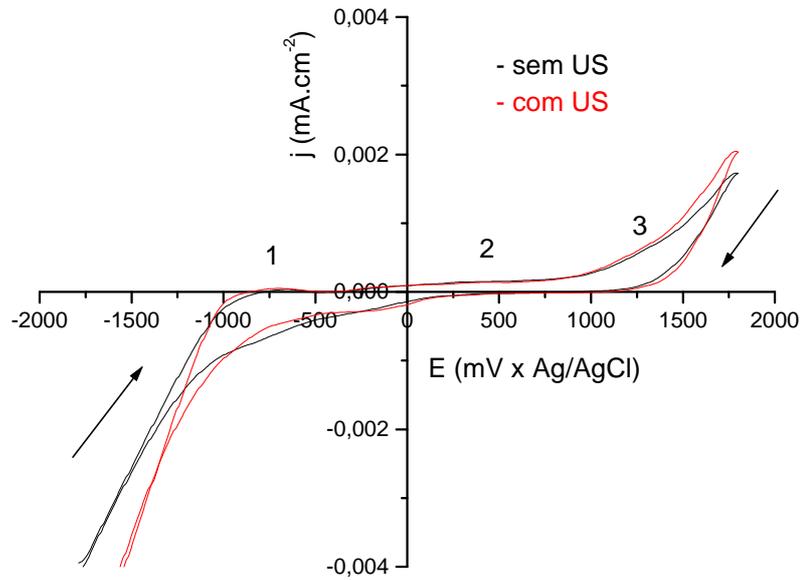


FIGURA 13 - Voltamograma cíclico de solução de extrato *Arnica montana* antes e após a aplicação de ultra-som – 15 minutos,  $v = 50 \text{ mV/s}$ .

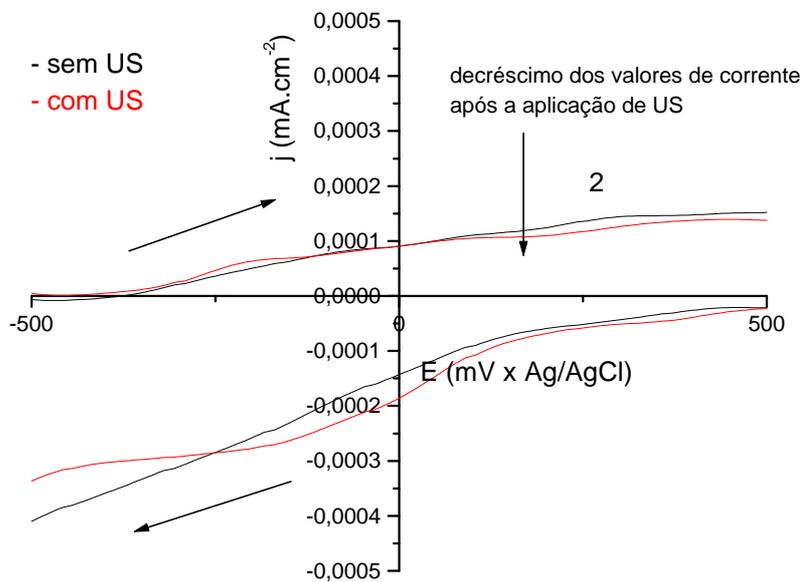


FIGURA 14 - Ampliação (zoom) da janela eletroquímica  $-500 + 500 \text{ mV}$

A análise dos resultados obtidos, avaliando-se a FIGURA 13 e 14, permite verificar que em potenciais de 0,39V, o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 0,143  $\mu$ A. Após a aplicação da técnica obteve-se um valor de corrente em torno 0,120 de  $\mu$ A, indicando que houve uma redução da corrente elétrica quando a amostra foi submetida ao banho de ultra-som não terapêutico.

Verifica-se também, que em regiões de baixos valores de potencial, ocorre o desprendimento de hidrogênio por redução do próton.

Neste voltamograma há 3 picos (anódicos e catódicos) presentes no sistema platina/água/*Arnica montana*. O pico 1 pode ser devido ao comportamento da platina frente ao hidrogênio presente no sistema, envolvendo processos superficiais de adsorção (Santos, Tremiliosi Filho, 2001). O pico 2 é relativo a *Arnica montana* presente na solução em regiões próximas a 0,39 V (Gil, Gonçalves, Lucio, 2007; Santos, Mazo, Cavalheiro, 2008). Em regiões de altos valores de potencial (acima de 1,2 V), verifica-se a formação de oxigênio através da oxidação da água, resultando em rápido acréscimo dos valores de corrente, já o pico 3 é característico de sistemas que possuem espécies orgânicas em solução (Azevedo, Albuquerque, Santos, 2006; Profeti, Profeti, Olivi, 2005; Lavagnoli et al., 1995; Vucovik, 1987).

Avaliando a área dos voltamogramas da FIGURA 13 verifica-se que após a aplicação de US nos extratos de *Arnica* ocorre um aumento da área do voltamograma, ou seja, aumentou a carga do sistema, passando de 0.97584mC.cm<sup>-2</sup> para 1.17mC. cm<sup>-2</sup> (FIGURA 13) (Catanho, Malpass, Motheu, 2006). Além disso, ocorre uma redução do potencial da reação de evolução do oxigênio, indicando a formação de espécies oxidadas em solução (Malpass, Motheu, 2006).

Portanto, os resultados obtidos permitem concluir que, houve oxidação/modificação da substância após ser submetida ao banho de ultra-som não terapêutico, confirmando os resultados obtidos nos ensaios espectrofométricos.

## 4.2 Ultra-som terapêutico

A partir dos resultados obtidos pela voltametria cíclica, foram eleitos os potenciais de 0,39 V e 0,5 V, potencial este próximo ao potencial de oxidação da *Arnica montana* (0,39 V) e as amostras foram avaliadas através de amperometria, “*in situ*”, “*ex situ* imediato” e “*ex situ* após o tempo de repouso de 1 hora”.

Além disso, a espectrofotometria permitiu realizar a análise da absorbância das amostras em comprimentos de onda previamente selecionados, através de varredura em toda a faixa espectral, sendo considerado o valor de 280 nm como o pico de absorbância máxima, “*ex situ* imediato”. A espectrofotometria “*ex situ* após o tempo de repouso de 1 hora” foi realizada somente nos ensaios de US pulsado para verificar se o repouso da solução modifica o comportamento avaliado. A espectrofotometria “*in situ*” não foi realizada devido a limitações da técnica.

Sendo assim, as amostras da solução de extrato glicólico de *Arnica montana*, em diluição de 100 mL/L (determinada pelos ensaios experimentais, sendo esta a máxima concentração possível de ser avaliada), foram avaliadas através de amperometria e espectrofotometria em diferentes tempos (0, 5, 15 e 25 minutos) de aplicação de US nos modos contínuo (intensidade de 1,0 W/ cm<sup>2</sup>) e pulsado (100 Hz, 20%, intensidade de 1,0 W/ cm<sup>2</sup>).

#### 4.2.1 Ultra-som contínuo

##### Espectrofotometria:

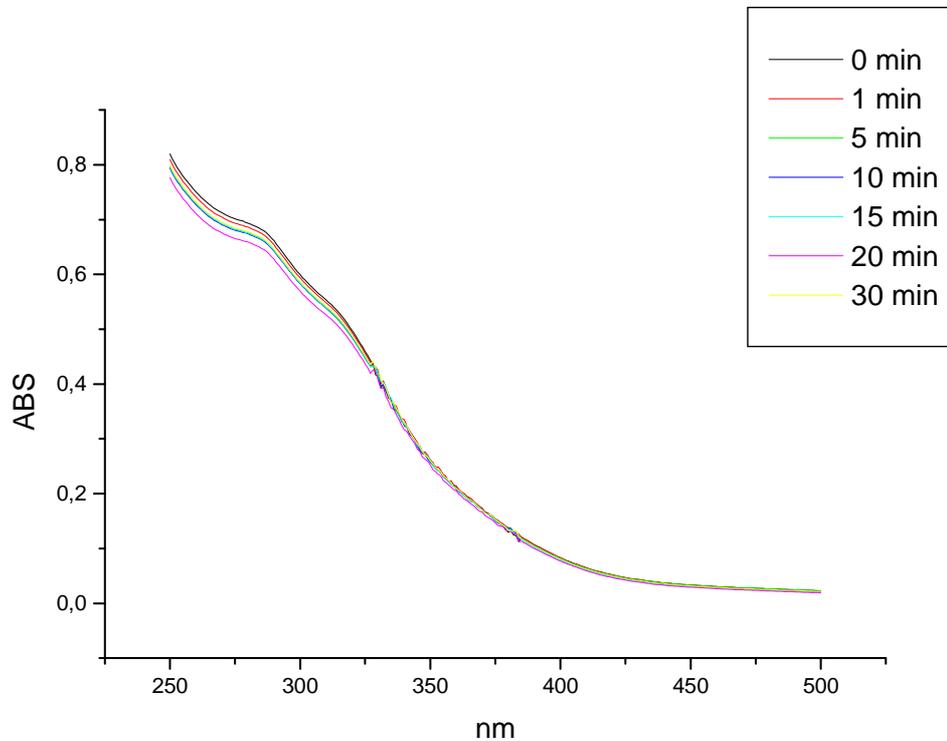


FIGURA 15 - Espectro UV/Vis “*ex situ*” imediato ( do extrato de Arnica 100mL/L, US contínuo,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L., em diferentes tempos de exposição ao US.

Avaliando a FIGURA 15, pode-se verificar que ocorre decréscimo das bandas características ao longo do tempo.

### Amperometria:

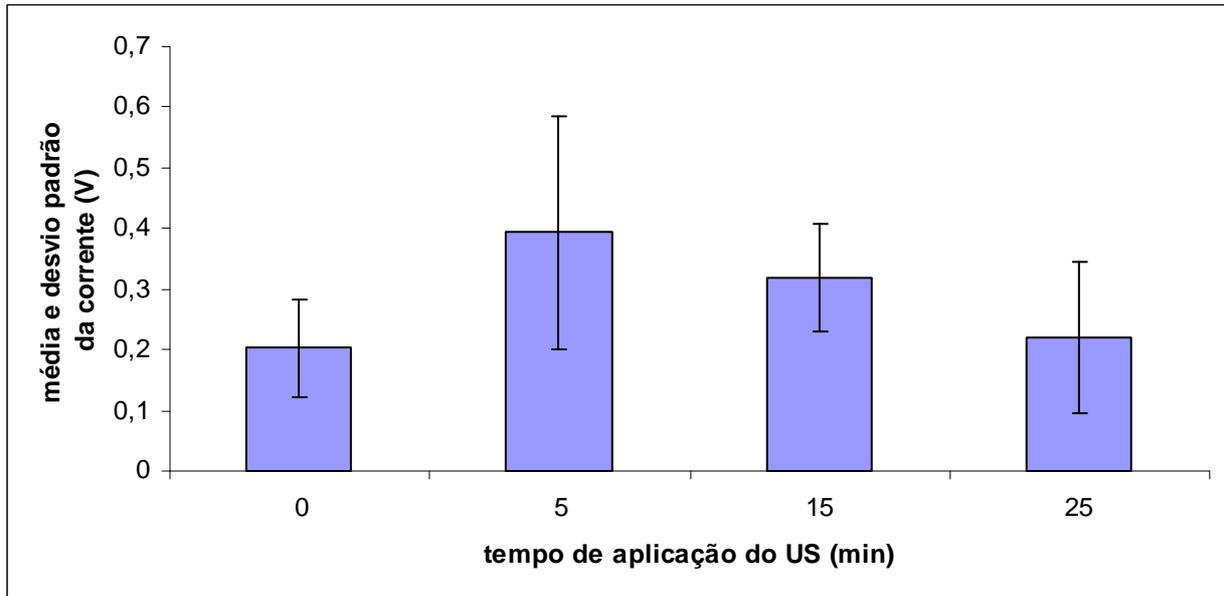


FIGURA 16 - Leitura “*in situ*”: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*In situ* (0,39 V): Na aplicação de US contínuo, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 16), o valor da corrente, antes da exposição da amostra ao ultra-som, era de aproximadamente  $0,20 \mu\text{A}$ . Realizando-se os testes “*in situ*” nos tempos de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de  $0,39 \mu\text{A}$ ,  $0,32 \mu\text{A}$  e  $0,22 \mu\text{A}$ , respectivamente.

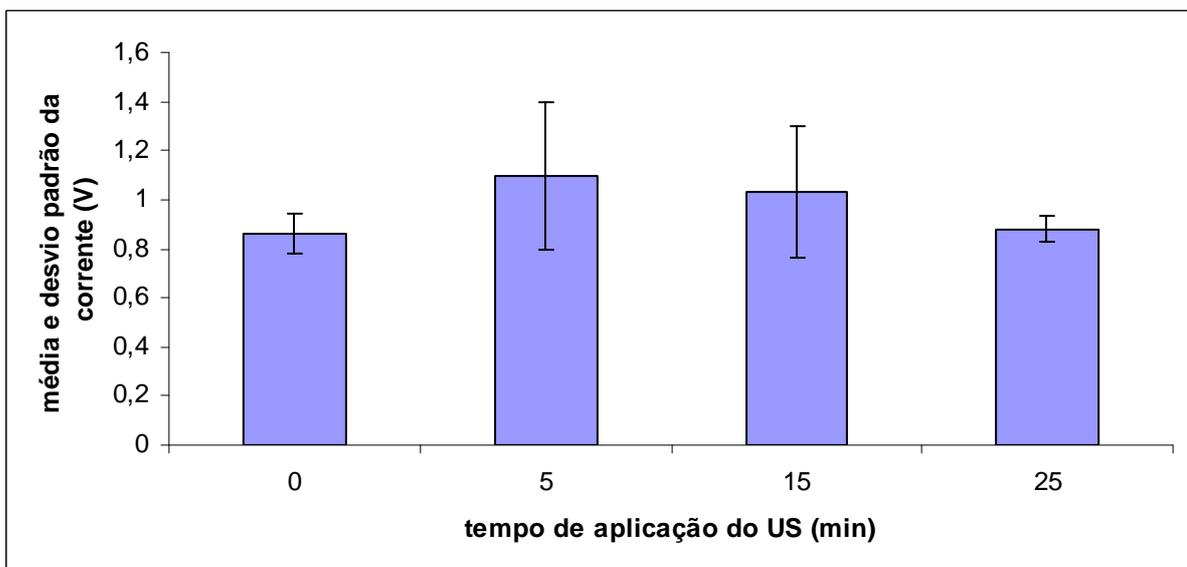


FIGURA 17 - Leitura “*in situ*”: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*In situ* (0,5 V): Na aplicação de US contínuo, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 17), o valor da corrente, antes da exposição da amostra ao ultra-som, era de aproximadamente  $0,86 \mu\text{A}$ . Realizando-se os testes “*in situ*” nos tempos de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de  $1,1 \mu\text{A}$ ,  $1,03 \mu\text{A}$  e  $0,88 \mu\text{A}$ , respectivamente.

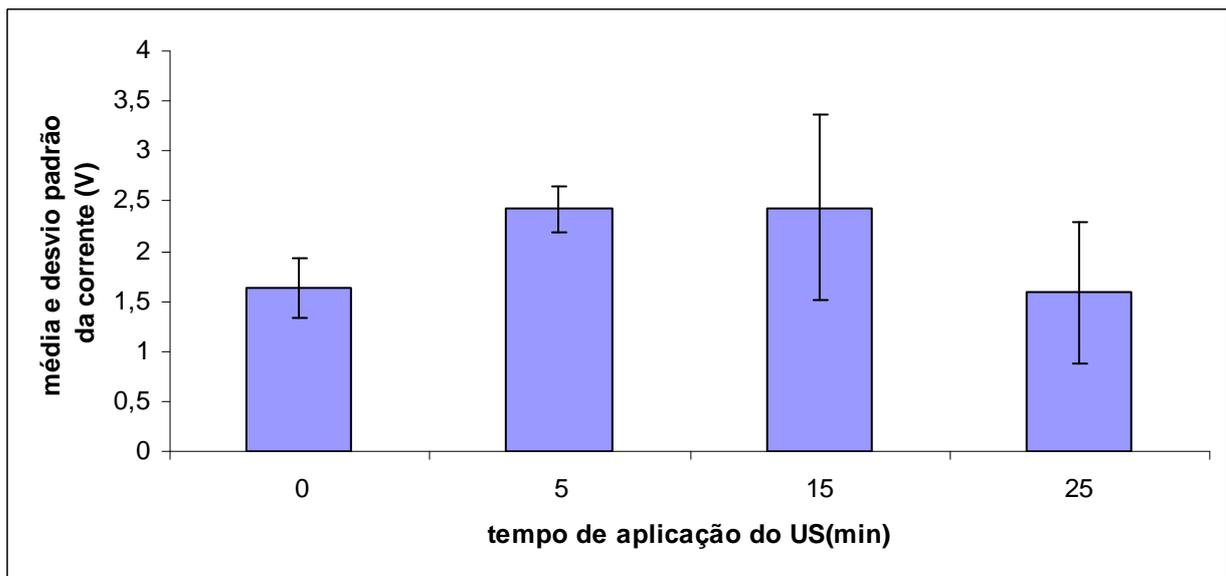


FIGURA 18 - Leitura *ex situ* imediato: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , diluição de 100mL/L

*Ex situ* imediato (0,39V): Na aplicação de US contínuo, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 18), o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente  $1,63 \mu\text{A}$ . Realizando-se os testes *ex situ* imediato, após os tempos de 5, 15 e 25 minutos de aplicação da técnica obteve-se um valor de corrente em torno de  $2,42 \mu\text{A}$ ,  $2,43 \mu\text{A}$  e  $1,58 \mu\text{A}$ , respectivamente.

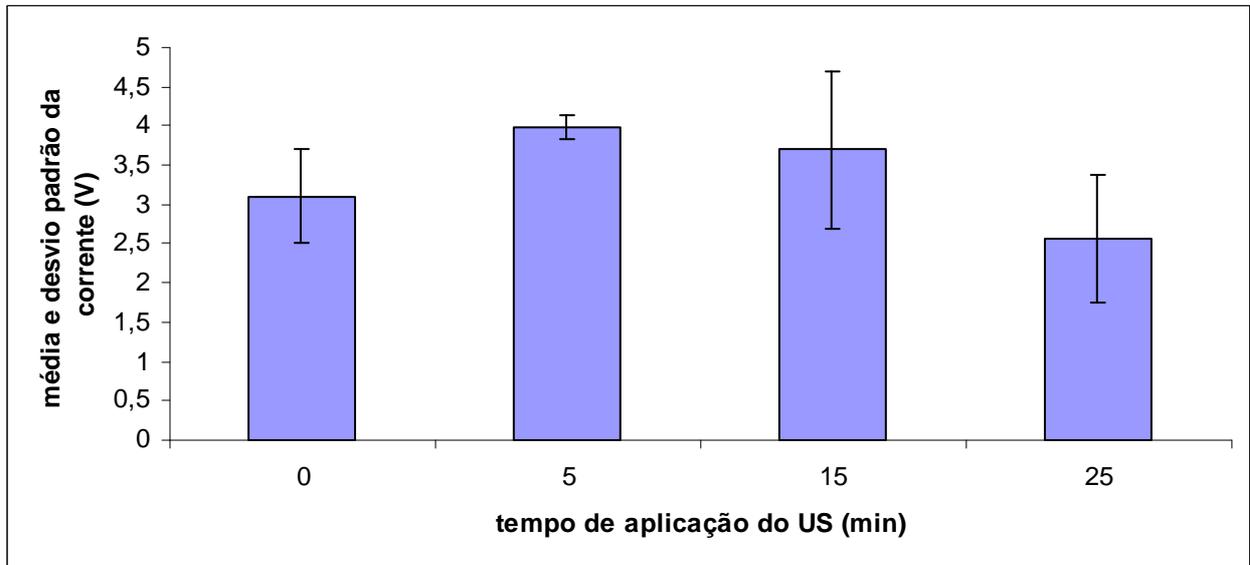


FIGURA 19 - Leitura *ex situ* imediato: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , diluição de 100mL/L

*Ex situ* imediato (0,5V): Na aplicação de US contínuo, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 19), o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente  $3,10 \mu\text{A}$ . Realizando-se os testes *ex situ* imediato, após os tempos de 5, 15 e 25 minutos de aplicação da técnica obteve-se um valor de corrente em torno de  $3,97 \mu\text{A}$ ,  $3,69 \mu\text{A}$  e  $2,56 \mu\text{A}$ , respectivamente.

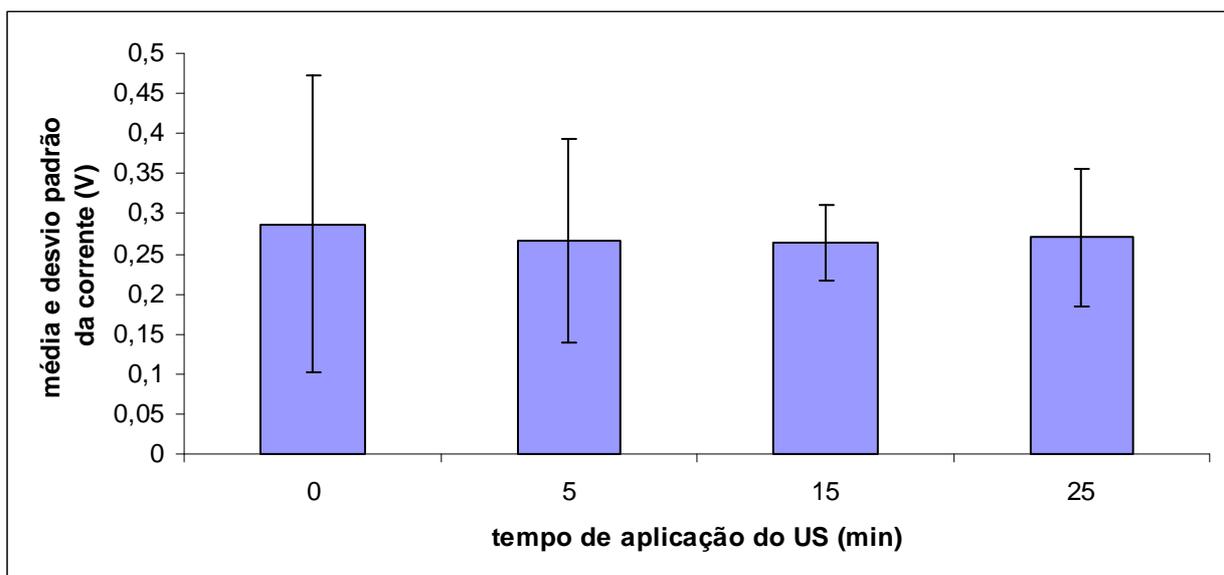


FIGURA 20 - Leitura *ex situ* (1 hora após): corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , diluição de 100mL/L

*Ex situ* (1 hora após, 0,39 V): Repetindo-se os testes, após 1 hora de repouso (FIGURA 20), nos mesmos parâmetros e concentração das análises *in situ* e *ex situ* imediato, o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 0,28 $\mu$ A. Após os tempos de aplicação de US de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de 0,26  $\mu$ A, 0,26  $\mu$ A e 0,27  $\mu$ A, respectivamente.

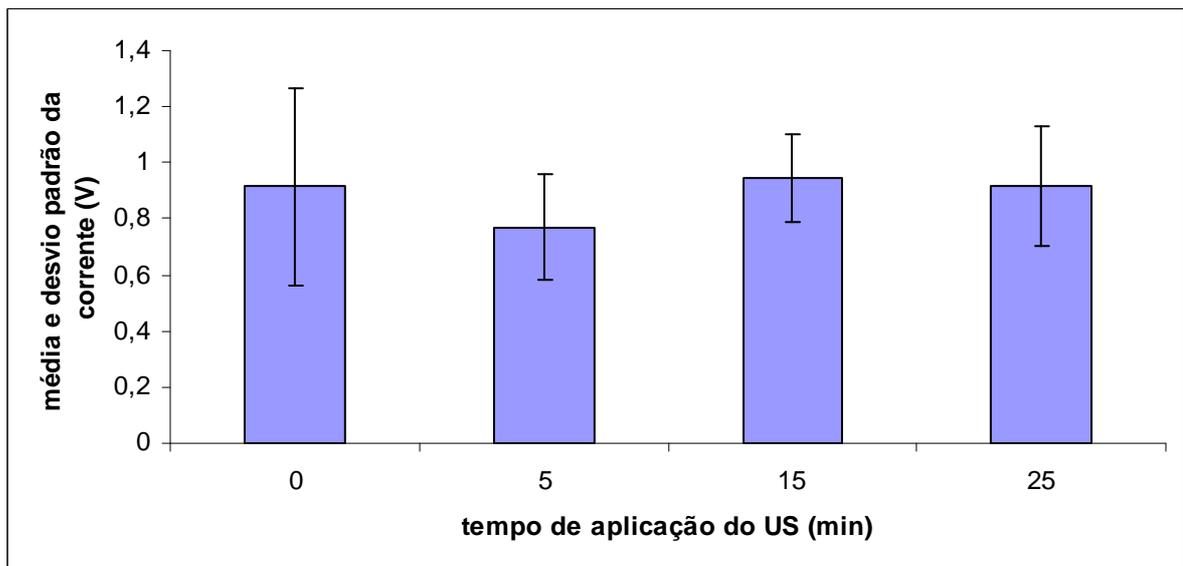


FIGURA 21 - Leitura *ex situ* (1 hora após): corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US contínuo,  $d = 1,0 \text{ W/cm}^2$ , diluição de 100mL/L

*Ex situ* (1 hora após, 0,5 V): Repetindo-se os testes, após 1 hora de repouso (FIGURA 21), nos mesmos parâmetros e concentração das análises *in situ* e *ex situ* imediato, o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 0,91 $\mu$ A. Após os tempos de aplicação de US de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de 0,77  $\mu$ A, 0,94  $\mu$ A e 0,91  $\mu$ A, respectivamente.

Comparando-se os resultados obtidos nas análises *in situ*, *ex situ* imediato e *ex situ* após 1 hora, em potenciais de 0,39 e 0,5 V, pode-se verificar que ocorre um comportamento semelhante *in situ* e *ex situ* imediato, ou seja, ocorre um aumento do valor de corrente em 5 minutos e um decréscimo gradativo do valor em 25 minutos de aplicação. Porém, após um tempo de repouso de 1 hora, os valores nos diferentes tempos, mantêm-se estáveis, indicando que a agitação das moléculas,

além da formação de subprodutos, por estímulo mecânico, podem ser estabilizadas após um período de repouso.

Utilizando-se a análise de variância (ANOVA) entre os resultados obtidos a partir do perfil voltamétrico da *Arnica montana*, antes e após a aplicação de ultra-som contínuo, em potenciais elétricos de 0,39V, nos tratamentos realizados *in situ*, *ex situ* imediato (logo após a aplicação do US) e *ex situ* após um tempo de repouso de 1 hora, não foram verificadas diferenças significativas ( $p = 0,0791$ ) e, também não foram verificadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição das amostras à terapia ( $p = 0,5875$ ). Para o potencial de 0,5 V foi observado o mesmo comportamento.

#### 4.2.2 Ultra-som pulsado

##### Espectrofometria:

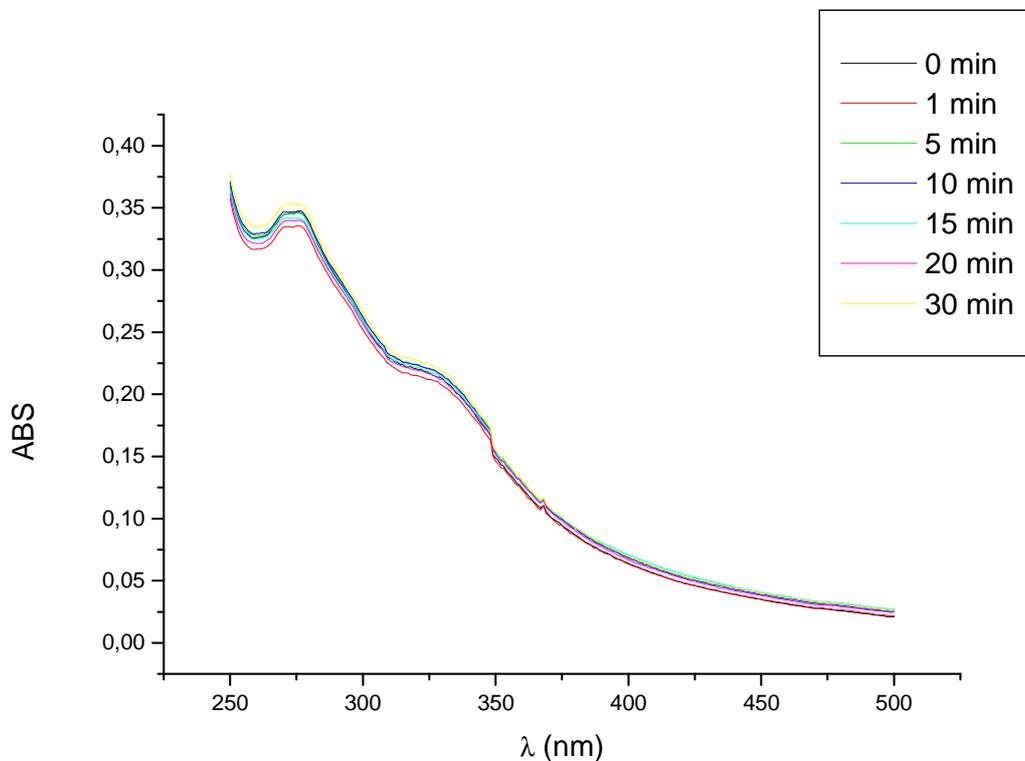


FIGURA 22 - Espectro UV/Vis “*ex situ imediato*” do extrato de *Arnica* 100mL/L, US pulsado, 100 Hz, 20% d= 1,0 W/cm<sup>2</sup>, em diferentes tempos de exposição ao US

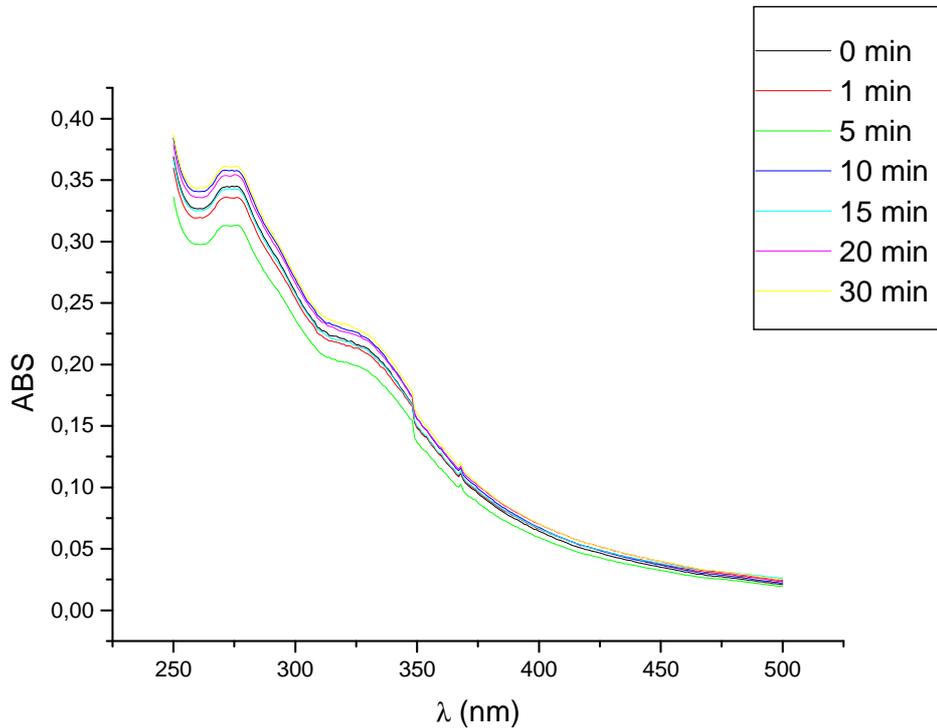


FIGURA 23 - Espectro UV/Vis “*ex situ* após 1 hora” do extrato de *Arnica* 100mL/L, US pulsado, 100 Hz, 20% d= 1,0 W/cm<sup>2</sup>, em diferentes tempos de exposição ao US

A análise das FIGURAS 22 e 23 permite verificar que, tal como ocorre na aplicação de US contínuo, há um decréscimo das bandas características ao longo dos diferentes tempos de aplicação, sendo que não houve diferença entre as análises *ex situ* imediato e *ex situ* após 1 hora.

Considerando que pequenas alterações nas espectrofotometrias podem ser devido ao fato da solução ser um extrato, com partículas sólidas em suspensão (dificultando a passagem de luz) também foram realizadas medidas espectrofotométricas com as soluções filtradas confirmando os resultados obtidos (TABELA 1).

Além disso, alterações podem ter ocorrido devido a complexidade da matriz.

TABELA 1 - Valores de absorvância “*ex situ*” imediato, “*ex situ*” após 1 hora de soluções filtradas em comprimento de onda de 275 nm

“ <i>Ex situ</i> ” imediato		“ <i>Ex situ</i> ” após 1 hora	
Tempo (min)	Absorbância	Tempo (min)	Absorbância
0	0,924	0	0,975
1	0,943	1	0,939
5	0,947	5	0,939
10	0,936	10	1,051
15	0,983	15	0,951
20	0,963	20	0,928
30	0,967	30	0,996

#### Amperometria:

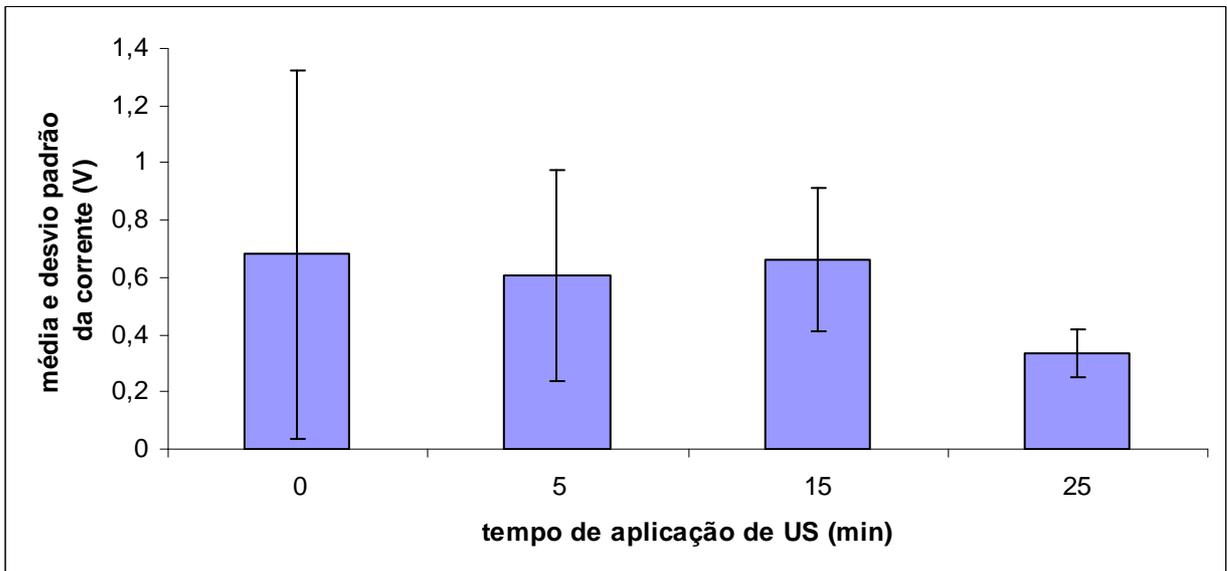


FIGURA 24 - Leitura *in situ*: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*In situ* (0,39 V): Na aplicação de US pulsado, numa frequência de 100 Hz, ciclo de duração de pulso de 20 %, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 24) o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 0,68

$\mu\text{A}$ . Realizando-se os testes “*in situ*”, obteve-se um valor de corrente nos tempos de 5, 15 e 25 minutos de 0,60  $\mu\text{A}$ , 0,66  $\mu\text{A}$  e 0,33  $\mu\text{A}$ , respectivamente.

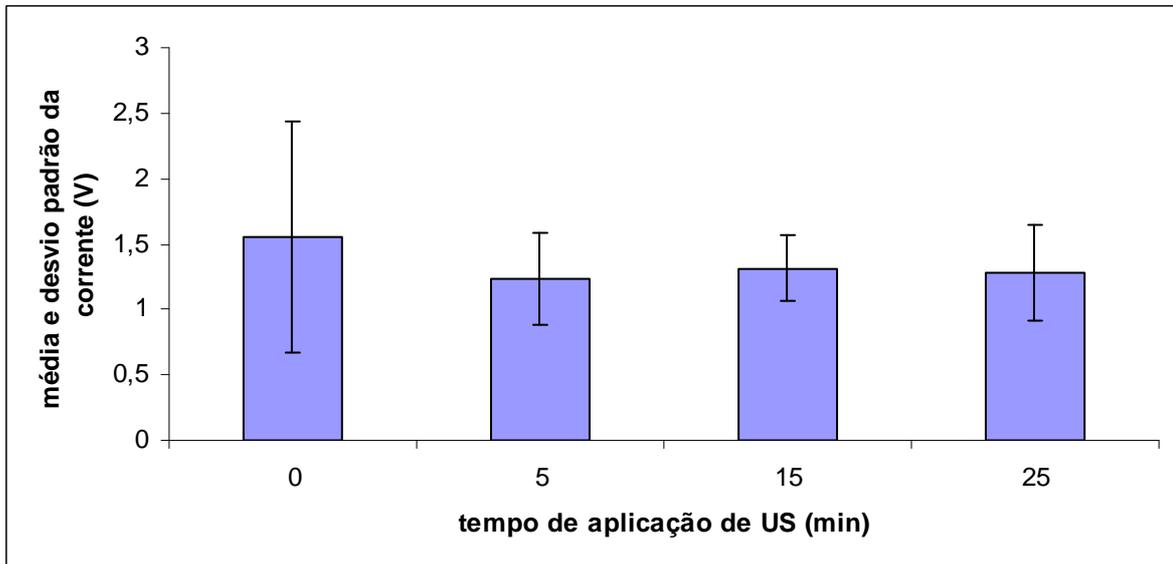


FIGURA 25 - Leitura *in situ*: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*In situ* (0,5 V): Na aplicação de US pulsado, numa frequência de 100 Hz, ciclo de duração de pulso de 20 %, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 25), o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 1,55  $\mu\text{A}$ . Realizando-se os testes “*in situ*”, obteve-se um valor de corrente nos tempos de 5, 15 e 25 minutos de 1,24 $\mu\text{A}$ , 1,31  $\mu\text{A}$  e 1,28  $\mu\text{A}$ , respectivamente.

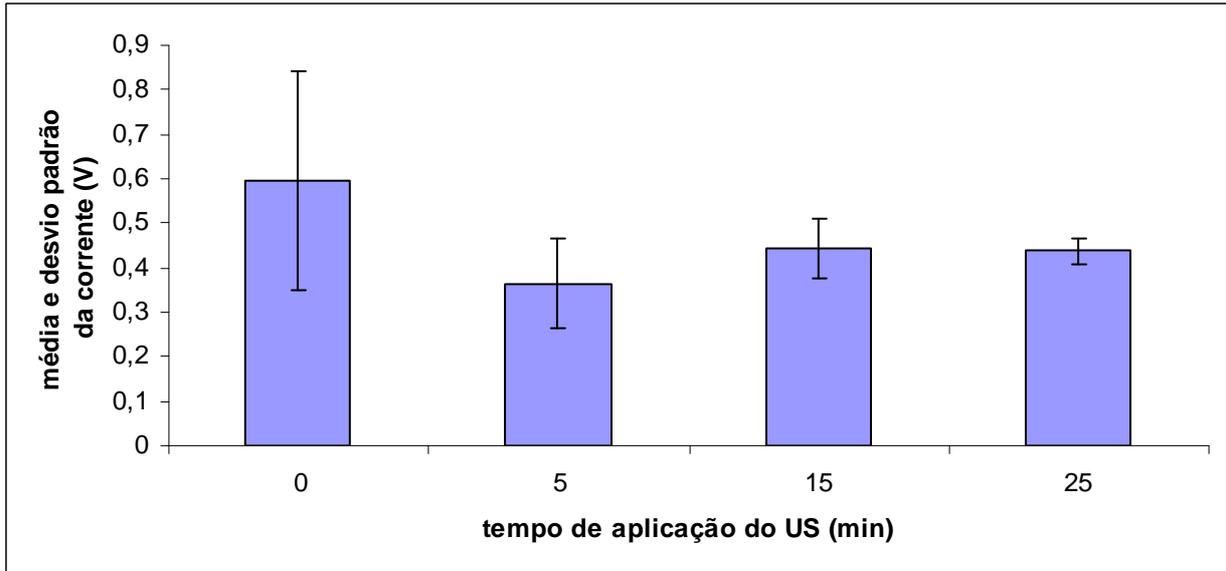


FIGURA 26 - Leitura *ex situ* imediato : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*Ex situ* imediato (0,39 V): Na aplicação de US pulsado, numa frequência de 100 Hz, ciclo de duração de pulso de 20 %, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 26), o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente  $0,59 \mu\text{A}$ . Realizando-se os testes “*ex situ*” imediato, após os tempos de 5, 15 e 25 minutos de aplicação da técnica, obteve-se um valor de corrente em torno de  $0,36 \mu\text{A}$ ,  $0,44 \mu\text{A}$  e  $0,43 \mu\text{A}$ , respectivamente.

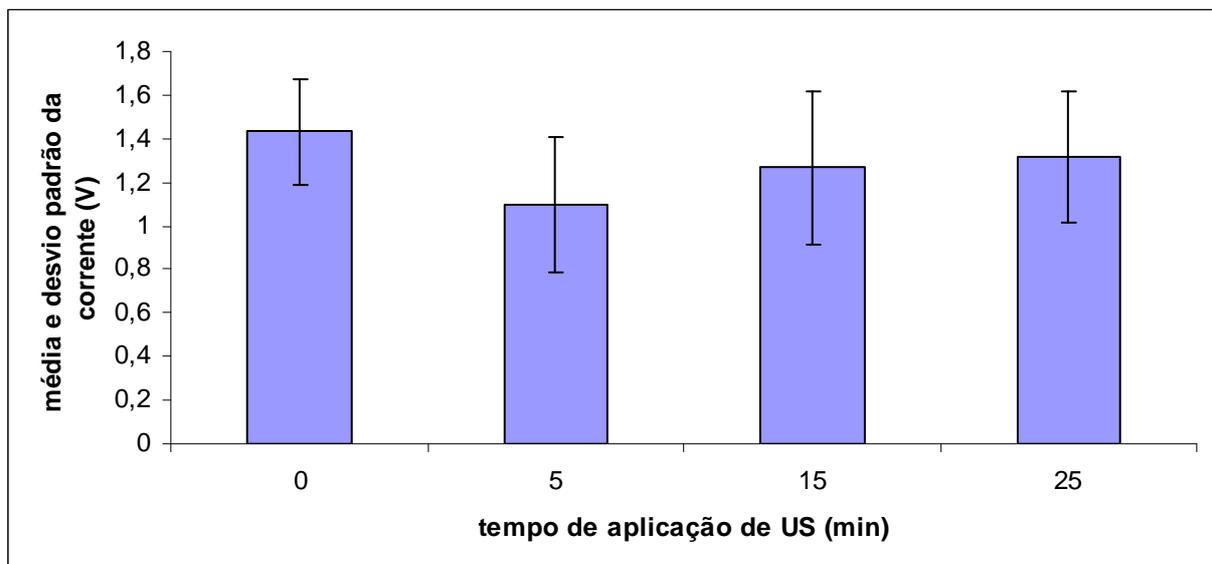


FIGURA 27 - Leitura *ex situ* imediato : corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*Ex situ* imediato (0,5 V): Na aplicação de US pulsado, numa frequência de 100 Hz, ciclo de duração de pulso de 20 %, numa intensidade de 1,0 W/cm<sup>2</sup>, em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 27) valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 1,43μA. Realizando-se os testes “*ex situ*” imediato, após os tempos de 5, 15 e 25 minutos de aplicação da técnica, obteve-se um valor de corrente em torno de 1,09 μA, 1,26 μA e 1,31 μA, respectivamente.

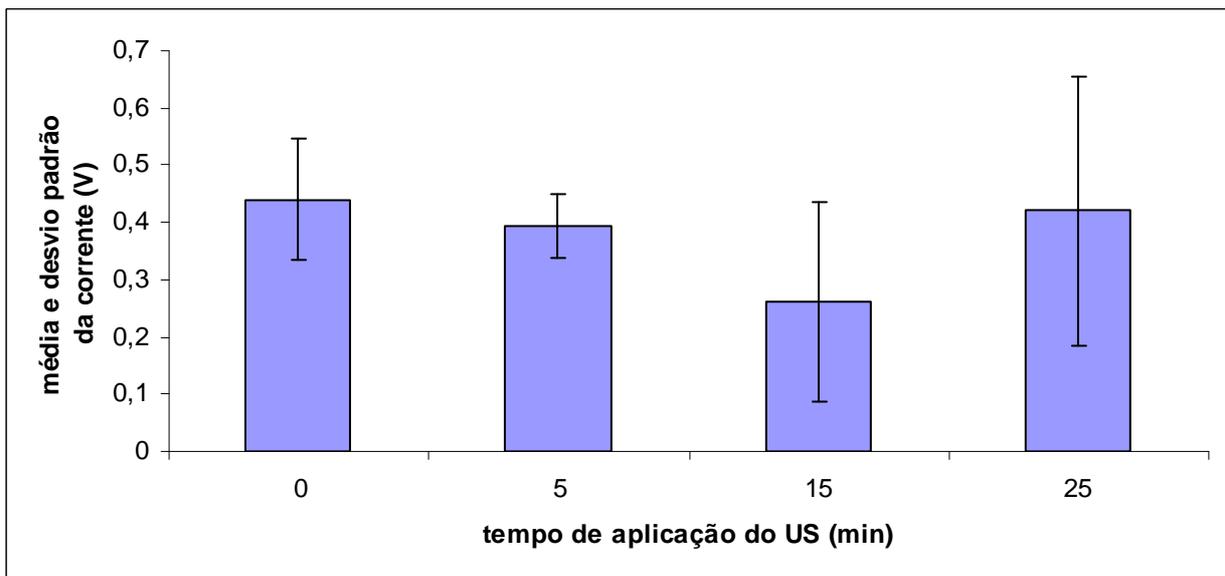


FIGURA 28 - Leitura *ex situ* após repouso de 1 hora: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,39 V. US pulsado 100 Hz, 20 %, d= 1,0 W/cm<sup>2</sup>, solução 100mL/L

*Ex situ* (1 hora após, 0,39 V): Repetindo-se os testes, após 1 hora de repouso (FIGURA 28), nos mesmos parâmetros e concentração das análises *in situ* e *ex situ* imediato, o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente 0,44μA. Após os tempos de aplicação de US de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de 0,39 μA, 0,26 μA e 0,42 μA, respectivamente.

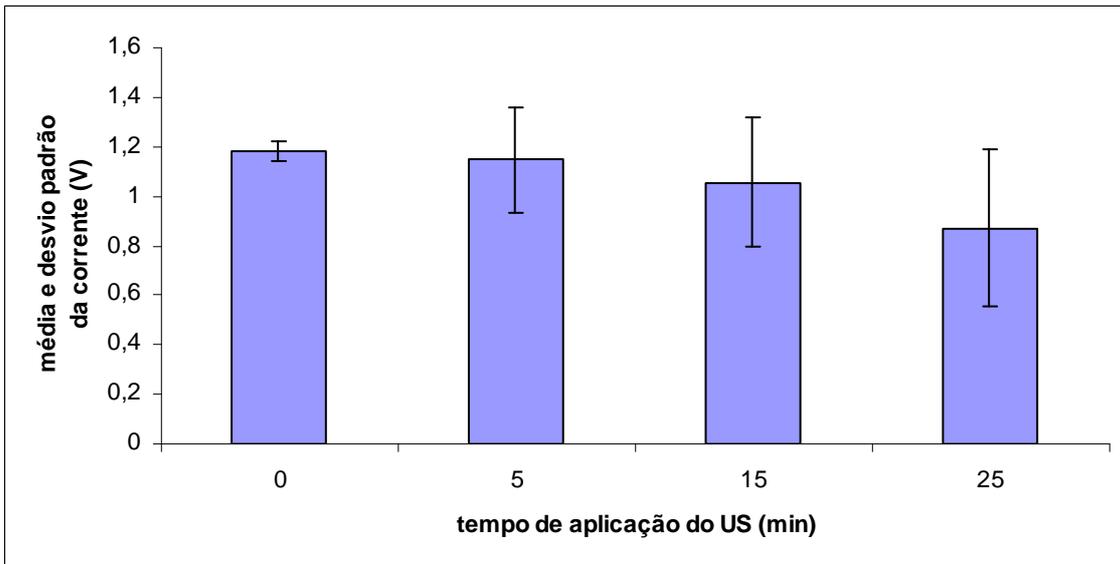


FIGURA 29 – Leitura *ex situ* após repouso de 1 hora: corrente x tempo de US aplicado em potencial de 0,5 V. US pulsado 100 Hz, 20 %,  $d= 1,0 \text{ W/cm}^2$ , solução 100mL/L

*Ex situ* (após 1 hora, 0,5 V): Na aplicação de US pulsado, numa freqüência de 100 Hz, ciclo de duração de pulso de 20 %, numa intensidade de  $1,0 \text{ W/cm}^2$ , em extrato glicólico de *Arnica montana* em diluição de 100 mL/L (FIGURA 29) e potencial de 0,5 V, o valor da corrente antes da exposição da amostra ao ultra-som era de aproximadamente  $1,18 \mu\text{A}$ . Após os tempos de aplicação de US de 5, 15 e 25 minutos, obteve-se um valor de corrente de  $1,14 \mu\text{A}$ ,  $1,05 \mu\text{A}$  e  $0,87 \mu\text{A}$ , respectivamente.

Utilizando-se a análise de variância (ANOVA) entre os resultados obtidos a partir do perfil voltamétrico da *Arnica montana*, antes e após a aplicação de ultra-som pulsado a 100 Hz, 20%, em potenciais elétricos de 0,39V, nos tratamentos realizados *in situ*, *ex situ* imediato (logo após a aplicação do US) e *ex situ* após um tempo de repouso de 1 hora, também não foram verificadas diferenças significativas ( $p = 0,0754$ ) e, também não foram verificadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição das amostras à terapia ( $p= 0,6631$ ).

Nas TABELAS 2 e 3, tem-se a análise estatística dos experimentos realizados.

TABELA 2 - Análise de variância entre os tratamentos contínuos *ex situ* e *in situ*, com diferença de 1 hora, para cada um dos potenciais utilizados (V) e para os quatro diferentes tempos (0, 5, 15 e 25 min). F = valor da análise de variância; P = probabilidade.

Potencial (V)	Tratamentos		Tempos	
	F	P	F	P
0,39	0,0592	0,8056	0,6403	0,6032
0,5	0,6460	0,5613	0,3492	0,7923

TABELA 3 - Análise de variância entre os tratamentos pulsados *ex situ* e *in situ*, com diferença de 1 hora, para cada um dos potenciais utilizados (V) e para os quatro diferentes tempos (0, 5, 15 e 25min). F = valor da análise de variância; P = probabilidade

Potencial (V)	Tratamentos		Tempos	
	F	P	F	P
0,39	2,4393	0,1348	0,3943	0,7615
0,5	2,9435	0,1024	0,5374	0,6668

Pode-se observar que tanto para o US contínuo como o pulsado (TABELA 2 e 3), não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos e entre os tempos para os potenciais testados.

Apesar de, através da análise de variância (ANOVA), não terem sido verificadas diferenças significativas ( $p = 0,1024$ ) entre os resultados obtidos a partir do perfil voltamétrico da *Arnica montana*, antes e após a aplicação de ultra-som pulsado a 100 Hz, 20%, e também não terem sido verificadas diferenças significativas entre os diferentes tempos de exposição das amostras à terapia ( $p = 0,6668$ ), o potencial que apresentou alterações eletroquímicas foi o de 0,5 V após o tempo de repouso de 1 hora.

Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que este estudo, diferentemente de estudo já realizado (Gil, Gonçalves, Lucio, 2007) utiliza eletrodo

de trabalho de platina, tendo como eletrodo de referência Ag/AgCl, ao invés do eletrodo de pasta de carbono e Ag/AgCl/KCl<sub>(sat)</sub>, relatado na literatura.

Portanto, pode-se constatar, através da análise dos gráficos, que ocorrem alterações eletroquímicas no sistema, podendo indicar a degradação de princípios ativos presentes na solução de *Arnica montana*. Essa alteração provavelmente ocorre devido à grande agitação (cavitação) promovida pelo US, este fenômeno pode ocasionar a quebra das interações da molécula, sendo que estes extratos de plantas possuem duplas ligações que também são afetadas pela agitação do sistema (Peres et al., 2006).

Este fenômeno é conhecido como sendo a ação física do US, que além do mencionado, o efeito pode promover a limpeza das superfícies eletródicas por dissolução das camadas inibidoras, resultando principalmente na melhoria da transferência de massa sólido-líquido entre o eletrodo e a solução. Além disso, há os efeitos químicos, que também são conseqüências dos colapsos violentos. A teoria do "hot spot" prediz altas temperaturas e pressões dentro da bolha durante o final da compressão. Sob tais condições estáticas, espécies oxidadas são geradas pela clivagem homolítica das moléculas (gases e solvente). Em meios aquosos e na presença do oxigênio, os radicais assim formados podem melhorar consideravelmente o desempenho do processo eletroquímico (Garbellini, Salazar-Banda, Avaca, 2008).

Nos experimentos realizados, utilizando-se como referência o potencial de 0,5 V *ex situ* após 1 hora, verifica-se que há uma tendência linear de decréscimo dos valores de corrente, por meio da plotagem da corrente x tempo de degradação (FIGURA 29).

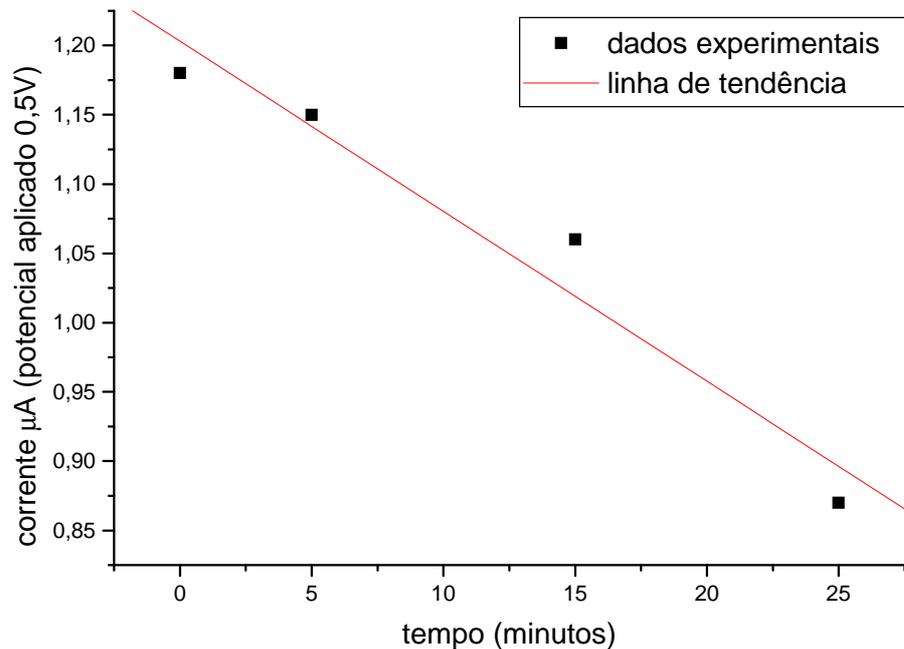


FIGURA 30 - Valores de corrente x tempo de degradação da *Arnica montana*

Observando a FIGURA 30, percebe-se que há uma tendência linear de decréscimo, representado pela equação da reta  $y = -0,01227x + 1,20305$  e coeficiente de correlação  $R = 0,97426$ , no decaimento da densidade de corrente ( $j$ ) das soluções de *Arnica montana* em diferentes tempos de aplicação de US, indicando a possibilidade de detecção da degradação da *Arnica montana* através da técnica de voltametria cíclica e/ou técnica amperométrica, sendo uma possibilidade semi-quantitativa de detecção de amostras de *Arnica montana*. Considerando a ação do US sobre as moléculas de água, formando radicais hidroxila e o efeito de cavitação que pode promover a clivagem homolítica de compostos presentes em solução, além da presença de princípios ativos como a helenalina (FIGURA 2) e a isoquercetina (FIGURA 3), que apresentam em sua estrutura radicais carbonila, hidroxila e anéis aromáticos, sugere-se que a ação física e química do US promove alteração do substrato estudado (*Arnica montana*) envolvendo o solvente (água) e também o extrato.

O comportamento da *Arnica montana* pode ser comprovado pela espectrofotometria da rotina, cujos resultados apresentam as mesmas bandas de

absorção características do extrato, descartando, dessa forma, a influência do propilenoglicol, presente na formulação do extrato glicólico (Barnes, 2008).

Cabe destacar que, em amostras contendo matrizes complexas, é necessária a realização de abertura da amostra para que não ocorram interferências na análise eletroquímica, já que outros compostos podem ter suas reações eletroquímicas nesta mesma faixa de potenciais (janela eletroquímica) (Stulp, Silva, Marmitt, 2008).

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram a possibilidade de detecção da degradação do extrato glicólico de *Arnica montana* através da técnica de espectrofotometria, voltametria cíclica e/ou técnica amperométrica, sendo uma possibilidade semi-quantitativa de detecção das amostras.

Sendo assim, sugere-se que a ação física e química do ultra-som terapêutico (UST), tanto no modo contínuo quanto no modo pulsado, promove alteração do substrato estudado (*Arnica montana*) envolvendo o solvente (água) e também o extrato.

Nos experimentos realizados, verifica-se que há uma tendência linear de decréscimo dos valores de corrente, por meio da plotagem da corrente x tempo de degradação. No que se refere a prática clínica, considerando-se que reações de oxidação são indesejáveis, pelo risco de desencadear a cascata de formação de radicais livres, sugere-se que este pode ser um resultado desfavorável. Além de que em regiões de altos valores de potencial (acima de 1,2 V), verifica-se a formação de oxigênio através da oxidação da água.

Portanto, considerando-se que o ultra-som é um recurso extremamente recrutado na prática fisioterapêutica e sabendo-se que houve uma degradação das amostras do extrato de arnica, após a aplicação da técnica de fonoforese, torna-se necessário o conhecimento de seus efeitos ao interagir com tecidos, ou seja,

considerando-se que a Arnica possui ação anti-inflamatória cientificamente comprovada, porém alterada eletroquimicamente pela presença do veículo (solventes + US), sugere-se a verificação da ação promovida por estes subprodutos sobre os tecidos superficiais, através de análise histopatológica de tecidos sadios de suínos (ANEXO B), para excluir a possibilidade de danos aos tecidos tratados.

Além disso, outro fator relevante a prática clínica é a permeação da amostra nos tecidos superficiais. A degradação do extrato de Arnica (formação de subprodutos) permite sugerir o aumento da mobilidade molecular, fator este positivo no que se refere ao uso do US, através da técnica de fonoforese, como veículo para permeação das amostras. Neste sentido, torna-se necessário verificar se a molécula formada possui a atividade anti-inflamatória atribuída a Arnica.

Portanto, infere-se que existem argumentos favoráveis à utilização da técnica (US + extrato glicólico de *Arnica montana*) como método complementar de tratamento de cirurgias plásticas considerando-se que as alterações dos parâmetros físicos (absorbância) e eletroquímicos evidenciam pequenas variações de medidas. Os dados apresentados têm também a intenção de evidenciar a continuidade dos estudos sugeridos a fim de investigar os reais efeitos da somatória dos efeitos do ultra-som através da técnica de fonoforese e da *Arnica montana*.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

1. Investigar a ação dos subprodutos em tecidos superficiais;
2. Investigar a ação antiinflamatória dos subprodutos formados pela degradação da amostra do extrato de *Arnica montana*;
3. Investigar a otimização da permeação do extrato de *Arnica montana*, através da técnica de fonoforese, em tecidos superficiais.
4. Investigar o comportamento da Rutina, com grau de pureza elevado, por possuir estrutura química semelhante à quercetina.

## REFERÊNCIAS

AGNE, Jones E. **Eletrotermoterapia: Teoria e Prática**. 2. ed. Santa Maria: Orium, 2004.

AGUIAR C. L. **Flavonóides e suas atividades biológicas**. Disponível em: [www.unopar.br/artigos](http://www.unopar.br/artigos). Acesso em: 13 jan. 2005.

ALVES, Clayton Queiroz; et al. Avaliação da atividade antioxidante de Flavonóides. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**, ano 5, n.12, p. 1-8, 2007.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria Nº 6/Ms/Snvs, de 31 de Janeiro de 1995**. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=5311&word=fitoter%C3%A1pico>>. Acesso em: 02 março 2008.

AVACA, Luis A.; et al. Sonovoltametric Determination of 4-Nitrophenol on Diamond Electrodes. **Journal Brazilian Chemical Society**, v.18, n.6, p.1095-1099, 2007.

AZEVEDO, E. F. de; ALBUQUERQUE, Y. D. T. de; SANTOS, W. T. P. dos. Investigação de metodologias de determinação de pesticidas carbamatos em alimentos por cromatografia líquida. **Horizonte Científico**, Vol.1, No.6, 2006.

BARNES, Dênis. **Efeito do Ultra-som sobre a nocicepção e o processo inflamatório em modelos animais e sobre a estrutura química de fármacos**. Dissertação de mestrado. Centro Universitário Univates, 2008.

BISSET, Norman Grainger (ed). **Max Wichtl Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis**. Stuttgart: Medpharm, 1994.

BORGES, F. S. **Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. São Paulo: Phorte, 2006.

BREVIDELLI, Maria Meimei; DOMENICO, Edvane Birelo Lopes De. **Trabalho de Conclusão de Curso**: Guia prático para docentes e alunos da Área da Saúde. São Paulo: Iátria, 2006.

CAMPOS, Maria Silvia Mariani Pires de. **Influência do ultrassom na permeação da cafeína**: Estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suíno. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2004.

CÁRNIO, Pedro Barco. **Variação dos parâmetros físicos do campo ultra-sonico em fonoforese com diclofenaco gel**. São Carlos, 2006.

CATANHO M., MALPASS G. R. P., MOTHEO A. de J. Evaluation of electrochemical and photoelectrochemical methods for the degradation of three textile dyes. **Química Nova**, Vol. 29, No. 5, pp. 983-989, 2006.

CHEMIN, Beatris Francisca. **Guia prático da UNIVATES para trabalhos acadêmicos**. Lajeado: UNIVATES, 2005.

CHORILLI, M, et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v.16, s.n., p.73-77, 2004.

CIENFUEGOS, Freddy; VAITSMAN, Delmo. **Análise Instrumental**. Rio de Janeiro: Interciências, 2000.

FENNER, Raquel; et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 4, n. 3, 2006.

FUSARO, Cláudio. **Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários sadios**. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Biblioteca digital da UNICAMP. <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000380461>. Acesso em: 04 mar. 2008.

GARBELLINI, Gustavo S.; SALAZAR-BANDA, Giancarlo R.; AVACA, Luis A. Aplicação do ultra-som em sistemas eletroquímicos: Considerações Teóricas e Experimentais. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.31, n.1, p. 123-133, 2008.

GIL, E. S.; GONÇALVES, A. L. S. ; LUCIO, T.C. Determinação do potencial anódico em estado sólido: Uma ferramenta preditiva para determinação do potencial antioxidante de fitoterápicos. In: **Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia-SP**. São Paulo: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.30, n.2, 374-381, 2007.

GUIRRO, Elaine Caldeira de O.; GUIRRO, Rinaldo Roberto de J. **Fisioterapia Dermato-funcional**: Fundamentos, Recursos e Patologias. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.

GUIRRO, Rinaldo; et al. Calibration of Therapeutic Ultrasound Equipament. **Physiotherapy**, v. 83, n.8, p. 419-422, 1997.

GUIRRO, Rinaldo; SANTOS, Sandra C. Britschcy dos. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. **Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo**, v.4, n.2, p. 76-82, 1997.

\_\_\_\_\_. Britschcy dos. Evaluation os acoustic intensity of new ultrasound therapy equipament. **Elsevier Science**, v.39, s.n, p. 553-557, 2002.

GUIRRO et al. **As variáveis físicas do ultra som terapêutico**: uma revisão. *Revista de Ciência e Tecnologia*. P. 31-39, 1996.

HADDAD, Nagib. **Metodologia de estudos em ciências da saúde: como planejar, analisar e apresentar um trabalho científico**. São Paulo: Roca, 2004.

HARRI, Lorenzi; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais**: Nativas e exóticas Cultivadas. Brasil, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

JEFFERY, G.H.; et al. **Vogel: análise inorgânica quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1992.

KANASHIRO A, Polizello AC, Lopes JLC, Valim YML. **Produção de radicais de oxigênio por neutrófilos ativados por diferentes estímulos**: função de flavonóides. *Soc Bras Qui*. Disponível em: [www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1150-1](http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/1150-1). Acesso em: 13 jan. 2005.

KOEKE, P.U. **Estudo comparativo da eficácia da fonoforese, do ultra som terapêutico e da aplicação tópica de hidrocortisona no tratamento do tendão de rato em processo de reparo tecidual**. Dissertação de mestrado. São Carlos, 2003.

KITCHEN, Sheila. **Eletroterapia**: prática baseada em evidências. 3. ed. São Paulo: Manole, 2003.

LAVAGNOLI L. V.; NAVARRO, M., DE GIOVANI, W. F.; ROMERO, J. R. Oxidações eletrocalíticas de substratos orgânicos em sistema bifásico utilizando um complexo de Rutênio (IV). **Química Nova**, Vol. 18, No. 2, pp. 157-159, 1995.

LOW, John; REED, Ann. **Eletroterapia explicada**: princípios e práticas. São Paulo: Manole, 2001.

MACÊDO, S. B. et al. Anti-inflammatory activity of *Árnica montana* 6CH: preclinical study in animals. **Homeopathy** , v.93. n.2, 84-87, 2004.

MACIEL, Renata L; et al. Características físico-químicas e químicas e estudo preliminar de estabilidade de tinturas preparadas com espécies de arnica *Lychnophora* em comparação com *Arnica montana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 99-104, 2006.

MALPASS, G. R. P.; MOTHEO, A. J. Screening Process for Activity Determination of Conductive Oxide Electrodes for Organic Oxidation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 19, No. 4, pp. 672-678, 2008.

MANSUR, João de Souza, et al. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. V. 61 (3), p. 121-124, 1986.

NOEL, M.; VASU, K. I. **Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry**. London: Aspect Publications Ltd, 702 p., 1990.

OLIVEIRA, Fernando de; AKISSUE, Gokithi. **Fundamentos de Farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.

OLIVEIRA, Franciêda Q.; GONÇALVES, Licínio A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, p. 36-41, 2006. Disponível em: < [http://www.farmacia.ufg.br/revista/\\_pdf/vol3\\_2/artigos/ref\\_v3\\_2-2006\\_p36-41.pdf](http://www.farmacia.ufg.br/revista/_pdf/vol3_2/artigos/ref_v3_2-2006_p36-41.pdf)> Acesso em: 07 mar. 2008.

PÉRES, Valeria Flores; et al. Comparison of soxhlet, ultrasoun-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and Vitamin E from *Piper gaudichaudianum* Kunth. **Journal of Chromatography A**, v.1105, s.n, p.115-118, 2006.

POLACOW et al. **Efeito do ultra-som e do d-pantenol na regeneração tegumentar**. Revista brasileira de fisioterapia. V. 9, No. 3, p. 365-371, 2005.

POLACOW, Maria Luiza Ozores et al. Desenvolvimento e estudo reológico de formulação contendo DMAE (Dimetilaminoetanol). Estudo experimental de seu efeito na pele, associado com eletroestimulação neuromuscular. 5ª MOSTRA ACADÊMICA DE PESQUISA UNIMEP . 23 A 25 de outubro 2007.

PROFETI, L. P. R., PROFETI, D., OLIVI, P. Atividade eletrocatalítica de eletrodos compostos por Pt, RuO<sub>2</sub> e SnO<sub>2</sub> para a eletrooxidação de formaldeído e ácido fórmico, **Eclética Química**, Vol. 30, no. 1, pp. 75-83, 2005.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 27, n.5, p. 771-780, 2004.

ROBINSON, Andrew J.; MACKLER-SNYDER, Lynn. **Eletrofisiologia Clínica: Eletroterapia e teste eletrofisiológico**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

ROSADO, Catarina; RODRIGUES, Luis Monteiro. Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy. **BioMedic Central**, v.3, sn, 2003. Disponível em: < <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=317329&blobtype=pdf>>. Acessado em: 04 mar. 2008.

SANTOS, S. X. dos; MAZO, Luiz H.; CAVALHEIRO, T. G., The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 19, No. 8, pp. 1600-1606, 2008.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre Hipoclorito de Sódio e Ácido Peracético na Inativação de E. Coli, Colifagos E C. Perfringens em Água com

Elevada Concentração de Matéria Orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 111-117, 2005.

SILVA, Cristiano Pochmann da; et al. Avaliação da degradação do corante vermelho *Bordeaux* através de processo fotoquímico. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.13, n.1, 2008.

STULP, S., SILVA, C. P., MARMITT, S. **Avaliação eletroquímica e degradação fotoquímica do pesticida Malathion**. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v.9, n. 12, p. 7 – 12, 2008.

TAUBER, M.M.; GUEBITZ, G.M.; REHOREK, A.; **Degradation of Azo Dyes by Laccase and Ultrasound Treatment**. Applied and Environmental Microbiology, v. 71, N. 5, 2005, PP. 2600- 2607.

TESKE, Magrid; TRENTINI, Anny Margaly M. **Compêndio de Fitoterapia – Herbarium**. 3. ed. Curitiba: Herbarium, 1997.

TETAU, Max. **Matière Médicale Homéopathique Clinique et Associations Biothérapeutiques**. Paris: Maloine, 1979.

TETAU, M. **Arnica and injury, doublé blind clinical study**. The Homeopathic Heritage. v. 18, pp. 625-627, 1993.

VANNIER, Léon; POIRIER, Jean. **Tratado de Matéria Médica Homeopática**. 9.ed. São Paulo: Andrei, 1987.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Ângelo C.; MACIEL, Maria Aparecida. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, Rio de Janeiro, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

VOISIN, H. **Manual de Materia Médica para o Clínico Homeopata**. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1984.

VUKOVIC, M. Oxygen evolution reaction on thermally treated iridium oxide films. **Journal of Applied Electrochemistry**, Vol. 17, pp. 737-745, 1987.

ZAR,J. **Biostatistical Analysis**. 4. ed. Prentice Hall: 1999.

## **ANEXOS**

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Laudo Técnico do Extrato.....	73
ANEXO B - Projeto de Pesquisa.....	75
ANEXO C - Study of the Effects of Ultrasound in Phytotherapics Propagation through <i>Arnica montana</i> degradation analysis.....	106

## **Anexo A – Laudo Técnico do Extrato**



Laboratório Schraibmann Ltda. - ms - 1.04.320-1

Rua Maria Catur. 208 - Vila Cretti - Carapicuíba - SP - CEP 06317-290

Fone / Fax: 0800 124522 - Site: www.schraiber.com.br - E-mail: qualidade@schraiber.com.br

Produto: **EXTRATO GLICÓLICO DE ARNICA**

**LOTE 4652**

Fabr.: 10/2005

Validade: 5 anos

**RESULTADOS DA ANÁLISE**

**ANÁLISE**

**RESULTADO**

**\*ESPECIFICAÇÃO**

**CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS**

Cor	Castanho amarelado	Castanho amarelado (1)
Odor	Característico	Característico (1)
Densidade	1,012	0,900 – 1,150 (1)
PH	5,69	4,70 – 6,50 (1)
Teor propilenoglicol	40 %	39 % - 41 % (1)
Identificação	Corresponde	Farmacopéia Homeopática Alemã (2)

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA**

Contag. Bacteriana total 35°C/72 hs	< 500 UFC/g	Máx. 10 <sup>5</sup> UFC/g (2)
Contag. de bolores e leveduras	< 500 UFC/g	Máx. 10 <sup>4</sup> UFC/g (2)
Pesquisa de Pseudomonas aeruginosa	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de coliformes totais	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de coliformes fecais	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de Salmonella sp	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de Staphylococcus aureus	Ausência	Ausência (2)

\*Especificações: Schraiber(1)

German Homeopathic Pharmacopoeia(2)

Handbook of Cosmetic Microbiology/USP XXII(3)

**Informações complementares**

Método: Este produto é um extrato hidrossolúvel feito com 5 % de Arnica montana em solvente aproximado de 40 % de propilenoglicol.

**OBS:** Por ser um produto de origem vegetal, poderá haver uma leve precipitação, que não alterará sua qualidade. Caso esta precipitação venha a ocorrer; poderá ser eliminada por simples filtração ou decantação.

*Tsilia Schraibman*  
Dra. Tsilia Schraibman - CRF - SP 7.546  
Farm. Responsável

## **ANEXO B – Projeto de Pesquisa**

**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO –**  
**PPGAD**  
**NÚCLEO DE ELETROQUÍMICA E MATERIAIS POLIMÉRICOS – NEMP**  
**PROJETO DE PESQUISA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM NA VEICULAÇÃO DE**  
**EXTRATOS VEGETAIS ATRAVÉS DA ANÁLISE DA PERMEAÇÃO**  
***DA Arnica montana.***

Débora Giseli Urnau Cerutti

Orientador (a): Profa. Dra. Simone Stülp

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Périco

Lajeado, novembro de 2008.

**CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE E  
DESENVOLVIMENTO – PPGAD  
NÚCLEO DE ELETROQUÍMICA E MATERIAIS POLIMÉRICOS – NEMP  
PROJETO DE PESQUISA**

**ESTUDO DOS EFEITOS DO ULTRA-SOM NA VEICULAÇÃO DE  
EXTRATOS VEGETAIS ATRAVÉS DA ANÁLISE DA  
PERMEAÇÃO DA Arnica montana.**

Débora Giseli Urnau Cerutti

Projeto de pesquisa apresentado ao  
Comitê de Ética em Pesquisa do  
Centro Universitário Univates.

Orientador(a): Profa. Dra. Simone Stulp.  
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Périco.

Lajeado, novembro de 2008.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	7
1 TEMA.....	8
2 PROBLEMA.....	8
3 OBJETIVOS.....	8
3.1 Objetivo Geral.....	8
3.2 Objetivos Específicos.....	9
4 JUSTIFICATIVA.....	9
5 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	10
5.1 Ultra-som.....	10
5.2 <i>Arnica montana</i> .....	12
5.3 Semelhança entre a pele humana e a pele de suíno.....	13
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
6.1 Tipo de pesquisa.....	14
6.2 Utilização de animais.....	15
6.3 Planta .....	16
6.4 Procedimento experimental.....	17

6.4.1 Amostragem.....	17
6.4.2 Matéria prima.....	17
6.4.3 Equipamento.....	18
6.4.3.1 Ultra-som.....	18
6.4.3.2 Aferição do equipamento.....	20
6.5 Análise histopatológica.....	20
6.6 Equipamento de proteção individual (EPI's) .....	21
6.7 Considerações éticas e legais.....	21
6.8 Análise de dados.....	22
7 CRONOGRAMA .....	22
8 ORÇAMENTO.....	23
REFERÊNCIAS.....	25
ANEXOS.....	27

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ERA – Área Radiação Efetiva

IEC – Internacional Electrochínical Comission

US – Ultra-som

EPI's -Equipamentos de proteção individual

ACSURGS -Associação dos Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – equipamento de ultra-som terapêutico utilizado nos experimentos.....19

## RESUMO

O ultra-som terapêutico é um equipamento amplamente utilizado com o intuito de agilizar o processo de permeação cutânea de fármacos, através da técnica de fonoforese. Seu uso associado a extratos vegetais é bastante difundido na fisioterapia dermatofuncional. A *Arnica montana* é um extrato vegetal com potente ação antiinflamatória e seu uso nesta área da fisioterapia é amplamente difundido. No entanto, apesar de ser considerada inócua, por se tratar de uma planta medicinal, sabe-se que quando ingerida ou em contato com a circulação sanguínea é altamente tóxica, tornando-se necessário o seu uso tópico. Considerando-se os efeitos da *Arnica montana*, da técnica de fonoforese através do ultra-som e o desenvolvimento tecnológico de medicamentos de origem vegetal, o objetivo da presente pesquisa é investigar a permeação de um extrato glicólico de *Arnica montana* através da técnica de fonoforese, bem como a ação do Ultra-som terapêutico nos tecidos superficiais, através de exame histopatológico. Para este estudo, serão utilizados dois suínos machos Landrace com 40 dias e peso aproximado de 10 kg. Após tricotomia da região dorsal, um dos animais será submetido ao tratamento durante um dia e o outro em dias alternados, totalizando vinte dias. Serão 5 áreas tratadas em cada animal, com as seguintes aplicações: Gel + azul de metileno + ultra-som; Gel + azul de metileno + Extrato glicólico de *Arnica montana* + ultra-som; *Arnica montana*; gel + azul de metileno, sendo que uma 5ª área será destinada ao grupo controle, sem tratamento algum. Ao fim dos tratamentos os animais serão sacrificados e os fragmentos de pele retirados para análise histológica.

PALAVRAS-CHAVE: *Arnica Montana*. Fonoforese. Suínos.

## **1 TEMA**

Os efeitos do ultra-som na veiculação de extratos vegetais através da análise da permeação da *Arnica montana*.

## **2 PROBLEMA**

Considerando-se o fato de que a Fisioterapia necessita de estudos experimentais que comprovem a utilização de métodos e técnicas, como o ultra-som (US), além de evidências clínicas e, também, a crescente utilização de extratos vegetais veiculados através do uso do US, pergunta-se: Qual a profundidade de penetração do extrato glicólico de *Arnica montana* quando veiculado através de Ultra-som e quais os efeitos desta terapia sobre os tecidos superficiais de suínos?

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Analisar o efeito da fonoforese na veiculação de *Arnica montana* na pele e adipócitos, através da análise histopatológica de tecidos biológicos de suínos.

### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a profundidade de penetração do extrato glicólico de *Arnica montana*, quando submetido à fonoforese;
- Avaliar as condições do adipócito após 20 dias de tratamento com fonoforese, utilizando-se o extrato glicólico de *Arnica Montana*;
- Avaliar a importância da utilização do ultra-som terapêutico, em relação à permeação cutânea.

## 4 JUSTIFICATIVA

Segundo Veiga Junior e Pinto (2005) a utilização de plantas com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade sendo que várias plantas vêm ganhando também, a aceitação por parte dos profissionais da área cosmética e dos consumidores. O uso de extratos vegetais em produtos cosméticos tem sido cada vez mais motivado pelos pesquisadores e formuladores da área.

A presença de promotores de permeação, atuando por mecanismos diversos, pode proporcionar variações no fluxo de uma substância através da pele, mediante modificações na estrutura das membranas celulares, alterações dos coeficientes de difusão e dos coeficientes de partilha estrato córneo-veículo, influenciando no conteúdo hídrico ou ainda por diminuição das tensões de interface (Chorilli et al, 2004).

O transporte de substâncias mediado por US, é tido como um método eficiente de administração localizada de drogas, sendo que fonoforese é o termo que descreve a capacidade do US de promover a penetração de substâncias através da pele, uma vez que é capaz de alterar os potenciais de membrana (Low, Reed, 2001).

Considerando-se o fato de que a Fisioterapia, especialmente na área de Dermato-Funcional, utiliza de métodos e técnicas muitas vezes baseados apenas

em evidências clínicas, justifica-se a importância desta pesquisa, na medida em que visa analisar o efeito de otimização da penetração de uma substância com ação antiinflamatória cientificamente comprovada, além de acompanhar os possíveis efeitos deste tratamento continuado, reproduzindo o número de sessões usualmente utilizado na prática, ou seja, 10 aplicações em dias alternados.

Sendo assim, a realização desta pesquisa permitirá, a partir da divulgação dos dados obtidos, que os profissionais que atuam na área possam ser beneficiados com o conhecimento acerca dos reais efeitos da terapia sobre os tecidos, proporcionando uma análise crítica sobre esta forma de tratamento.

## **5 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **5.1 Ultra-som**

O ultra-som (US) é uma modalidade terapêutica amplamente utilizada na prática da fisioterapia. As ondas ultra-sônicas são geradas por transdutores que convertem energia elétrica em energia mecânica e vice-versa, graças a materiais piezo elétricos, que geram efeitos de mesmo nome, os efeitos piezo elétricos (Kitchen, 2003).

O equipamento terapêutico se caracteriza por apresentar uma frequência de 1 a 3 MHz, intensidade entre 0,01 a 3,0 W/cm<sup>2</sup>, nos modos contínuo e pulsado. A intensidade da radiação é um fator essencial para o sucesso da terapia, bem como seu tempo de aplicação. A quantidade de energia total depositada sobre um tecido biológico depende dos seguintes parâmetros: potência acústica, tempo, frequência e área de radiação efetiva do transdutor (ERA). A ERA compreende todos os pontos nos quais a intensidade ultra-sônica é igual ou superior a 5% da intensidade ultra-sônica máxima espacial, expressada em centímetros quadrados, sendo que existem dois padrões que especificam métodos para sua medida que são o Food and Drug Administration- FDA que aplica-se aos equipamentos usados nos Estados Unidos e o INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION, relevante para todos os aparelhos do mundo. Porém, no Brasil, não existem laboratórios que prestem serviços com regularidade para a medição da ERA, e dessa forma, são as próprias

indústrias fabricantes que quantificam a ERA de seus equipamentos (Guirro, Santos, 1997).

O US produz dois efeitos fundamentais ou primários no organismo: efeito mecânico e efeito térmico, que prevalecerão de acordo com o regime de pulso aplicado, contínuo ou pulsado bem como da energia depositada. No US contínuo a emissão do feixe ultra-sônico se dá de forma contínua, sendo que no US pulsado, a emissão é interrompida de forma periódica, intercalando pausas. Portanto, na modalidade pulsada poderão obter-se efeitos térmicos mínimos, estabelecendo-se uma modulação de conjunto de pulsos. Já na modalidade contínua, doses baixas podem praticamente não elevar a temperatura dos tecidos. Nesse sentido, só ocorrerá diferença de temperatura entre os dois regimes de pulso caso a energia depositada no modo contínuo seja maior (Agne, 2004; Guirro & Guirro, 2002).

Isso posto, as ondas ultrassônicas que atingirão uma determinada região dependerão de uma série de fatores a serem considerados, tais como: intensidade, frequência, regime de pulso, área do transdutor, tempo de aplicação, técnica de aplicação e agente de acoplamento.

O ultra-som terapêutico tem sido aplicado a uma grande variedade de condições traumáticas e inflamatórias agudas e subagudas, reumatóides e artríticas crônicas, tecido fibroso cicatricial excessivo e para o alívio da dor (Low, Reed, 2001).

Devido à dificuldade de penetração de drogas pela pele, agentes químicos e físicos vêm sendo pesquisados para que se torne mais fácil a permeação de agente farmacológicos (Campos, 2004), para tanto sugere-se o uso do ultra-som (Mitragotri, 1995), pois a ação de uma força física acentua a permeabilidade da pele (Ueda et al, 1996), assim como os efeitos térmicos podem alterar estruturas químicas da pele (Hippius et al, 1998).

Chorilli et al (2004) afirma que a presença de promotores de permeação, atuando por mecanismos diversos, pode proporcionar variações no fluxo de uma substância através da pele, mediante modificações na estrutura das membranas celulares, alterações dos coeficientes de difusão e dos coeficientes de partilha estrato córneo-veículo, influenciando no conteúdo hídrico ou ainda por diminuição das tensões de interface. Tais promotores, todavia, devem apresentar-se inócuos,

não interferindo nos princípios ativos nem modificando as características físicas e sensoriais próprias de cada produto, devendo também apresentar efeito imediato e reversível.

Atualmente, o transporte de substâncias mediado por US, é tido como um método eficiente de administração localizada de drogas. Fonoforese é o termo que descreve a capacidade do US de promover a penetração de substâncias através da pele, uma vez que é capaz de alterar os potenciais de membrana.

A fonoforese é, portanto, a utilização de um campo de energia ultra-sônica, com frequência entre 20 kHz a 3 MHz, para a facilitação da penetração cutânea, sendo que o aumento da permeação se dá através da desestruturação da barreira lipídica da camada mais externa da pele. A aplicação da técnica se dá através da utilização de um gel ou creme medicamentoso como meio de acoplamento entre o cabeçote do ultra-som e a área a ser tratada (Low, Reed, 2001).

Rosim et al apud Fusaro (2006), define fonoforese como penetração de medicamento pela pele normal através de irradiação de ultra-som. Relata que várias aplicações clínicas de fonoforese são executadas diariamente devido aos efeitos benéficos do US na aplicação tópica de medicamentos. Segundo Rosado & Rodrigues (2003), a veiculação de drogas transdérmicas tem sido um importante meio de administração, mas ainda está limitado pelo pequeno número de drogas com um perfil satisfatório.

## **5.2 *Arnica montana***

A *Arnica montana*, popularmente conhecida como Arnica, é uma planta herbácea da família das compostas, nativa das regiões montanhosas da Europa. O primeiro registro escrito sobre os poderes curativos desta planta apareceu na Alemanha do século XII, com Santa Goettingen, preconizando seu emprego em ferimentos. No início do século XVIII a Arnica estava consagrada pela medicina oficial e era largamente empregada em toda a Europa (Teske, Trentini, 1997).

É frequentemente empregada por via tópica no tratamento de ferimentos, escoriações, traumatismos e contusões, pela aplicação sobre a área afetada com auxílio de algodões ou compressas embebidas em tinturas ou maceração em álcool de suas folhas e rizomas (Harry, Matos, 2002). Na homeopatia é utilizada em qualquer tipo de manifestação traumática, tanto físicas (hematomas ou equimoses causadas por traumatismos e torções ou por esforço muscular excessivo), quanto mentais (causadas por estresse, fadiga ou acontecimentos marcantes). Apresenta-se também como um excelente remédio para o coração e a circulação (Vannier, Poirier, 1987; Voisin, 1984; Tetau, 1979).

É importante ressaltar que, apesar de plantas medicinais e fitoterápicos, serem freqüentemente consideradas como inócuas, Oliveira & Gonçalves (2006), realizaram uma extensa revisão bibliográfica e, selecionaram aquelas que, a partir de relatos da literatura, apresentassem potencial de toxicidade, dentre elas a *Arnica montana* estava presente.

A Arnica deve ter seu uso oral evitado devido à toxicidade das lactonas sesquiterpênicas. Os riscos da planta ao ser utilizada na forma oral incluem a possível ocorrência de náuseas e irritação gástrica e, com doses muito elevadas, dispnéia. A helenalina diminui a reabsorção de cálcio, provavelmente por ação estabilizadora de membrana, o que é responsável pelos efeitos tóxicos. Externamente pode provocar dermatite edematosa, com formação de vesículas e sensibilização (Teske, Trentini, 1997; Bisset, 1994; Voisin, 1984).

### **5.3 Semelhança entre a pele humana e a pele de suínos**

A pele é um órgão que protege o organismo da entrada de substâncias nocivas ao organismo, ela evita a evaporação excessiva de água, possui a função de barreira (Chorrili et al, 2005).

A transmissão transdérmica oferece uma forma viável de permeação de fármacos, quando a droga não pode ser utilizada via oral ou injetável, no entanto a pele possui uma barreira eficaz que não permite a permeação fácil de drogas. Essa

propriedade de barreira da pele é atribuída à camada córnea que é formada pela bicamada lipídica que aumenta a resistência a transportes de íons e corneócitos (Campos, 2004).

Para Polacow (2007) o efeito do uso de substâncias e recursos físicos na pele podem ser observados através de um estudo histopatológico, que permite a análise do tecido epitelial, derme e de características celulares. Para a realização de estudos de permeação cutânea, geralmente são utilizados suínos, pela semelhança da pele com a humana, este são utilizados tanto em testes *in vitro* como *in vivo*.

A Ação fisiológica das catecolaminas, adrenalina e noradrenalina é realizada pelos adrenoceptores, e destes pode-se encontrar ao menos 5 subtipos coexistindo nos adipócitos –  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 1B$  e  $\alpha 2$  (Lafontan et al., 1997; McNeel e Merssmann, 1999; Ding et al., 2000). A concentração dos adrenoceptores é variável conforme a espécie animal, sendo que os suínos possuem 70 a 80% de adrenoceptores  $\beta 1$ , 20% de adrenoceptores  $\beta 2$  e menos que 10% de adrenoceptores  $\beta 3$  (Ding et al., 2000). Pela similaridade na resposta de agonistas e antagonistas beta-adrenérgicos em humanos, evidências demonstram que a proporção de adrenoceptores  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  seja próxima aos suínos (McNeel e Mersmann, 1999).

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de uma pesquisa com abordagem qualitativa, do tipo experimental, que busca analisar o efeito da fonoforese, com a utilização de *Arnica montana*, no sistema tegumentar e adipócitos, através da análise histopatológica de tecidos biológicos de suínos.

De acordo com Haddad (2004), o estudo experimental se caracteriza pelo fato do pesquisador, determinar exposição ou não e, num segundo momento, verificar a ocorrência ou não do efeito dessa exposição.

Brevidelli e Domenico (2006), explicam que a partir do momento em que existe a intenção de buscar significados e interpretá-los a partir de um contexto próprio, natural, delinea-se a abordagem qualitativa do estudo. Também foi realizada uma pesquisa bibliográfica com o objetivo de conhecer outras referências publicadas sobre o assunto em questão.

## **6.2 Utilização de Animais**

Serão utilizados dois suínos machos Landrace com 40 dias e peso aproximado de 10 kg. Os animais serão adquiridos na Granja Balduíno, município de Cruzeiro do Sul, no estado do RS, por indicação da Associação dos Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSURGS), com sede em Estrela/RS.

Os procedimentos serão acompanhados pelos médicos veterinários Gilberto Silva e Paulo César Madeira, que realizarão o sacrifício e extração dos fragmentos dos animais, bem como a fixação dos mesmos com solução de formol, para ser enviado ao Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, em Porto Alegre.

O animal que receberá o tratamento por apenas um dia, com o intuito de verificar o efeito imediato do ultra-som, através da técnica de fonoforese na veiculação da *Arnica montana*, será tratado e sacrificado no local onde serão adquiridos.

O animal que receberá o tratamento de 20 dias será deslocado para uma chácara, na cidade de Arroio do Meio, de propriedade do senhor Theno Bohrer, para facilitar a realização dos experimentos. O transporte será realizado conforme indicações do criador dos suínos, e acompanhado por um veterinário, para que o mesmo não sofra, ou se machuque. Ou seja, ao serem carregados ou descarregados, para um meio de transporte, os animais não devem ser suspensos por quaisquer meios mecânicos, nem levantados ou arrastados pela cabeça, patas ou cauda. Nesta chácara será disponibilizado um ambiente adequado a estadia do suíno, que ficará em um espaço reservado, mas próximo a outro suíno de criação

própria da família. O espaço permitirá que o animal se levante, deite e descanse sem dificuldade; tenha um local limpo, confortável e adequadamente seco onde possa descansar; veja outros animais e mantenha uma temperatura confortável.

Assim sendo, os animais serão mantidos em local seguro, com abrigo, com água *ad libitum* e alimentação balanceada, provida de ração adequada para a faixa etária que se encontram, produzida e fornecida pelo criador/fornecedor. A ração será disponibilizada duas vezes ao dia, conforme sugestão do veterinário.

Após a realização dos tratamentos, os suínos serão anestesiados com o anestésico Zoletil®, aplicado endovenosamente na Veia Auricular. A dose utilizada será de 1,5 ml, suficiente para anestésiar o animal e aprofundar o processo anestésico, indo direto do estado de analgesia e anestesia para o da depressão respiratória, sobrevivendo a morte dos animais referidos, totalmente sem sofrimento.

### **6.3 Planta**

As amostras utilizadas para a análise foram obtidas a partir de extrato glicólico de *Arnica montana*, produzido pelo Laboratório Schreibmann Ltda®, lote 4652, fabricado em 10/2005, com validade de 5 anos.

Vale ressaltar, que na aquisição do produto foi solicitada a entrega do laudo técnico do extrato (Anexo A), pois conforme Maciel et al (2006), os extratos são instáveis ao longo do tempo, podendo ocorrer degradação de substâncias, e, portanto, torna-se necessário a comprovação dos prazos de validade pela empresa fabricante.

Além disso, de igual relevância deve ser considerada a data de fabricação dos extratos, pois segundo Gobbo-Neto e Lopes (2005), a época em que uma droga é coletada pode interferir diretamente em seus constituintes ativos, e, dessa forma, podem ocorrer variações sazonais de praticamente todas as classes de metabólitos secundários.

Para a realização do experimento será utilizada uma solução do extrato glicólico de *Arnica montana* na concentração de 100mL/L. Esta mesma concentração de solução será também incorporada ao gel para a aplicação do ultra-som.

## **6.4 Procedimento experimental**

### **6.4.1 Amostragem**

Para a realização do experimento serão utilizados dois suínos, sendo que um receberá apenas 1 sessão de tratamento e o outro dez sessões, em dias alternados totalizando vinte dias de tratamento. Será realizada tricotomia da região dorsal, onde será aplicado o ultra-som terapêutico. Os animais serão submetidos aos seguintes tratamentos:

- gel + azul de metileno + ultra-som
- gel + azul de metileno + Extrato glicólico de *Arnica montana* + ultra-som
- *Arnica montana*
- gel + azul de metileno
- área destinada ao controle, sem nenhuma aplicação no local.

### **6.4.2 Matéria-prima**

- Extrato glicólico de *Arnica montana*
- Água destilada e deionizada
- Agar-agar
- Formol
- Azul de metileno

- medicamento Anestésico (Zoletil 1,5 mg)

### **6.4.3 Equipamento**

#### **6.4.3.1 Ultra-som Terapêutico**

O equipamento utilizado para as análises será fornecido pela empresa DGM eletrônica Ltda., sendo que as características técnicas fornecidas pelo manual de instrução do equipamento são:

- Alimentação: 110V/ 220V ~ 60 Hertz
- Consumo máximo: 50 V. A
- Modo de operação: contínuo
- Classificação: classe I - tipo BF
- Fusível externo: 1A/110V / 0,5A/220V, tipo 20AG
- Fusível interno: 1A/110V ~ tipo 20AG
- Temporizador: de 01 a 30 minutos
- Frequência de ultra-som: 3 MHz
- Modo de emissão do ultra-som:
  - Contínuo
  - Pulsado a 100 Hz com ciclos de duração do pulso de:
    - 50% - 5,0 ms on / 5,0 ms off (1/2)
    - 20% - 2,0 ms on / 8,0 ms off (1/5)
    - 10% - 1,0 ms on / 9,0 ms off (1/10)
    - 5% - 0,5 ms on / 9,5 ms off (1/20)

- Pulsado a 48 Hz com ciclos de duração do pulso de:  
50% - 10,4 ms on / 10,4 ms off (1/2)  
20% - 4,1 ms on / 16,7 ms off (1/5)
  - Pulsado a 16 Hz com ciclos de duração do pulso de:  
50% - 31,25 ms on / 31,25 ms off (1/2)  
20% - 12,5 ms on / 50,0 ms off (1/5)
- Intensidade de potência: 0,1 a 2,0 W/cm<sup>2</sup>
  - ERA (Effective Radiaton Area): 3,5 cm<sup>2</sup>
  - Dimensões: 440mm X 270mm X 125mm (LxPxA)
  - Peso: (aprox. s/ transdutor) 4,0 kg.



Figura 1 - Equipamento de ultra-som terapêutico utilizado nos experimentos

Serão adotados os seguintes parâmetros de terapia por ultra-som: Cabeçote com frequência de 3MHz, modo contínuo, dose de 1,0 W/c, durante o tempo de 6

min, em retângulos previamente marcados na pele do animal de 3,5cm X 5cm (17,5 cm<sup>2</sup>). O tempo foi calculado dividindo-se a área a ser tratada pela ERA (área de radiação efetiva) do cabeçote (Borges, 2006).

#### **6.4.3.2 Aferição do equipamento**

Foi solicitada a indústria fabricante do equipamento aferição e calibração do equipamento de ultra-som terapêutico, prévia aos ensaios experimentais, de forma que a potência de saída no transdutor seja compatível com o valor indicado no painel do equipamento, visando resultados de maior confiabilidade.

De acordo com Guirro e Santos (1997), mais de 50 % dos equipamentos em uso, nas clínicas e departamentos de fisioterapia, estão fora das especificações postuladas pela Internacional Eletrotechnical Commission (IEC), o que pode comprometer a segurança e eficiência da terapia ultrassônica.

#### **6.5 Análise histopatológica**

Para a possível visualização na análise histopatológica, será acrescentado ao agente de acoplamento o corante químico azul de metileno, na concentração de 0,004g/L. Esta não é uma substância tóxica, sendo amplamente utilizada em casos como este que é necessário visualizar a penetração ou perfusão de uma substância em tecidos.

Ao término das aplicações, tanto de um dia quanto de vinte dias, os tratamentos serão acompanhados por um veterinário que realizará o sacrifício dos suínos através de aprofundamento do anestésico (Zoletil 1,5 mg), a fim de evitar qualquer tipo de sofrimento do referido animal.

Após o sacrifício, 5 fragmentos de pele (2cm X 2cm), previamente demarcados serão retirados e mergulhados em formol tamponado a 10%, fornecido pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, em Porto Alegre que realizará as análises. Os fragmentos permanecerão no formol por um

período de aproximadamente 7 dias, para haver a fixação do material e após será realizada a análise histológica e emitidos os respectivos laudos.

Ao finalizar as extrações dos fragmentos os animais serão enterrados nas respectivas propriedades, em cova suficientemente profunda (em torno de 0,50 metros da superfície do terreno), em local livre do acesso de cães e/ou outros predadores carnívoros. Antes da cobertura, serão completados com terra os espaços vazios em torno do cadáver e, então, será colocada em toda a extensão da cova uma camada de 10 cm de cal viva, que deverá, finalmente, ser coberta com uma camada de terra bem socada. Este procedimento será de responsabilidade do veterinário que executará o sacrifício dos animais.

#### **6.6 Equipamentos de proteção individual (EPI's):**

Os pesquisadores e profissionais envolvidos no experimento farão uso de EPI's durante a realização dos procedimentos, tais como: toucas, luvas, máscaras, macacões e botas.

#### **6.7 Considerações éticas e legais**

Esta pesquisa será realizada mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Univates, garantindo que a utilização dos animais para a pesquisa tenha fins científicos que justifiquem o método, além de garantir a ausência de sofrimento dos animais através do manejo, transporte, condição de vida e nutrição adequada, procedência e qualidade do modelo animal, condições adequadas de alojamento durante o experimento, procedimento seguro e adequado, analgesia e anestesia apropriada para a espécie, método de eutanásia adequado e disponibilidade de cuidados veterinários. Além disso, garante a biossegurança dos pesquisadores e demais profissionais envolvidos no estudo.

A identificação dos criadores que fornecerão os animais será preservada,

sendo, portanto, retirada deste projeto, após a sua aprovação.

### 6.8 Análise dos dados

Após a realização da pesquisa, os dados serão analisados, discutidos e apresentados sob forma de dissertação, conforme cronograma preconizado pelo programa de pós-graduação em Ambiente e Desenvolvimento do Centro Universitário Univates.

Os dados da pesquisa poderão ser divulgados, sob forma de artigo científico e publicados em revista do meio.

## 7 CRONOGRAMA

<b>Meses</b>	<b>Dezembro</b>	<b>Janeiro</b>	<b>Fevereiro</b>
Aquisição de materiais	X	X	
Aplicação de US	X		
Análise histopatológica das amostras	X		X
Interpretação dos resultados		X	X
Divulgação dos resultados			X

## 8 ORÇAMENTO

### ANIMAIS

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Suínos da raça Landrace	02	140,00
Ração	5 Kg	50,00

### MATERIAL PERMANENTE

#### 1. Análises:

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Ultra-som terapêutico	01	2.500,00
Análise histopatológica	02	80,00

### MATERIAL DE CONSUMO

#### 1. Substâncias químicas:

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Gel de carbopol	2 Kg	20,00
Corante (Azul de metileno)	100 g	50,00
Extrato glicólico de Arnica	5 L	170,00
Formol	1L	10,63
Zoletil	1,5 mg	120,00

## 2. Vidraria e aparelhagens gerais

<b>Descrição</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor (R\$)</b>
Balões volumétricos 100 mL		
Bastão de vidro		
Beckers 100 mL		
Pipetas graduadas 10 mL		300,00
Frasco lavador		
Pinça		
Beckers 200 mL		
	<b>Subtotal</b>	<b>3.440,63</b>

Fonte: pesquisadora/UNIVATES

## REFERÊNCIAS

- AGNE, Jones E. **Eletrotermoterapia: Teoria e Prática**. 2. ed. Santa Maria: Orium, 2004.
- BISSET, Norman Grainger (ed). **Max Wichtl Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis**. Stuttgart: Medpharm, 1994.
- CAMPOS, Maria Silvia Mariani Pires de. Influência do ultra-som na permeação da cafeína: Estudo em fragmentos de pele e em adipócitos isolados de suíno. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2004.
- CHORILLI, M, et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. **Infarma**, v.16, s.n., p.73-77, 2004.
- CHORILLI, Marlus et al. Avaliação Histológica da Hipoderme de Suínos Submetida a Tratamento Mesoterápico com Tiratricol, Cafeína e Hialuronidase . **Acta Farm. Bonaerense** 24 (1): 14-8 (2005) .
- FUSARO, Cláudio . **Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários sadios**. Campinas, SP : [s.n.], 2006. Biblioteca digital da UNICAMP.
- GUIRRO, Elaine Caldeira de O.; GUIRRO, Rinaldo Roberto de J. **Fisioterapia Dermato-funcional: Fundamentos, Recursos e Patologias**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2002.
- GUIRRO, Rinaldo; SANTOS, Sandra C. Britschcy dos. Evaluation os acoustic intensity of new ultrasound therapy equipment. **Elsevier Science**, v.39, s.n, p. 553-557, 2002.
- HARRI, Lorenzi; MATOS, Francisco José de Abreu. **Plantas medicinais: Nativas e exóticas Cultivadas**. Brasil, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.
- HIPPIUS, M.; SMOLENSKI, U.; UHLEMANN, C.; SCHREIBER, U.; HOFFMANN A. Investigations of drug release and penetration- enhancing effect of ultra-sound on transmembrane transport of fluofenamic acid. **Exp Toxicol Pathol** 50 (4-6) (1998) 450- 452.
- KITCHEN, Sheila. **Eletroterapia: prática baseada em evidências**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2003.
- LAFONTAN, M.; BARBE, J.; GALIZKY, J. et al.; Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *Human Reproduction*. 12 Suppl 1:6-20, 1997
- LOW, John; REED, Ann. **Eletroterapia explicada: princípios e práticas**. São Paulo: Manole, 2001.

MITRAGOTRI, S.; EDWARDS, D.A.; BLANKSCHTEIN, D.; LANGER, R.. A mechanistic study of ultrasonically enhanced transdermal delivery. **J Pharm Sci** 84 (6) (1995) 697-706

OLIVEIRA, Franciêda Q.; GONÇALVES, Licínio A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n.2, p. 36-41, 2006.

POLACOW, Maria Luiza Ozores et al. Desenvolvimento e estudo reológico de formulação contendo DMAE (Dimetilaminoetanol). Estudo experimental de seu efeito na pele, associado com eletroestimulação neuromuscular. **5ª MOSTRA ACADÊMICA DE PESQUISA UNIMEP** . 23 A 25 de outubro 2007.

ROSADO, Catarina; RODRIGUES, Luis Monteiro. Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy. **BioMedic Central**, v.3, sn, 2003.

TESKE, Magrid; TRENTINI, Anny Margaly M. **Compêndio de Fitoterapia – Herbarium**. 3.ed. Curitiba: Herbarium, 1997.

TETAU, Max. **Matière Médicale Homéopathique Clinique et Associations Biothérapeutiques**. Paris: Maloine, 1979.

UEDA, H. et al.; Difference in the enhancing effects of ultrasound on the skin permeation of polar and non-polar drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, 44(10): 1973-7, 1996.

VANNIER, Léon; POIRIER, Jean. **Tratado de Matéria Médica Homeopática**. 9.ed. São Paulo: Andrei, 1987.

VOISIN, H. **Manual de Materia Médica para o Clínico Homeopata**. 2.ed. São Paulo: Andrei, 1984.

**ANEXO**

## **ANEXO A – Laudo Técnico do Extrato**



Laboratório Schraibmann Ltda. - ms - 1.04.320-1

Rua Maria Catur. 208 - Vila Cretti - Carapicuíba - SP - CEP 06317-290

Fone / Fax: 0800 124522 - Site: www.schraiber.com.br - E-mail: qualidade@schraiber.com.br

Produto: **EXTRATO GLICÓLICO DE ARNICA**

**LOTE 4652**

Fabr.: 10/2005

Validade: 5 anos

**RESULTADOS DA ANÁLISE**

<u>ANÁLISE</u>	<u>RESULTADO</u>	<u>*ESPECIFICAÇÃO</u>
<i>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS</i>		
Cor	Castanho amarelado	Castanho amarelado (1)
Odor	Característico	Característico (1)
Densidade	1,012	0,900 – 1,150 (1)
PH	5,69	4,70 – 6,50 (1)
Teor propilenoglicol	40 %	39 % - 41 % (1)
Identificação	Corresponde	Farmacopéia Homeopática Alemã (2)
<u>ANÁLISE MICROBIOLÓGICA</u>		
Contag. Bacteriana total 35°C/72 hs	< 500 UFC/g	Máx. 10 <sup>5</sup> UFC/g (2)
Contag. de bolores e leveduras	< 500 UFC/g	Máx. 10 <sup>4</sup> UFC/g (2)
Pesquisa de Pseudomonas aeruginosa	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de coliformes totais	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de coliformes fecais	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de Salmonella sp	Ausência	Ausência (2)
Pesquisa de Staphylococcus aureus	Ausência	Ausência (2)
*Especificações: Schraiber(1) German Homeopathic Pharmacopoeia(2) Handbook of Cosmetic Microbiology/USP XXII(3)		

Informações complementares

Método: Este produto é um extrato hidrossolúvel feito com 5 % de Arnica montana em solvente aproximado de 40 % de propilenoglicol.

**OBS:** Por ser um produto de origem vegetal, poderá haver uma leve precipitação, que não alterará sua qualidade. Caso esta precipitação venha a ocorrer; poderá ser eliminada por simples filtração ou decantação.

Dra. Tsilia Schraibman - CRF - SP 7.546  
Farm. Responsável

**ANEXO C – Study of the Effects of Ultrasound in Phytotherapics Propagation through  
*Arnica Montana* degradation analysis**

# Study of the Effects of Ultrasound in Phytotherapies Propagation through *Arnica montana* degradation analysis

SANDRO MARMITT, PAULA BIANCHETI, EDUARDO PÉRICO, SIMONE STÜLP AND DÉBORA G. U. CERUTTI.

Núcleo de Eletroquímica e Materiais Poliméricos – NEMP,  
Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento (PPGAD)

Univates,  
Avelino Tallini, 171, Lajeado/RS,  
BRAZIL.

<http://www.univates.br/ppgad>  
[deborag@univates.br](mailto:deborag@univates.br)

**Abstract:** - *Arnica montana* is a phytotherapeutic commonly used for a medicinal purpose due to its anti-inflammatory effects. The ultrasound equipment is used the same way in Physiotherapy to control inflammatory signs like pain and edema, besides propagating substances through the skin, by phonophoresis, due to its capacity of altering the cell membrane permeability, this way providing substance absorption increasing. Considering the *Arnica montana* effects, from phonophoresis technique through the ultrasound and the medicines technological development of vegetal origin, this study's general aim is to investigate *Arnica montana* degradation when undergone to the therapeutic ultrasound use through phonophoresis using Chronoamperometry and cyclic and cyclic voltammetry techniques. Samples of *Arnica montana* glycolic extract in a glycolic extract in a 100 mL/L dilution were used. The ultrasound was put into practice at pulsate and continuous mode (at a 100 Hz with 20% pulse duration cycles) at a 1.0 W/cm<sup>2</sup> intensity and in times of 0, 5, 15 and 25 minutes. The cyclic voltammetry and chronoamperometry were performed before and after the *Arnica montana* samples exposure to ultrasound, thus forming analytic curves compared to the ones obtained in the absence of radiation. As a result it was concluded that the ultrasound physical and chemistry's action provides electrochemistry alteration of studied substrate (*Arnica montana*) involving solvent (water) and extract as well. Furthermore, the findings show the possibility of *Arnica montana*'s possibility of degradation detection through cyclic voltammetry and/or chronoamperometry techniques.

**Key - Words:** - ultrasound, phonophoresis, *Arnica montana*, cyclic voltammetry, chronoamperometry.

## 1 Introduction

The utilization of plants for medicinal use is one of the most ancient forms of mankind's medicinal practice, and in Brazil these native flora plants lack studies to verify its pharmacologic proprieties/qualities, considering its use is strongly linked to the popular use and propagated by traders [1].

Several plants are also being accepted by professionals in the cosmetic area and consumers. The use of vegetable extracts in cosmetic products has been more and more motivated by researchers and designers of the area [2].

*Arnica montana*, popularly known as arnica, is an herbaceous plant from the the compounds' family, native to the mountainous

regions of Europe. The first written record about this plant's healing power began in Germany in the 21st century, with saint Goettingen, commending its use on wounds. In early XVIII century, arnica was consecrated by official medicine and was largely used all throughout Europe [3].

Phytochemical studies of its composition record the presence of lactones sesquiterpenes (helenalin and dihidrohelenalin), fatty acids (acetate, isobutyric, 2-metilbutyric, methacrylic), flavonoids (isoquercetin, luteolin-7-glucoside, astragalin), fixed oils (oleic acid, lauric acid, palmitic acid), various acids ( formic, caffeic, angelic, malic), triterpenes (arnidol, pradiol, arnisterin), cinnamic acids derivatives (chlorogenic acid), essential oils, xantofiloposideos, carotenoids, waxes, polyacetylene, resins, tannins, coumarins,

inulin, arnicin, phytosterin and the arnican alkaloid [3,4,5].

Ultrasound is a therapeutic modality largely used in the practice of physiotherapy. The ultrasonic waves are generated by transducers that convert electrical Energy into mechanical energy and vice-versa, thanks to piezoelectric materials, which generate effects of the same name [6].

The therapeutic equipment is characterized by having a 1 to 3 MHz frequency, intensity between 0.01 to 3.0 W/cm<sup>2</sup> in continuous and pulsed modes. The radiation intensity is an essential factor for the success of the therapy as well as its application time [7]. The total amount of energy deposited on a biological tissue depends on the following parameters: sound power, time, frequency and effective radiation area of the transducer (ERA). The ERA comprises all the points in which the ultrasonic intensity is the same or superior to 5 % of the spacial maxim ultrasonic intensity expressed in square centimeters, once that there are two patterns that specify methods for its measure which are the Food and drug Administration – FDA that is applied to the equipments used in the United States and the INTERNATIONAL ELECTROTECHNICAL COMMISSION, relevant for all the appliances of the world [8, 9].

At present, the transportation of substances mediated by ultrasound is considered an efficient method of located administration of drugs. Phonophoresis is the term that describes the capacity of the ultrasound of promoting the penetration of substances through the skin, since it is able to alter the membrane potentials [10].

The propagation of transdermic drugs has been an important means of administration but it is still limited by the small number of drugs with a satisfying profile [11].

Arranged that, it is made necessary to check the effect of the phonophoresis technique on the structure of compounds phytotheraphics, in such a way that the presence of the carrier (ultrasound) does not interfere in the properties of the substance (*Arnica montana*).

The electroanalytical techniques reveal quite promising, making possible the attainment of well

defined peaks, that allow to foresee the antioxidant capacity of vegetable raw materials, as well as the detection of organic species [12, 13, 14].

Therefore, considering the optimization possibility of the effect of the therapy by ultrasound, through phonophoresis, associated to the effect of *Arnica montana*, and also the scarcity of considerable studies in the area, it justifies the accomplishment of this research, thus using detection techniques, such as the chronoamperometry [15] and the cyclic voltammetry [16], with the intention to evaluate the potential of degradation of the extract, submitted to the radiation of ultrasound, modulated in different types of pulse and times, through the construction of analytical curves, comparatively analyzed before and after the exposition of extracts to the radiations.

## 2. Experimental

### 2.1 Samples

The samples used for analysis had been gotten from the *Arnica montana* glycolic extract on, produced by the Laboratory Schreiber Ltd, lot 4652, manufactured in 10/2005, shelf life of 5 years, by means of the technical report of experts of the extract. The samples had been prepared from dilutions in deionized water of 100mL/L. In Fig. 1 and Fig. 2 the basic structure of active principles can be verified in the chemical composition of *Arnica montana* (helenalin and isoquercetin).

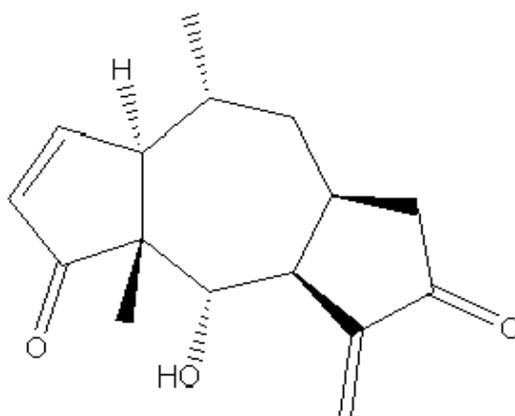


Fig. 1- Helenalin structural formula

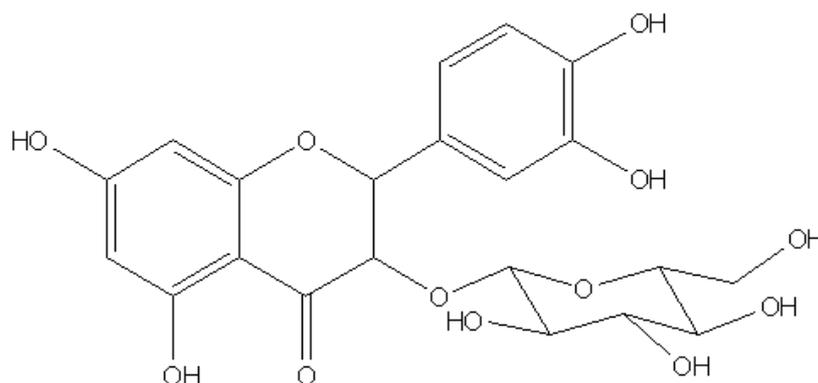


Fig. 2 – Isoquercetin structural formula

## 2.2 Ultrasound

The equipment used for the analyses was supplied by DGM electronic Ltd Company, checked and calibrated. The next parameters of ultrasound therapy were adopted: continuous mode and pulsated mode at 100 Hz with cycles of duration of 20% pulse, on times of: 0, 5, 10 and 15 minutes, 1.0 W/cm<sup>2</sup> intensity, through the sub aquatic application technique. Each one of the proceedings was carried out in triplicate [17]. The readings for the

instrumental analysis, were carried out in determined times of application of the ultrasound, "in situ" (during the treatment), "ex situ immediately" (immediately after the treatment) and "ex situ after a time of rest of an hour" after the treatment.

## 2.3 Instrumental analysis

For the analyses of the degradation of *Arnica montana* extracts, it was used a potentiostat, having

the experiments being carried out before and after the exposure of the extracts to the therapy by ultrasound, being built voltammetric curves from the obtained results.

The potentiostat used was Microquimica, model MQPG-01, interfaced via plate with the computer. After optimization of the ultrasound application conditions at voltammetric measures, analytic curves were built and compared to the curves obtained in the absence of radiation. The electrochemical cell used was a conventional cell of a compartment, being the work electrode a platinum thread, the counter-electrode a platinum thread and as a reference electrode; the Ag/AgCl was used.

The electrochemical window used was one from  $-1800$  mV to  $+1800$  mV, with  $50$  mV/s scan rate. The results were analyzed comparatively.

After the cyclic voltammetry tests, some constant potential application of chronoamperometric tests were carried out, on  $0.39$  V and  $0.5$  V potentials in *Arnica montana* glycolic extract in dilution of  $100$  mL/L, in the application modes of therapy for continuous and pulsated ultrasound at  $100$  Hz and  $20\%$  pulse cycles of duration in the times of  $0$ ,  $5$ ,  $15$  and  $25$  minutes. The experiment was carried out with the help of a tension source CIDEPE EQ030 and a digital Multimeter Metex M-4650B was used to measure the current. The

electrochemical cell used was the same from the voltammetric tests.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Electrochemistry Analysis – Cyclic voltammetry

Initially the electrochemistry characterization tests were carried out, through the use of cyclic voltammetry technique, in an *Arnica montana* extract solution ( $100$  mL/L), before and after the application of a not therapeutic ultrasound bath, during  $15$  minutes, in a  $50$  mV/s scan rate. All the measured potentials are regarding the Ag/AgCl electrode.

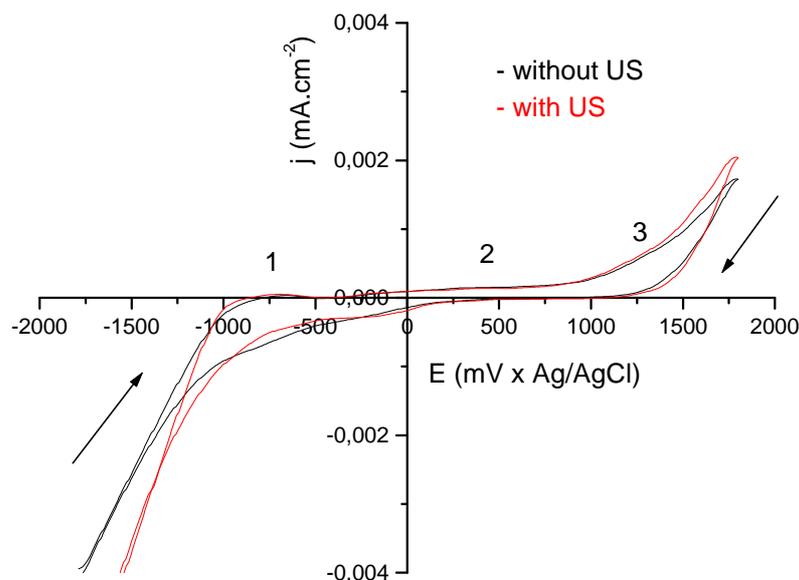


Fig. 3 – Cyclic voltammogram of *Arnica montana* extract solution before and after application of ultrasound,  $s = 50$  mV/s

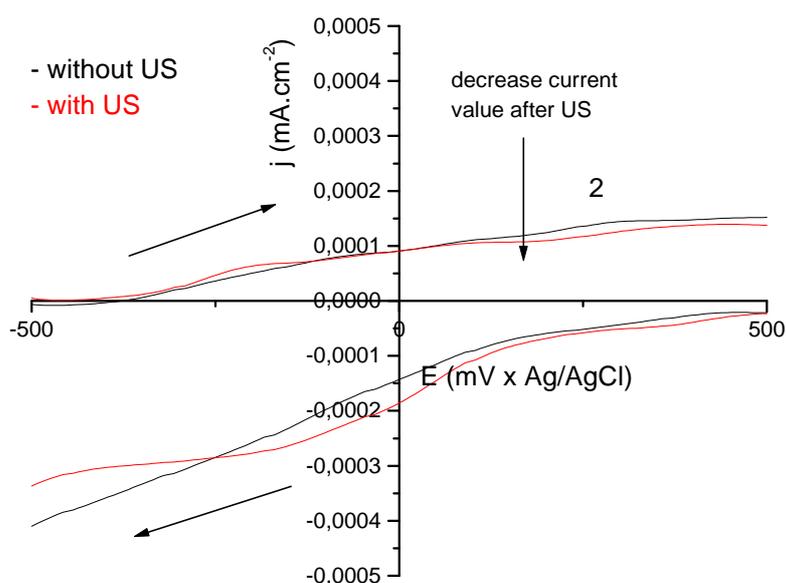


Fig. 4 – Zoom of electrochemical window: – 500 to + 500 mV.

The analysis of the obtained results, according to figure 3, allows to check that in 0.39V potential, the value of the current before exposing the sample to the ultrasound was approximately 0.120  $\mu\text{A}$  (after exposure was 0.143  $\mu\text{A}$ ), indicating there was a reduction of electrical current when the sample was subjected to therapy by ultrasound.

At the same time in low value potential regions, takes place the loose of hydrogen because of proton reduction.

In this voltammogram there are 3 peaks (anodic and cathodic) found in the platinum / water / *Arnica montana* system. In low values potential regions (around – 1.2 V), it can be seen the hydrogen formation, resulting in a fast decrease of the values of current. The peak 1 can be due to the platinum behavior in consequence of presence of hydrogen in the system, involving superficial adsorption processes [18]. The peak 2 is related to *Arnica montana* presence in the solution in regions near to 0.39 V [12, 19]. In high values potential regions (over 1.2 V), it can be seen the oxygen formation through the water oxidation, resulting in a fast increase of the values of current, and peak 3 is characteristic from systems which have organic species in solution [20, 21, 22, 23].

In whit and without ultrasound cyclic voltammogram, the charge (Q) value are 1.17mC.cm<sup>-2</sup> and 0.97584mC.cm<sup>-2</sup> respectively (Fig. 4), according to the literature [24]. These values

demonstrate the oxidation of organics species, in this case, the *Arnica montana* solution.

Therefore, the oxygen evolution reaction (OER) is dislocation for less positive potential values [24, 25].

## 3.2 Chronoamperometry

### 3.2.1 Continuous ultrasound

From the results obtained by cyclic voltammetry, the potential of 0.39 V and 0.5 V were chosen, being this potential near to the potential of *Arnica montana*'s oxidation potential (0.39 V). All the samples of the arnica solution (100 mL/L) were evaluated through Chronoamperometry, in different times (0, 5, 15 and 15 minutes) of ultrasound application at the continuous modes (1.0 W/cm<sup>2</sup> intensity) and pulsated (100 Hz, 20 %, 1.0 W/cm<sup>2</sup> intensity).

Using the analysis of variance (ANOVA) among the obtained results from the *Arnica montana*'s voltammetric profile, before and after the application of continuous ultrasound, in electric potentials of 0.39V, in fulfilled treatments “in situ”, “ex immediate situ” (soon after the application of the ultrasound) and “ex situ after 1 hour” of rest, significant differences were not seen ( $p = 0.0791$ ) and as well as no significant differences were

checked between the different times of exposure of the samples to the therapy ( $p = 0.5875$ ).

The same behavior was observed in treatments carried out with pulsed ultrasound, in other words, in the analyses in situ, ex situ immediate (soon after the application of the ultrasound) and ex situ after a one-hour time of rest  $p = 0.0754$  and between the times  $p = 0.6631$ .

Likewise, for the 0.5 V potential significant differences ( $p = 0.1024$ ) haven't shown up and, neither have significant differences between the different times of exposure of the samples to therapy ( $p = 0.6668$ ).

### 3.2.2 Pulsed ultrasound

The potential that presented electrochemical alterations was the 0.5V one. These differences can be explained by the fact that this study, differently of the one already carried through [12] uses platinum work electrode, having as a reference electrode Ag/AgCl, instead of the carbon paste electrode and Ag/AgCl/KCl (sat), mentioned in the literature.

In Fig. 5 one can see the behavior of the current in the different application times of potential (0.5V).

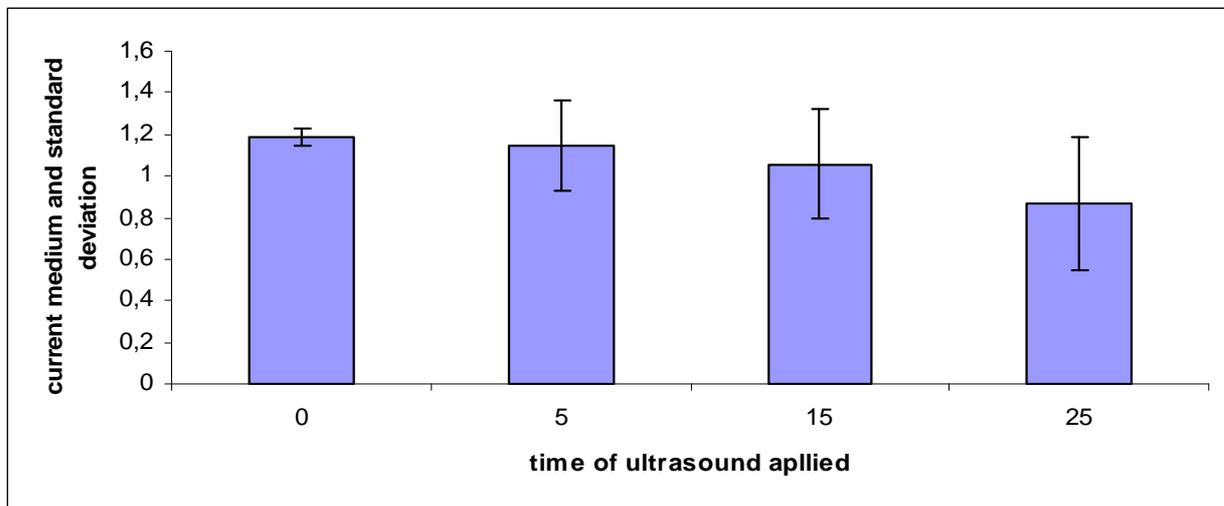


Fig. 5 – ex situ after one hour rest reading: current x time of ultrasound applied in potential of 0.5V. 100Hz pulsed ultrasound, 20%,  $d=1.0W/cm^2$ , 100 mL/L solution.

These results are due to the ex situ (rest of 1 hour) essays: In the application of pulsed ultrasound, in a 100 Hz frequency, pulse duration cycle of 20%, in a  $1.0W/cm^2$  intensity, an *Arnica montana* glycolic extract in dilution of 100 mL/L (Fig. 5) and potential of 0.5V the current value before the sample exposure to the ultrasound was of approximately 1.18mA. After the ultrasound application times of 5, 15 and 25 minutes, a current value of 1.14 mA, 1.05 mA and 0.87 mA, was gotten respectively.

Therefore, it can be evidenced that electrochemical alterations in the system occur, being able to indicate the degradation of active principles in the *Arnica montana* solution. This alteration probably occurs due to great agitation

(cavitations) promoted by the ultrasound. This phenomenon can cause a break in the molecule interaction, having these extracts of plants double bonds that also are affected by the system's agitation [26].

This phenomenon is known as being a physical action by ultrasound, that besides the already mentioned, the effect may promote the cleaning of electrodic surfaces by dissolution of the inhibiting layers, resulting mainly in improving the solid-liquid mass transfer between electrode and solution. Moreover, there are the chemical effects, which are also consequences of violent collapses. The "hot spot" theory predicts high temperatures and pressures inside the bubble during the final compression. Under such static conditions, oxidized

species are generated by molecules homolytic cleavage (gases and solvent). In aqueous media and in the presence of oxygen, the radicals thus formed can considerably improve the electrochemical process performance [27].

In performed experiments, there is a linear trend of decreasing values of current through the current values plot vs. degradation time (Fig. 6).

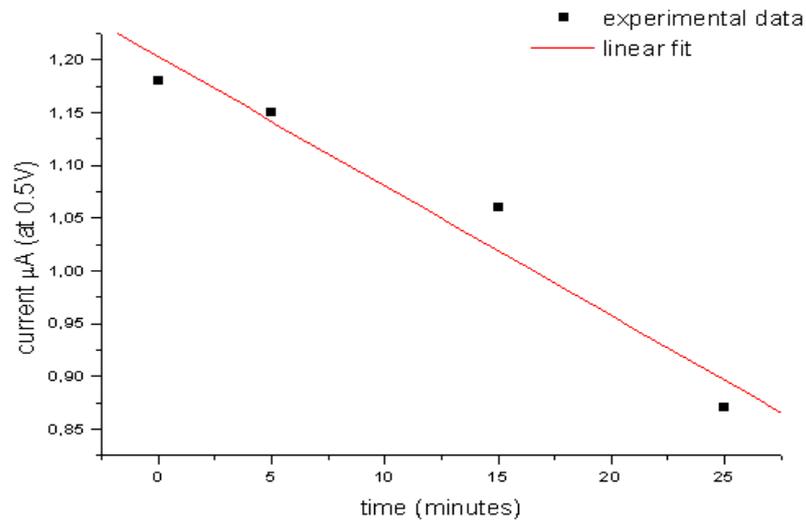


Fig. 6 – Current values x *Arnica montana* degradation time

Observing Figure 5, it can be seen a linear behavior, represented by the equation of line  $y = -0.01227 \cdot x + 1.20305$  and correlation coefficient  $R = 0.97426$  at the decay of the current density ( $j$ ) on the *Arnica montana* solutions in different ultrasound application times indicating a possibility of *Arnica montana* degradation detection through the cyclic voltammetry and / or chronoamperometric techniques, with a semi-quantitative possibility of detection of *arnica montana* samples.

Considering the ultrasound action on the water molecules forming hydroxyl radicals and the cavitation effect that can promote the homolytic cleavage of compounds present in the solution,

besides the presence of active principles as helenalin (Figure 1) and isoquercetin (Fig. 2), which show carbonyl radicals, hydroxyl and aromatic rings in its structure, suggesting that the physical and chemical action of ultrasound promotes modification of the studied substrate (*Arnica montana*) involving the solvent (water) and also the extract.

In Fig. 7, shows the oxidation reaction of the  $-OH$  groups in the ring of isoquercetin. This mechanism is similarly of the study already carried through of rutin, mentioned in the literature [19].

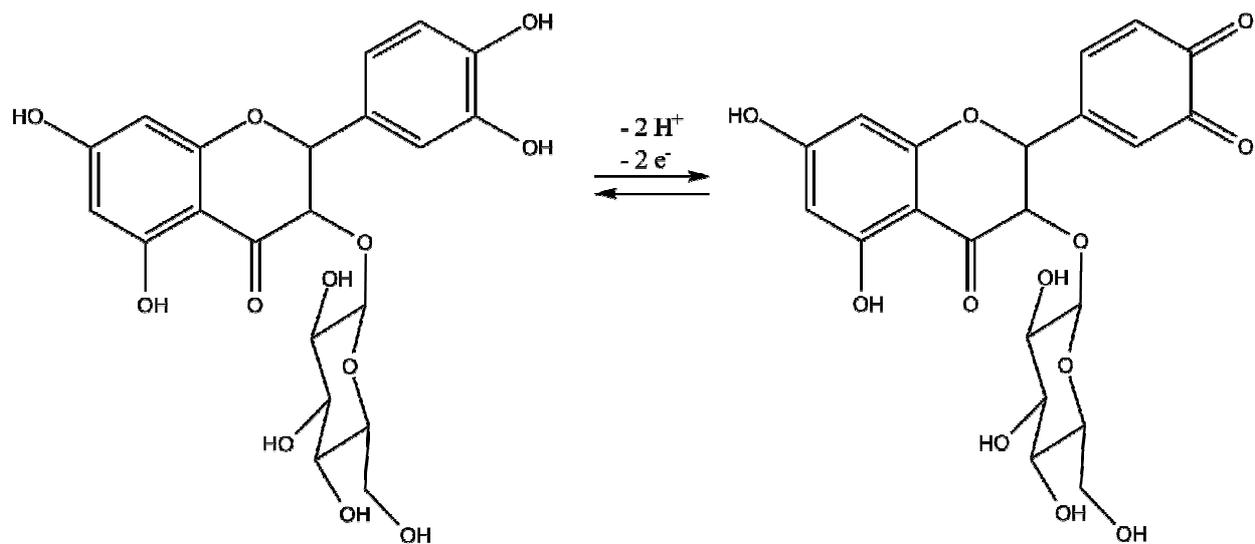


Fig.7: Mechanism of isoquercetin oxidation

It should be pointed out that, in samples containing complex matrices, it is necessary to perform the opening of the sample so that no interference occurs in the electrochemical analysis, since other compounds may have their electrochemical reactions in this same range of potentials (electrochemical window) [13].

## 4 Conclusion

From the obtained results, it is suggested that the physics and chemical action of ultrasound promotes the modification of the studied substrate (*Arnica montana*) involving the solvent (water) and the extract as well. Furthermore, the results show the possibility of detecting the degradation of *Arnica montana* through the cyclic voltammetry and / or chronoamperometry technique, with a semi-quantitative possibility of detection of the samples.

## 5 Acknowledgments

The authors would like to acknowledge financial support from UNIVATES and the ultrasound equipment from DGM Eletrônica Ltda (D&D).

### References:

- [1] V. F. Veiga Junior, A. C. Pinto, M. A. Maciel. Medicinal Plants: Safe cure? *Química Nova*, Rio de Janeiro, Vol. 28, No. 3, pp. 519-528, 2005.
- [2] M. Chorilli et al. Lipossomas em formulações dermocosméticas. *Infarma*, Vol.16, pp.73-77, 2004.
- [3] M. Teske, A. M. M. Trentini. *Compêndio de Fitoterapia – Herbarium*. 3.ed. Curitiba: Herbarium, 1997.
- [4] N. G. Bisset (ed). *Max Wichtl Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals: a handbook for practice on a scientific basis*. Stuttgart: Medpharm, 1994.
- [5] F. de Oliveira, G. Akissue. *Fundamentos de Farmacobotânica*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1989.
- [6] S. Kitchen. *Eletroterapia: prática baseada em evidências*. 3. ed. São Paulo: Manole, 2003.
- [7] R. Guirro, S. C. B. dos Santos. A realidade da potência acústica emitida pelos equipamentos de ultra-som terapêutico: uma revisão. *Revista de Fisioterapia da Universidade de São Paulo*, Vol. 4, No. 2, pp. 76-82, 1997.
- [8] R. Guirro, S. C. B. dos Santos. Evaluation of the acoustic intensity of new ultrasound therapy equipment. *Elsevier Science*, Vol. 39, pp. 553-557, 2002.
- [9] R. Guirro et al. Calibration of Therapeutic Ultrasound Equipment. *Physioterapy*, Vol. 83, No. 8, pp. 419-422, 1997.
- [10] C. Fusaro. *Estudo da fonoforese de diclofenaco dietilamônio em voluntários sadios*. Campinas, SP: [s.n.], 2006. Biblioteca digital da UNICAMP. <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=vtls000380461>. accessed in jan. 2009.

- [11] C. Rosado, L. M. Rodrigues. Solvent effects in permeation assessed in vivo by skin surface biopsy. *BioMedic Central*, Vol. 3, 2003. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=317329&blobtype=pdf>>. accessed in jan. 2009.
- [12] E. S. Gil, A. L. S. Goncalves, T.C. Lucio. Determinação do potencial anódico em estado sólido: Uma ferramenta preditiva para determinação do potencial antioxidante de fitoterápicos. In: *Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007, Águas de Lindóia-SP*. São Paulo: Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, 2007.
- [13] S. Stülp, C. P. da Silva, S. Marmitt. Avaliação eletroquímica e degradação fotoquímica do pesticida malathion. *Revista Liberato. Novo Hamburgo*, Vol. 9, No. 12, pp. 7-12, jul/dez. 2008. <<http://www.liberato.com.br/upload/arquivos/0103110810115619.pdf>> accessed in jan. 2009.
- [14] D. de Souza, A. Galli, M. L. Calegari, S. A. S. Machado, R. C. Pires, Use of the multiple square wave voltammetry in the electroanalytical determination of organic and inorganic compounds. *Química Nova*, Vol. 30, No. 2, pp. 458-463, 2007.
- [15] K. J. Vetter, *Electrochemical Kinetics: Theoretical and Experimental Aspects*, Academic Press, New York, 1967.
- [16] M. Noel, K. I. Vasu, *Cyclic Voltammetry and the Frontiers of Electrochemistry*. London: Aspect Publications Ltd, 702 p., 1990.
- [17] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, Validation for chromatographic and electrophoretic methods. *Química Nova*, Vol. 27, No. 5, pp. 771-780, 2004.
- [18] V. P. Santos, G. Tremiliosi Filho. The correlation between the atomic surface structure and the reversible adsorption-desorption of hydrogen on single crystal Pt(111), Pt(100) e Pt(110). *Química Nova*, São Paulo, Vol. 24, pp. 856-863, 2001.
- [19] S. X. dos Santos, Luiz H. Mazo and Éder T. G. Cavalheiro, The Use of a Graphite-Silicone Rubber Composite Electrode in the Determination of Rutin in Pharmaceutical Formulation, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 19, No. 8, pp. 1600-1606, 2008.
- [20] E. F. de Azevedo, Y. D. T. de Albuquerque, W. T. P. dos Santos. Investigação de metodologias de determinação de pesticidas carbamatos em alimentos por cromatografia líquida. *Horizonte Científico*, Vol.1, No.6, 2006.
- [21] L. P. R. Profeti, D. Profeti, P. Olivi, Atividade eletrocatalítica de eletrodos compostos por Pt, RuO<sub>2</sub> e SnO<sub>2</sub> para a eletrooxidação de formaldeído e ácido fórmico, *Eclética Química*, Vol. 30, no. 1, pp. 75-83, 2005.
- [22] L. V. Lavagnoli, M. Navarro, W. F. De Giovanni, J. R. Romero, Oxidações eletroanalíticas de substratos orgânicos em sistema bifásico utilizando um complexo de Rutênio (IV). *Química Nova*, Vol. 18, No. 2, pp. 157-159, 1995.
- [23] M. Vukovic, Oxygen evolution reaction on thermally treated iridium oxide films. *Journal of Applied Electrochemistry*, Vol. 17, pp. 737-745, 1987.

- [24] M. Catanho, G. R. P. Malpass, A. de J. Motheo, Evaluation of electrochemical and photoelectrochemical methods for the degradation of three textile dyes. *Química Nova*, Vol. 29, No. 5, pp. 983-989, 2006.
- [25] G. R. P. Malpass, A. J. Motheo, Screening Process for Activity Determination of Conductive Oxide Electrodes for Organic Oxidation. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 19, No. 4, pp. 672-678, 2008.
- [26] V. F. Péres et al. Comparison of soxhlet, ultrasound-assisted and pressurized liquid extraction of terpenes, fatty acids and vitamin E from piper *gaudichaudianum* Kunth. *Journal of chromatography A*, pp. 115-118, 2006.
- [27] G. S. Garbellini, G. R. Salazar-Banda, L. A. Avaca. Ultrasound applications in electrochemical systems: theoretical and experimental aspects. *Química Nova*, São Paulo, Vol. 31, No. 1, pp. 123-133, 2008.

**ANEXO D – Laudo de calibração do equipamento de US terapêutico.**

# Metron ansur

## Test and Inspection Procedure

Copyright © 1999 - 2001 Metron AS

### Gravação do teste

APROVADO			
Teste realizado	terça-feira, 29 de julho de 2008	Componentes utilizados do ansur	ansur Versão 1.4.14
Data:	terça-feira, 29 de julho de 2008	SNV037493	Plug-In: QA-90 Versão 1.4.6
Gravado:	SNV037493	BIFASICO 220V 1_3	
Template:	SONOCAV 1_3 MHz REV02.mtr		

### Configuração do teste

#### Seleções

Tarefas de serviço realizadas	Normas aplicadas
	IEC 601.1

#### Projeto em teste

Número serial	Código	Grupo	Estátu	Manufaturado	DGM ELETRONICA LTDA	Tipo	Modelo	Location	Endereço 1	Endereço 2
SNV037493										

#### QA-90

#	Informações do módulo	Classes	Entradas (Leads)
1	Módulo CABECOTE Serial No. SNV037493 Tipo	BF	1

#### Dados MTI

Instrumento de teste	Número serial	Versão de Firmware
QA-90	11235	03.24

#### Assinatura

*Raquel* *Reginaldo Pinheiro*

\\pdc\analizador\ANALISADOR DE SEGURANÇARESULTADOS DE ANALISE\Manutenção\SNV037493.página 1 of 3  
BIFASICO 220V 1\_3 MHz.mtr

### Resultados do teste

Elementos de teste	Tipo de teste	Fail #
SEQ. DE TESTE SONOCAV 1/3 MHz 220V	QA-90 Sequencia de Teste	
Testes de alimentação	Testes de alimentação	
Fase - Neutro	Testes de alimentação Fase - Neutro	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	255.6 V	
Fase - Terra	Testes de alimentação Fase - Terra	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	138.3 V	
Neutro - Terra	Testes de alimentação Neutro - Terra	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	114.5 V	
Corrente de consumo	Corrente de consumo	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	149.0 mA	
Resistência de aterramento	Resistência de aterramento	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	102.0 mOhm	
Resistência de isolamento	Resistência de isolamento	
Alimentação - Gabinete	Resistência de isolamento Alimentação - Gabinete	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	999.0 MOhm	
Parte aplicada - Gabinete	Resistência de isolamento Parte aplicada - Gabinete	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	999.0 MOhm	
Corrente de fuga para o terra	Corrente de fuga para o terra	
Condição Normal	Corrente de fuga para o terra Condição Normal	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	33.0 uA	
Fase Interrompida	Corrente de fuga para o terra Fase Interrompida	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	274.0 uA	
Condição normal, com inversão de fase	Corrente de fuga para o terra Condição normal, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	27.0 uA	
Fase Interrompida, com inversão de fase	Corrente de fuga para o terra Fase Interrompida, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	274.0 uA	
Corrente de fuga através do Gabinete	Corrente de fuga através do Gabinete	
Condição Normal	Corrente de fuga através do Gabinete Condição Normal	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	0.0 uA	
Fase Interrompida	Corrente de fuga através do Gabinete Fase Interrompida	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	0.0 uA	
Terra Interrompido	Corrente de fuga através do Gabinete Terra Interrompido	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	24.0 uA	
Condição normal, com inversão de fase	Corrente de fuga através do Gabinete Condição normal, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	0.0 uA	
Fase Interrompida, com inversão de fase	Corrente de fuga através do Gabinete Fase Interrompida, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	0.0 uA	

\\pdc\analizador\ANALISADOR DE SEGURANÇARESULTADOS DE ANALISE\Manutenção\SNV037493.página 2 of 3  
BIFASICO 220V 1\_3 MHz.mtr

Elementos de teste	Tipo de teste	Fail #
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	0.0 uA	
Terra interrompido, com inversão de fase	Corrente de fuga através do Gabinete Terra interrompido, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
Single QA-90 test	27.0 uA	
Corrente de fuga AC através do paciente	Corrente de fuga AC através do paciente	
Condição Normal	Corrente de fuga AC através do paciente Condição Normal	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	0.0 uA	
Fase Interrompida	Corrente de fuga AC através do paciente Fase Interrompida	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	0.0 uA	
Terra Interrompido	Corrente de fuga AC através do paciente Terra Interrompido	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	0.0 uA	
Condição normal, com inversão de fase	Corrente de fuga AC através do paciente Condição normal, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	0.0 uA	
Fase Interrompida, com inversão de fase	Corrente de fuga AC através do paciente Fase Interrompida, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	0.0 uA	
Terra interrompido, com inversão de fase	Corrente de fuga AC através do paciente Terra interrompido, com inversão de fase	
Resultados:	Valor: Unidade	
CABECOTE	2.0 uA	

\\pdc\analizador\ANALISADOR DE SEGURANÇARESULTADOS DE ANALISE\Manutenção\SNV037493.página 3 of 3  
BIFASICO 220V 1\_3 MHz.mtr

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)