



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

GABRIELA BRASIL ROMÃO

ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
***Cordia verbenacea* DC. EM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE**
IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

ARARAQUARA - SP

2016

GABRIELA BRASIL ROMÃO

**ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE
Cordia verbenacea DC. EM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE
IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa

ARARAQUARA - SP

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

R761e Romão, Gabriela Brasil
Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica / Gabriela Brasil Romão. - Araraquara, 2016. 118 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração em Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.
Coorientador: Marcos Antônio Corrêa

1. *Cordia verbenacea* DC. 2. Atividade antioxidante 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Fitoquímica. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Corrêa, Marcos Antônio, coorient. III. Título.

CAPES: 50700006

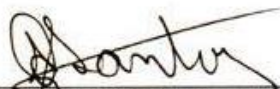
GABRIELA BRASIL ROMÃO

ESTUDO IN VITRO DA AÇÃO DE EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Cordia verbenacea* DC. EM ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

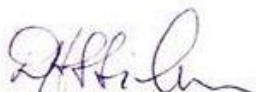
Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara, 04 de julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA



ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS



DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e a todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente para a sua realização.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Lisete e Irandir, por todos os ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram, serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim, sempre me apoiando e acreditando nos meus sonhos. Agradeço também ao meu irmão Rodrigo que sempre se interessou pelo meu trabalho, me apoiando nas minhas decisões. Eu os amo muito.

Também agradeço meu noivo, Henrique, que acabou de se graduar em Química, por ter me apoiado muito desde o início do mestrado, além de ter me ajudado bastante com a parte química do trabalho.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, que se dedicou ao máximo para que este trabalho se realizasse e, também, admiro a sua conduta que estabele uma relação de amizade com seus alunos, tornando o trabalho muito mais produtivo e encorajador. A ele devo a minha sincera gratidão por contribuir com a mudança que ocorreu na minha perspectiva acadêmica, que evoluiu muito, comparada a visão de 2 anos atrás, quando entrei para a UNESP.

Minha sincera gratidão ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa, que também teve fundamental importância para que se iniciasse este trabalho, além da sua exímia orientação durante o período em que foram realizados os experimentos no laboratório de cosmetologia. Foi através dele que se iniciou o desenvolvimento deste projeto de mestrado e, também, foi a pessoa que me abriu as portas para que eu ingressasse no mundo acadêmico.

Agradeço ao Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti que disponibilizou seu laboratório para que toda a parte de ensaios antioxidantes fosse realizada, além de estar a disposição para qualquer discussão sobre os experimentos, e me orientando da melhor maneira possível. Grande parte deste trabalho foi realizado em seu laboratório, e agradeço ao professor e aos alunos, principalmente a aluna de doutorado Renata Pires de Assis que se disponibilizou para ensinar todos os protocolos dos ensaios. Criei uma relação de amizade tanto com o professor como com os alunos e vocês me fizeram sentir muito bem-vinda em seu laboratório, o que tornou a realização dos experimentos muito mais produtiva e agradável. Agradeço muito a vocês por isso.

Agradeço também à Prof^ª Dr^a Vera Lucia Isaac por disponibilizar todo o material para os ensaios de citotoxicidade e, também, à Prof^ª Dra^a Regina Maria Barreto Cicarelli por

disponibilizar o espaço do laboratório para que estes ensaios pudessem ser realizados. Outra parte destes ensaios foram realizados no laboratório de citologia da Prof^ª Christiane Pienna Soares, que disponibilizou o espaço e os materiais, eu a agradeço muito. Devo agradecer também à aluna de doutorado Gabriela, à aluna de pós-doutorado Bruna e à aluna de mestrado Isabela, por me ensinarem pacientemente os ensaios de citotoxicidade.

Agradeço ao aluno de doutorado Juhan Scardelado por ter disponibilizado todo o material vegetal utilizado neste trabalho, além do extrato etanólico e óleo essencial e, também, de ter me auxiliado nas análises em CLAE e disponibilizado seu tempo para qualquer discussão dos experimentos.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Celia, Isabela, Juhan, Flávio, Fernando, Elaíse, Ana e Caio que de muitas formas me ajudaram na realização de experimentos e no entendimento de algum conceito, facilitando de várias maneiras a forma como este trabalho foi desenvolvido.

Meus sinceros agradecimentos às minhas queridas amigas Celia, Bruna e Gabriela, amigas de república, que sempre me apoiaram, me ajudaram em momentos difíceis e participaram de muitos momentos bons e divertidos da minha vida em Araraquara. A Celia, além de ser minha parceira no laboratório, é uma amiga muito importante e sei que terei a sua amizade para o resto da vida. A Bruna, uma menina encantadora e divertida que me alegrou e distraiu em muitos momentos em que eu precisava. E a Gabriela, que desde o início me ajudou a ingressar na UNESP e, também, me auxiliou em vários experimentos, além de ser uma ótima amiga.

E por último, mas não menos importante, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

(Marcel Proust)

RESUMO

A erva-baleeira, *Cordia verbenacea* DC., é uma espécie de planta originária do Brasil, encontrada principalmente na Floresta Tropical Atlântica. É largamente utilizada na medicina tradicional por apresentar, principalmente, ação anti-inflamatória. Dados recentes da literatura mostraram que esta ação está relacionada à presença de compostos fenólicos, flavonoides e sesquiterpenos, além de ser constatada a atividade antioxidante em diferentes extratos de *C. verbenacea*. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas constantemente no organismo, podendo causar danos ou benefícios aos sistemas biológicos. Estão altamente relacionadas com o processo de envelhecimento do organismo, e, conseqüentemente, do envelhecimento cutâneo. A busca e pesquisa de cosméticos com ativos naturais com propriedades antioxidantes tem aumentado significativamente. Este estudo teve como objetivo avaliar a ação do extrato hidroetanólico 70 % de folhas de *C. verbenacea* (EtOH 70 %) em diferentes espécies reativas de oxigênio de importância biológica, para uma possível aplicação na prevenção do envelhecimento cutâneo. Inicialmente, foram comparados os extratos etanólico, hidroetanólico 70 % e aquoso de folhas de *C. verbenacea* a fim de selecionar o extrato com maior teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, além de maior atividade antioxidante. O extrato EtOH 70 % foi selecionado para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* frente a diferentes espécies reativas (radicais modelo ou sistemas biológicos modelo envolvendo estas espécies) como também avaliar a citotoxicidade, os perfis cromatográficos em CCD e CLAE-DAD e desenvolver uma formulação fitocosmética contendo o extrato para avaliar o fator de proteção solar (FPS). O extrato EtOH 70 % apresentou resultados promissores em relação à atividade antioxidante comparado aos resultados dos padrões utilizados e aos dados da literatura disponíveis para extratos vegetais similares. Com relação ao FPS, este não apresentou valor considerável. Na linhagem celular HepG2 o extrato EtOH 70 % não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, porém, na linhagem HaCat, apresentou baixa citotoxicidade. O extrato EtOH 70 % apresentou teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais de 14,0 e 4,0 % (m/m), respectivamente; os valores de CE₅₀ obtidos para os ensaios de análise antioxidante pelo DPPH•, ABTS⁺, O₂^{-•}, descolorimento da crocina (ROO•), HOCl e H₂O₂ foram de 13,44, 7,02, 196,61, 10,93, 3,49 e 302,17 µg/mL, respectivamente; os perfis cromatográficos mostraram-se complexos contendo substâncias de média e alta polaridade, sugerindo a presença de flavonoides e triterpenos pelos espectros no UV e sendo confirmada pela quantificação das substâncias 4',5'-diidroxí-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A e outro triterpeno análogo à cordialina A com teores de 0,66, 0,67 e 0,12 % (m/m),

respectivamente. Com os resultados obtidos foi possível comprovar a eficácia do extrato EtOH 70 % quanto à sua pronunciada atividade antioxidante frente a diferentes espécies reativas, possivelmente, devido às substâncias fenólicas e flavonoides, o que pode ter também relação com a sua atividade anti-inflamatória.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea* DC. Atividade antioxidante. Espécies reativas de oxigênio. Fitoquímica.

ABSTRACT

Erva-baleeira, *Cordia verbenacea* DC., is a native Brazilian plant species, mainly found at the Atlantic Forest. It is widely used in traditional medicine mostly for its anti-inflammatory properties. Literature data shows that this activity is related to the presence of phenolic compounds, flavonoids and sesquiterpenes, it was also verified the antioxidant activity for different extracts of *C. verbenacea*. Reactive oxygen and nitrogen species are constantly produced in the organism and might cause damage or benefits on biological systems. They are highly related to the ageing process of the body and, consequently, to skin ageing. The research for natural cosmetics drugs with antioxidant properties has had a significant increase and, therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of an hydroethanolic extract of *C. verbenacea* leaves (EtOH 70 %) on different reactive oxygen species of biological importance. Initially, the ethanolic, hydroethanolic (70 %) and aqueous extracts of *C. verbenacea* leaves were compared to select the extract with a higher total phenolic content and total flavonoid content, as well as higher antioxidant activity. The EtOH 70 % extract was selected for in vitro evaluation of its antioxidant activity against different reactive species (radicals model or bioprocess model involving these species), but also to evaluate its cytotoxicity, the chromatographic profiles in TLC and HPLC and to develop a phytocosmetic containing the extract, to evaluate its sun protection factor (SPF). The EtOH 70 % extract showed promising results concerning the antioxidant activity compared to the standard substances used and to the available literature data for similar plant extracts. Regarding to the SPF, the extract did not present a considerable value. In HepG2 cell line, the extract did not show cytotoxicity on the tested concentrations, but, in HaCat cell line, it showed low cytotoxicity. The EtOH 70 % extract exhibited total phenolic content and total flavonoid content of 14.0 and 4.0 % (w/w), respectively; the EC₅₀ values obtained from the antioxidant activity tests by DPPH[•], ABTS⁺, O₂^{-•}, crocin bleaching (ROO[•]), HOCl and H₂O₂ assays were 13.44, 7.02, 196.61, 10.93, 3.49 and 302.17 µg/mL, respectively; the chromatographic profiles demonstrated to be complex containing substances of medium and high polarity, suggesting the presence of flavonoids and triterpenes by UV spectra, which were confirmed by the quantification of 4',5-dihydroxy-2',3,5',6,7-pentamethoxyflavone, cordialin A and another triterpene similar to cordialin A with the content of 0,66, 0,67 e 0,12 % (w/w), respectively. From the obtained results, it was possible to prove the effectiveness of EtOH 70 % extract regarding its pronounced antioxidant activity against different reactive species, possibly, due to the phenolics and flavonoids and, also, the relation with its anti-inflammatory activity.

Keywords: *Cordia verbenacea* DC. Antioxidant activity. Reactive oxygen species. Phytochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Cordia verbenacea</i> DC.	4
Figura 2 - Reações envolvendo a formação das ERO.	10
Figura 3 - Via de lipoperoxidação	13
Figura 4 - Antioxidantes naturais separados em classes.....	19
Figura 5 - Reação do ácido gálico com o cátion molibdênio (Mo^{6+}), componente do reagente Folin-Ciocalteau ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em meio ácido), que apresenta coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, após ser reduzido (Mo^{5+}), ocorre a formação dos complexos molibdênio-tungstênio com coloração azul	28
Figura 6 - Formação do complexo flavonoide- Al^{3+} ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$)	29
Figura 7 - Estrutura química do radical DPPH $^{\bullet}$	30
Figura 8 - Estruturas químicas da quercetina, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E e seu análogo solúvel em água, trolox	31
Figura 9 - Formação do radical ABTS $^{+\bullet}$	32
Figura 10 - Esquema da geração do $\text{O}_2^{\bullet-}$ e a ação de um antioxidante para inibir a formação de formazana.....	33
Figura 11 - Estrutura química da crocina	34
Figura 12 - Estrutura de um fosfolípido (fosfatidilcolina)	34
Figura 13 - Reações envolvidas no descoramento da crocina através da termólise do AAPH e a ação de um antioxidante que inibe este processo	36
Figura 14 - Oxidação do TMB pelo HOCl/OCl $^-$	38
Figura 15 - Oxidação do TNB em DTNB pelo H_2O_2	39
Figura 16 - Curva analítica do ácido gálico.....	45
Figura 17 - Curva analítica da quercetina.....	48
Figura 18 - Estrutura básica de um flavonoide (flavona)	50
Figura 19 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH $^{\bullet}$ versus a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$)	52
Figura 20 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH $^{\bullet}$ versus a concentração de extrato etanólico (EtOH) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de <i>C. verbenacea</i>	53
Figura 21 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH $^{\bullet}$ versus a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de <i>C. verbenacea</i> .	54

Figura 22 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH [•] <i>versus</i> a concentração de extrato aquoso (Aq) (µg/mL) de folhas de <i>C. verbenacea</i>	55
Figura 23 - Inibição (captura) do DPPH [•] (CE ₅₀ µg/mL) pelo padrão e extratos.....	56
Figura 24 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de ácido ascórbico (µg/mL)	58
Figura 25 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de quercetina (µg/mL)	59
Figura 26 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de trolox (µg/mL)	60
Figura 27 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS ^{•+} <i>versus</i> a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) (µg/mL) de folhas de <i>C. verbenacea</i> .	61
Figura 28 - Inibição (captura) do ABTS ^{•+} (CE ₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.	62
Figura 29 - Porcentagem de inibição (captura) do radical O ₂ ^{-•} <i>versus</i> a concentração de ácido ascórbico (µg/mL)	64
Figura 30 - Porcentagem de inibição (captura) do radical O ₂ ^{-•} <i>versus</i> a concentração de quercetina (µg/mL)	65
Figura 31 - Porcentagem de inibição (captura) do radical O ₂ ^{-•} <i>versus</i> a concentração de trolox (µg/mL)	66
Figura 32 - Porcentagem de inibição (captura) do radical O ₂ ^{-•} <i>versus</i> a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) (µg/mL) de folhas de <i>C. verbenacea</i>	67
Figura 33 - Inibição (captura) do O ₂ ^{-•} (CE ₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.	68
Figura 34 - Razões das velocidades (V ₀ /V) e das concentrações ([A]/[C]), no ensaio de descoloramento da crocina com o ácido ascórbico	70
Figura 35 - Razões das velocidades (V ₀ /V) e das concentrações ([A]/[C]), no ensaio de descoloramento da crocina com a quercetina.....	71
Figura 36 - Razões das velocidades (V ₀ /V) e das concentrações ([A]/[C]), no ensaio de descoloramento da crocina com o trolox	72
Figura 37 - Razões das velocidades (V ₀ /V) e das concentrações ([A]/[C]), no ensaio de descoloramento da crocina com o extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) de folhas de <i>C. verbenacea</i>	73
Figura 38 - Inibição do descoloramento da crocina (CE ₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.....	75
Figura 39 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl <i>versus</i> a concentração de ácido ascórbico (µg/mL)	77

Figura 40 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl <i>versus</i> a concentração de quercetina (µg/mL)	78
Figura 41 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl <i>versus</i> a concentração de trolox (µg/mL)	79
Figura 42 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl <i>versus</i> a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) (µg/mL) de folhas de <i>C. verbenacea</i>	80
Figura 43 - Inibição (captura) do HOCl (CE ₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.....	81
Figura 44 - Porcentagem de inibição (captura) do H ₂ O ₂ <i>versus</i> a concentração de ácido ascórbico (µg/mL)	82
Figura 45 - Porcentagem de inibição (captura) do H ₂ O ₂ <i>versus</i> a concentração de catalase (U/mL)	83
Figura 46 - Porcentagem de inibição (captura) do H ₂ O ₂ <i>versus</i> a concentração de extrato EtOH 70 % (µg/mL).	84
Figura 47 - Inibição (captura) do H ₂ O ₂ (CE ₅₀ µg/mL) pelo padrão, enzima e extrato.	85
Figura 48 - Determinação da viabilidade celular em HepG2 dada em porcentagem	86
Figura 49 - Determinação da viabilidade celular em HaCat dada em porcentagem	87
Figura 50 - Cromatoplasmas do extrato EtOH 70 %, do extrato EtOH e do óleo essencial de folhas de <i>C. verbenacea</i> (sílica gel)	89
Figura 51 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos EtOH (a), EtOH 70 % (b) e Aq (c)	90
Figura 52 - Cromatograma obtidos por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (condições de análise na Figura 51) e espectros no UV referente aos picos 1, 2 e 3	91
Figura 53 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 1)	92
Figura 54 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 2)	92
Figura 55 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 3)	93
Figura 56 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 4)	93
Figura 57 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 5)	94
Figura 58 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 6)	94
Figura 59 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 7)	95
Figura 60 - Espectro no UV referente ao pico com t _R = 23 min da Figura 59	95
Figura 61 - Estruturas químicas da 4',5-diidroxí-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona e cordialin A	96
Figura 62 - Curva analítica da 4',5-diidroxí-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona em CLAE-DAD	97
Figura 63 - Curva analítica da cordialina A em CLAE-DAD.	98

Figura 64 - Curva analítica do triterpeno análogo à cordialina A em CLAE-DAD.....	99
Figura 65 - Cromatograma do extrato EtOH 70 % de <i>C. verbenacea</i> para a quantificação de substâncias	100
Figura 66 - Picos de interesse para a quantificação de substâncias.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades farmacológicas de derivados vegetais e metabólitos secundários de <i>C. verbenacea</i>	7
Tabela 2 - Classificações das ERO e ERN	9
Tabela 3 - Composição da formulação base	43
Tabela 4 - Equação de competição cinética entre padrões e amostra.....	74
Tabela 5 - Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO' em equivalentes ao ácido ascórbico, quercetina e trolox.	74
Tabela 6 - Comparação de valores das constantes de velocidade (coeficiente angular) e CE ₅₀ para o ensaio do descoramento da crocina.	75
Tabela 7 - Dados das análises de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona em CLAE-DAD para construção da curva analítica.....	97
Tabela 8 - Dados das análises de cordilina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.....	98
Tabela 9 - Dados das análises do triterpeno análogo à cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.....	99
Tabela 10 - Valores de FPS de diferentes concentrações de extrato EtOH 70 % incorporados à formulação cosmética com ou sem filtro solar orgânico.....	101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.2 JUSTIFICATIVA	3
1.3 REVISÃO DE LITERATURA	3
1.3.1 Cordia verbenacea DC.	3
1.3.2 Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (ERO, ERN e ERS)	7
1.3.2.1 Ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroperoxila (HO_2^{\cdot})	10
1.3.2.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	11
1.3.2.3 Radical hidroxila (HO^{\cdot})	11
1.3.2.4 Ácido hipocloroso ($HOCl$)	13
1.3.2.5 Radical peroxila (ROO^{\cdot}) e alcoxila (RO^{\cdot})	14
1.3.2.6 Oxigênio singlete (1O_2)	15
1.3.3 Estresse oxidativo	15
1.3.4 Antioxidantes	17
1.3.5 Extratos vegetais e atividade antioxidante	19
1.3.6 Envelhecimento cutâneo	22
1.3.7 Correlação entre processo inflamatório e oxidativo	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 MATERIAIS	26
3.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>C. verbenacea</i>	26
3.2.1 Preparo dos extratos para a seleção do líquido extrator	26
3.2.2 Preparo do extrato hidroetanólico 70 % em maior escala	27
3.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	28
3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	28
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
3.5.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH$^{\cdot}$	29
3.5.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ABTS$^{+}$	30
3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	32
3.5.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do descoramento da crocina	33

3.5.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa HOCl/OCl⁻	37
3.5.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa H₂O₂	39
3.5.7 Análise estatística	39
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE <i>C. verbenacea</i> EM CÉLULAS HepG2 e HaCat	40
3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	41
3.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	41
3.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e UV/Vis (CLAE-DAD e CLAE-UV/Vis)	41
3.7.2.1 <i>Quantificação de substâncias pelo método do padrão externo</i>	42
3.8 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA E AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FPS	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE <i>C. verbenacea</i>	44
4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	45
4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS	48
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
4.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH[•]	51
4.4.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+}	58
4.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ânion radicalar superóxido (O₂^{-•})	63
4.4.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do descoramento da crocina	69
4.4.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa HOCl/OCl⁻	76
4.4.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa H₂O₂	82
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO EtOH 70 % DE <i>C. verbenacea</i> EM CÉLULAS HepG2 e HaCat	86
4.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS E ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	88
4.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	88
4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	89
4.6.2.1 <i>Quantificação de substâncias pelo padrão externo</i>	96
4.7 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)	101
5 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103

1 INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN) são produzidas constantemente no organismo, podendo causar efeitos benéficos ou maléficos aos sistemas biológicos. No sentido de proteger o organismo, estas espécies reativas influenciam na regulação metabólica e nas defesas imunológicas contra infecções, porém, quando a geração dessas espécies excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo, ocorre o estresse oxidativo (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

As ERO compreendem, principalmente, os radicais derivados do oxigênio, tais como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e hidroxila (HO^{\bullet}), os quais são potentes iniciadores da lipoperoxidação, e derivados não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2) e ácido hipocloroso (HOCl). As ERN incluem derivados do radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) e espécies não radicalares como o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$). Estas espécies reativas estão diretamente envolvidas em patologias como câncer, Alzheimer, Parkinson, entre outras; no processo de envelhecimento do organismo, bem como nos processos inflamatórios ou de estresse oxidativo os quais têm participação bem estabelecida (DURACKOVÁ, 2010; MATTILA et al., 2015; PIZZA et al., 2013).

Estas ERO e ERN podem ser geradas tanto por fontes endógenas quanto exógenas, que são diretamente correlacionadas. Como fontes geradoras endógenas podem ser citados os neutrófilos, as enzimas produtoras de ERN e ERO, como a NO sintase e oxidases como xantina oxidase, no metabolismo oxidativo mitocondrial e várias patologias; já as fontes exógenas compreendem as radiações γ e UV, ultrassom, alimentos, drogas, poluentes, toxinas e xenobióticos (KOHEN; GATI, 2000).

O envelhecimento cutâneo é um processo degenerativo e pode ser dividido em dois tipos: intrínseco ou cronológico e extrínseco ou fotoenvelhecimento. O envelhecimento cutâneo intrínseco é causado por fatores genéticos que podem ser agravados por fatores neuro-hormonais e está diretamente relacionado ao desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante do organismo. O fotoenvelhecimento é consequência da radiação ultravioleta A e B (UVA e UVB) que causa mudanças moleculares nas células e conduz à formação de radicais livres, causando a degradação e dano nos sistemas antioxidantes de defesa da pele (BEGATIN, 2009; COSTA et al., 2012; SCOTTI et al., 2007).

No envelhecimento intrínseco e extrínseco é possível observar a ação das ERO e ERN que atuam como bases, abstraindo átomos de hidrogênio como nucleófilos, e substituindo outros grupos como radicais, adicionando-se a sistemas insaturados. As principais

consequências observadas na pele são a diminuição da elasticidade e da capacidade de retenção de água, o que resulta em aumento da rugosidade e perda de maciez e viço (HARRIS, 2009).

A Organização Mundial de Saúde indica o aumento da expectativa de vida da população, assim as pesquisas sobre o processo de envelhecimento cutâneo e a busca para o seu tratamento, prevenção e controle estão sendo bastante estimuladas, com ênfase nos ativos vegetais, especialmente metabólitos secundários, com a finalidade de serem incorporados em formulações cosméticas (DIEAMANT et al., 2012).

Os vegetais produzem os chamados metabólitos secundários, que apresentam grande variedade estrutural e, muitas vezes, apresentam atividade biológica, sendo estas características muito importantes para conferir propriedades diferenciadas. Estas substâncias são biossintetizadas nos vegetais a partir de precursores do metabolismo primário e são classificadas como alcaloides, terpenos, compostos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, dentre outras classes. Algumas substâncias de origem vegetal apresentam ação antioxidante como, por exemplo, as vitaminas C e E, taninos, flavonoides e outros compostos fenólicos (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993; SANDES; DI BLASI, 2000; SIMÕES et al., 2010).

A erva-baleeira, *Cordia verbenacea* DC., é um exemplo de planta com potencial uso como agente antioxidante. Pertence à família Boraginaceae, que contém aproximadamente 100 gêneros com mais de 2.000 espécies distribuídas pelo planeta, ocorrendo abundantemente no Brasil no trecho que compreende os estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Floresta Tropical Atlântica). É muito utilizada na medicina tradicional por apresentar ação anti-inflamatória. As espécies de *Cordia* tipicamente brasileiras são: *Cordia corymbosa* G. Don, utilizada no tratamento de feridas, *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult., com ação antifúngica, larvicida e utilizada no tratamento de dores de cabeça, resfriados, doenças parasitárias e cutâneas, *Cordia salicifolia* Cham., com atividades diurética, antiviral e utilizada no tratamento da obesidade e *Cordia verbenacea* DC., utilizada, principalmente, por sua ação anti-inflamatória (BARROSO et al., 2002).

Atualmente, os metabólitos secundários identificados na espécie *C. verbenacea* compreendem componentes do óleo essencial (OE), flavonoides, triterpenos, entre outros; dados recentes da literatura indicam atividade antioxidante do OE e de diferentes extratos de folhas de *C. verbenacea*, onde os extratos hidroetanólicos apresentaram maior ação antioxidante em modelos de captura/inibição radicalar (AMEIRA et al., 2009; DE CARVALHO JR. et al., 2004; LINS et al., 1990; MATIAS et al., 2010; MICHIELIN et al., 2011; VELDE et al., 1982).

Considerando o conhecimento etnofarmacológico sobre *C. verbenacea*, o Laboratório Farmacêutico Aché® desenvolveu em 2005 o medicamento fitoterápico Acheflan®, com ação anti-inflamatória, nas formas aerossol e creme. O derivado vegetal utilizado é o OE da *C. verbenacea*, tendo como marcador ativo (princípio ativo) o α -humuleno (monoterpeno). Além disto, esta espécie vegetal está presente na lista composta por 71 plantas com potencial terapêutico indicadas pelo Sistema Único de Saúde (RENISUS) para orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2009, 2011; PARISOTTO, 2011).

1.2 JUSTIFICATIVA

A análise dos dados da literatura demonstra ser a *C. verbenacea* uma importante espécie vegetal que apresenta, principalmente, ação anti-inflamatória, havendo um medicamento fitoterápico à base desta espécie com esta indicação, contudo é ainda pouco estudada do ponto de vista de sua ação antioxidante e fotoprotetora. Além disso, de maneira geral a sua composição química em relação aos seus metabólitos secundários não voláteis também foi pouco explorada, apesar do uso popular de “garrafadas” preparadas com as folhas em soluções hidroetanólicas.

Considerando-se a potencial utilização de produtos naturais com ação antioxidante, este estudo teve como proposta analisar a atividade antioxidante em sistemas modelo *in vitro* de importância biológica do extrato hidroetanólico 70 % de folhas de *C. verbenacea* e assim contribuir para o desenvolvimento de uma formulação com propriedade antioxidante, bem como gerar dados para outras aplicações relacionadas à ação antioxidante.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 *Cordia verbenacea* DC.

Em 1845 a *Cordia verbenacea* DC. (Figura 1) foi catalogada cientificamente pela primeira vez, porém 26 anos antes a *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schults foi identificada e, segundo algumas classificações, esses nomes botânicos referem-se à mesma espécie (RAMOS et al., 2005).

Figura 1 - *Cordia verbenacea* DC.



Nota: Fotografada por Juhan A. S. Pereira no CPQBA UNICAMP em Paulínia - SP.

Conhecida popularmente como catinga-de-barão, maria-preta e maria-milagrosa, sendo o nome mais comum erva-baleeira ou, simplesmente, baleeira, a *C. verbenacea* possui como sinônimas botânicas, além de *C. curassavica*, *Cordia salicina* DC., *Cordia cylindristachia* auctt. bras. Ex Fresen, *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* Kuntze e *Lithocardium verbaceum* Kuntze. É uma planta medicinal nativa do Brasil, encontrada principalmente no litoral de São Paulo à Santa Catarina (Floresta Tropical Atlântica). Também pode ser encontrada nas regiões subtropicais e tropicais do sul da África, América do Sul, Ásia, Austrália e Guiana (DE CARVALHO JR. et al., 2004; FICARRA et al., 1995).

Trata-se de um arbusto perene, medindo no máximo 3 m, com folhas firmes, sem brilho e com textura crespas; suas pequenas flores apresentam corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpioides e vistosas; e de suas partes aéreas desprende facilmente um forte odor apenas pelo manuseio. Pertence à família Boraginaceae que contém cerca de 100 gêneros, com mais de 2.000 espécies largamente distribuídas no território mundial (BARROSO et al., 2002; BAYEUX et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2002).

Foram realizados diversos estudos fitoquímicos com várias espécies do gênero *Cordia* que apresentaram uma complexa mistura de metabólitos secundários importantes como alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, triterpenos glicosilados, entre outros. Estudos fitoquímicos realizados com *C. verbenacea* identificaram os triterpenos cordialina A e B, as isoflavonas 7,4'-diidroxí-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidroxí-5'-metil isoflavona, além da artemetina (flavonol) que apresentou ação anti-inflamatória. O OE contém monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o α -pineno seu principal constituinte (29,7 %), além da presença de *trans*-cariofileno (25,3 %), aloaromadendreno (10,0 %) e α -humuleno (4,6 %) (AMEIRA et al., 2009; DE CARVALHO JR. et al., 2004; LINS et al., 1990; MATIAS et al., 2010; ROLDÃO, 2008; SÉRTIE et al., 1990; VELDE et al., 1982).

Como as folhas, partes aéreas e inflorescências mostraram ser fontes importantes de substâncias com atividades farmacológicas e são utilizadas na medicina popular na forma de “garrafadas” (extratos hidroetanólicos) e infusões como anti-inflamatório, no tratamento de úlceras gástricas, antirreumático, analgésico e em infecções (DE CARVALHO JR. et al., 2004; PASSOS et al., 2006; SERTIÉ et al., 1990).

Em 2005, o laboratório Aché[®] em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), desenvolveu o primeiro medicamento fitoterápico fabricado com tecnologia exclusivamente brasileira, o Acheflan[®]. Em sua formulação, na forma de creme ou aerossol, são utilizados 5,0 mg do óleo essencial de *C. verbenacea* (equivalente a 0,13 mg do monoterpeno α -humuleno). O medicamento é indicado para tratar tendinite crônica e dores miofasciais, se mostrando ser um potente anti-inflamatório. É exportado na forma de creme para os EUA como suplemento, pois devido à legislação americana não é considerado um medicamento fitoterápico (ACHÉ, 2015; PARISOTTO, 2011; SANTOS, 2010). Dez anos após o seu desenvolvimento, Perini et al. (2015) compararam o Acheflan[®] em forma de creme com duas pomadas cicatrizantes de colagenase e de fibrinolisina realizando testes em modelo de ferida por excisão cutânea em ratos. As análises histológicas demonstraram que o Acheflan[®] creme foi mais eficiente no processo de cicatrização. Os autores concluíram que tanto o Acheflan[®] creme quanto a pomada de colagenase obtiveram melhores resultados em relação à pomada de fibrinolisina.

Em 2009, o Ministério da Saúde criou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que se baseia em uma lista de 71 espécies vegetais, na qual a *C. verbenacea* foi incluída; tais espécies são utilizadas nos serviços de saúde municipais e estaduais, conhecidas tradicionalmente pela população e alguns estudos químicos e farmacológicos, visando avançar nas etapas da cadeia produtiva e geração de produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009). A *C. verbenacea* foi incluída, também, no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira em 2011, orientando a preparação de infusão com 3 g de folhas secas e 150 mL de água, e de pomada com extrato hidroetanólico, ambas com indicação como anti-inflamatório (BRASIL, 2011).

Dados recentes da literatura indicam a atividade antioxidante do OE e de diferentes extratos de folhas de *C. verbenacea*. O OE obtido por hidrodestilação e os extratos por meio de diferentes técnicas e com variações nas condições, incluindo extração por fluido supercrítico (dióxido de carbono com etanol e acetato de etila como co-solventes), extração com aparelho Soxhlet (hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol, acetona, água e misturas

hidroetanólicas) e maceração com etanol; este último extrato foi ainda submetido à partição líquido-líquido (hexano, diclorometano, acetato de etila e água). O maior teor de compostos fenólicos totais foi encontrado na fração acetato de etila da partição líquido-líquido, apresentando 358 mg/g (mg equivalente ao ácido gálico/g de extrato); porém, esta fração apresentou baixo rendimento (0,26 % m/m). Os melhores resultados combinando teor de fenólicos e rendimento foram observados para extratos obtidos por Soxhlet com solventes polares como etanol, água e soluções hidroetanólicas 25 e 50 % - 97, 111, 187 e 102 mg/g, respectivamente; o maior rendimento foi observado para o extrato obtido com etanol 50 % (24 % m/m). A fração acetato de etila do extrato etanólico e o extrato obtido por Soxhlet utilizando etanol 25 % apresentaram maior atividade antioxidante no teste com o radical DPPH• ($CE_{50} = 9,2 \pm 0,4$ e $27,4 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) (MICHIELIN et al., 2011). Considerando-se os resultados dos rendimentos das extrações dos teores de compostos fenólicos totais e dos ensaios de atividade antioxidante do estudo realizado por Michielin et al. (2011), os extratos hidroetanólicos das folhas de *C. verbenacea* foram os mais indicados como potenciais fontes de substâncias antioxidantes.

Na Tabela 1 estão reunidas informações sobre as atividades farmacológicas de derivados vegetais e metabólitos secundários de *C. verbenacea*.

Tabela 1 - Atividades farmacológicas de derivados vegetais e metabólitos secundários de *C. verbenacea*

Parte usada	Amostra	Atividade farmacológica	Referência
Folhas	OE, artemetina	Anti-inflamatória	SERTIÉ et al., 1990
	OE	Larvicida	SANTOS et al., 2006
	OE, α -humuleno e <i>trans</i> -cariofileno	Anti-inflamatória	PASSOS et al., 2006 MEDEIROS et al., 2007
	OE	Antibacteriana e antifúngica	RODRIGUES et al., 2012
	OE	Antifúngica	HOYOS et al., 2012
	EE 70 %	Anti-inflamatória (alta) e analgésica (baixa)	SERTIÉ et al., 2005
	EM, ácido rosmarínico	Antiedematogênica, anti-inflamatória, antimiotóxica e antiofídica	TICLI et al., 2005
	EM	Leishmanicida	BRAGA et al., 2007
	EE	Antiulcerogênica	ROLDÃO et al., 2008
	EFS, EE, EAE	Antibacteriana	MICHIELIN et al., 2009
	EH	Antibacteriana	MATIAS et al., 2010
	EE 25 %	Antioxidante	MICHIELIN et al., 2011
	EE 50 %	Antibacteriana	PINHO et al., 2012
	EFS	Antitumoral	PARISOTTO et al., 2012
	EM e EH	Antibacteriana	MATIAS et al., 2013
EE 95 % (FAE)	Antioxidante	SANTI et al., 2014	
Partes aéreas	EDM, EE	Antiedematogênica e anti-inflamatória*	BAYEUX et al., 2002
	OE	Antibacteriana	DE CARVALHO JR. et al., 2004 MECCIA et al., 2009

*Atividade avaliada apenas do EE.

EAE: extrato acetato etílico; EDM: extrato diclorometânico; EE: extrato etanólico; EFS: extrato fluído supercrítico; EH: extrato hexânico; EM: extrato metanólico; FAE: fração acetato etílica; OE: óleo essencial.

1.3.2 Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre (ERO, ERN e ERS)

Apesar da molécula de oxigênio ser altamente reativa em reações de combustão a altas temperaturas, é relativamente inerte na temperatura corporal, sendo essencial para a vida dos organismos aeróbicos. Aproximadamente 90 % do consumo de oxigênio nestes organismos está relacionado à fosforilação oxidativa e os outros 10 %, usados por enzimas, principalmente para reações de hidroxilação e oxigenação. Menos de 1 % do O₂ é convertido nas espécies reativas de oxigênio (ERO) (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

As ERO são muito importantes na regulação metabólica e nas defesas imunológicas contra infecções, porém podem causar severos danos em biomoléculas nos tecidos, consequência do estresse oxidativo que ocorre quando sua geração excede a capacidade de defesa antioxidante do organismo contra essas espécies reativas. O termo ERO refere-se à ocorrência natural de espécies químicas que contenham oxigênio das quais sua reatividade é maior do que o oxigênio no seu estado fundamental (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2010).

Outro termo altamente correlacionado com as ERO são os radicais livres que, por definição, são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados e são capazes de existirem independentemente. O oxigênio no seu estado fundamental é considerado um radical livre ou um dirradical em temperatura corporal. Suas espécies reativas são formas parcialmente reduzidas do oxigênio, as quais geram como primeiro produto o ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que por sua vez é reduzido à hidroperóxido (O_2^{-2}), na forma de H_2O_2 , que também é reduzido causando uma quebra homolítica, liberando o radical hidroxila (HO^{\cdot}) e o íon hidróxido (HO^-), tendo a água como produto final da redução completa do dirradical O_2 (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2010; MATTILA et al., 2015).

As espécies reativas em sistemas biológicos são em geral derivadas de três elementos, do oxigênio, nitrogênio e enxofre (ERO, ERN e ERS, respectivamente). Essas espécies reativas podem ser divididas em dois grupos, as radicalares e as não radicalares, que também apresentam alta reatividade. Dentre as ERO radicalares mais importantes estão os radicais: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (ROO^{\cdot}), alcoxila (RO^{\cdot}); e espécies não radicalares, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxigênio singlete (1O_2); as ERN tais como o radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$); e as ERS são facilmente formadas em reações das ERO com tiois. Essas espécies reativas podem ser geradas por muitos processos de oxidação em sistemas biológicos e apresentam diferenças entre si, principalmente, quanto a sua natureza, geração, reatividade e destino (ARAÚJO, 2008; DURACKOVÁ, 2010; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; LÜ et al., 2010; MATTILA et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2007).

Mattila et al. (2015) complementaram a classificação das espécies radicalares e não radicalares por ERO livres, que representam pequenas moléculas compostas apenas por oxigênio e hidrogênio, e por ERO incorporadas, nas quais o oxigênio é ligado a outras

moléculas para formar derivações reativas de oxigênio. A Tabela 2 representa as principais espécies reativas radicalares e não radicalares livres e incorporadas.

Tabela 2 - Classificações das ERO e ERN.

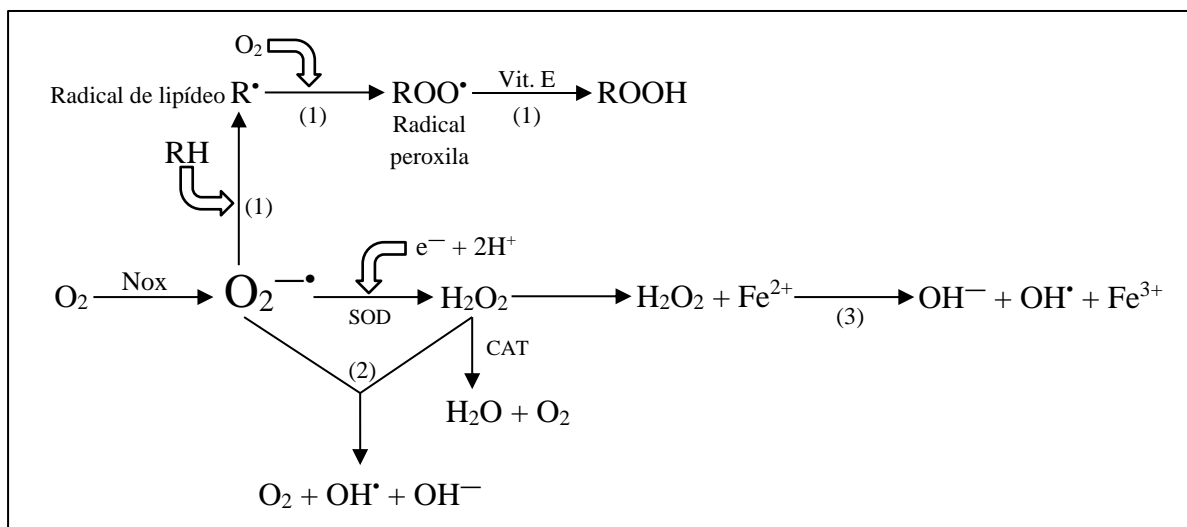
Espécies reativas radicalares	Espécies reativas não radicalares
ERO livres	
Ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Radical hidroxila (HO^{\cdot})	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)
Radical peridroxila (HO_2^{\cdot})	Oxigênio singlete (1O_2)
	Ozônio (O_3)
ERO incorporadas	
Radical alcoxila (RO^{\cdot})	Peróxidos orgânicos (ROOH)
Radical peroxila (ROO^{\cdot})	
ERN	
Dióxido de nitrogênio (NO_2^{\cdot})	Alquil peroxinitrito (ROONO)
Óxido nítrico (NO^{\cdot})	Ânion peróxinitrito ($ONOO^-$)

Fonte: Halliwell e Gutteridge (2010) e Mattila et al. (2015).

Embora o excesso na produção de ERO seja bastante prejudicial ao organismo, em baixos níveis estas espécies são usadas pelas células como um sinal que reflete a hipóxia, isto é, suprimento insuficiente de oxigênio, desencadeando reações de ajustes metabólicos (NELSON; COX, 2014).

Em relação as ERO, as reações envolvidas na sua produção estão representadas na Figura 2. *In vivo*, o $O_2^{\cdot-}$ é gerado na cadeira de transporte de elétrons pela coenzima Q ou ubiquinona, ou pela via das oxidases como NADPH oxidase neutrofílica (Nox), sendo extremamente reativo, podendo reagir com muitas moléculas para gerar outras ERO diretamente, por via enzimática ou processos catalisados por metais. O $O_2^{\cdot-}$ pode se tornar menos tóxico através da reação de dismutação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), gerando o H_2O_2 (reação de Haber-Weiss) e, finalmente, o H_2O_2 em água em reação catalizada pela catalase (CAT). A reação de Fenton pode ocorrer se o H_2O_2 reagir com um catalisador de ferro como Fe^{2+} , formando o HO^{\cdot} (FLORA, 2009).

Figura 2 - Reações envolvendo a formação das ERO.



Fonte: Adaptado de Carocho e Ferreira (2013), Ferreira et al. (2009) e Flora (2009).

(1) Lipoperoxidação; (2) reações de Haber-Weiss; (3) reações de Fenton; (Nox) NADPH oxidase neutrofílica; (SOD) enzima superóxido dismutase; (CAT) enzima catalase.

Quanto às ERN, o mecanismo de formação de ONOO^- é dado pela reação entre NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet -}$. Finalmente, as ERS derivam de tiois sob condições oxidativas para formarem dissulfetos e, uma reação com um tiol reduzido, pode gerar ácido sulfínico e sulfênico (GILES; TASKER; JACOB, 2001; SQUADRITO; PRYOR, 1998).

A seguir estão descritas e caracterizadas as principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

1.3.2.1 Ânion radicalar superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$) e radical hidroperoxila (HO_2^\bullet)

O radical $\text{O}_2^{\bullet -}$ é altamente reativo e é produzido em muitas reações e atividades biológicas, a partir da redução monoelétrica do O_2 e desencadeia a produção das outras ERO, como o HO^\bullet , que possui reatividade ainda maior. A interação dessas ERO com ácidos nucleicos, enzimas, lipídeos de membranas e proteínas podem provocar sérios danos. Nas mitocôndrias ativas, cerca de 0,1 a 4 % do oxigênio utilizado na respiração forma o $\text{O}_2^{\bullet -}$ em quantidade suficiente para ter efeitos letais, porém isso não acontece por ele ser rapidamente removido dos tecidos pelos mecanismos de defesa antioxidante do organismo (MATTLA et al., 2015; NELSON; COX, 2014).

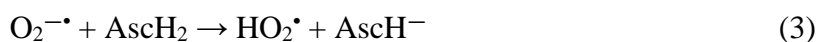
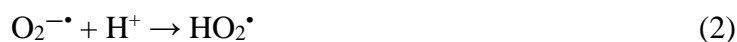
O $\text{O}_2^{\bullet -}$ pode induzir o dano oxidativo nas células; para impedir esse processo as células possuem isoenzimas da SOD, que catalisam a reação de dismutação, na qual os produtos

gerados são peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (reação 1) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; NELSON; COX, 2014).



Apesar dos danos causados pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$, para os fagócitos, na defesa contra microrganismos, sua função se torna essencial, onde é formado pela ativação da NADPH oxidase que está presente na membrana destas células (DIAZ et al., 1998).

Em pH 7,0, apenas 0,25 % do $\text{O}_2^{\cdot-}$ sofre protonação, formando um oxidante mais forte, o HO_2^{\cdot} , que atravessa mais facilmente as membranas biológicas. O $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode ser protonado pela reação com próton ou um doador de próton, como o ácido ascórbico (Asc) (reações 2 e 3, respectivamente).



1.3.2.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Apresenta reatividade intermediária em relação ao $\text{O}_2^{\cdot-}$ e HO^{\cdot} e, por ser uma molécula pequena, atravessa ativamente as membranas celulares, gerando o radical HOO^{\cdot} . O H_2O_2 é formado através da redução do O_2 por dois elétrons. Nos neutrófilos, que tem como função proteger e reparar os tecidos, a enzima mieloperoxidase (MPO) (EC 1.11.1.7) catalisa a reação do H_2O_2 com Cl^- , produzindo outra ERO, o ácido hipocloroso (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; NELSON; COX, 2014).

Em altas concentrações, o H_2O_2 tem ação bactericida, podendo ser utilizado como substrato das catalases ou peroxidases intracelulares e na ausência ou deficiência delas, essa ERO apresenta citotoxicidade. A redução do H_2O_2 por peroxidases é um dos principais mecanismos sequestrantes para esta espécie reativa (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; MATTILA et al., 2015).

1.3.2.3 Radical hidroxila (HO^{\cdot})

Dentre as ERO, o HO^{\cdot} é o que apresenta maior reatividade e o maior potencial deletério ao organismo. Sua meia-vida, determinada através do tempo de colisão com uma biomolécula-

alvo, é de ordem de nanossegundos. Possui um elétron desemparelhado e é capaz de aceitar um elétron de quase qualquer molécula e de sua vizinhança (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; CODORNIU-HERNÁNDEZ, KUSALIK, 2012).

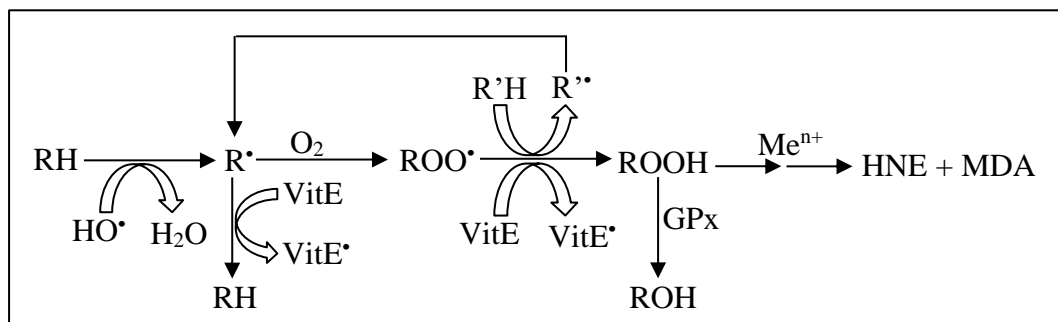
É formado nas reações entre o H_2O_2 e o $\text{O}_2^{\cdot-}$, reação proposta por Haber-Weiss (reação 4) e entre H_2O_2 e metais de transição, como ferro, por exemplo, sendo denominada reação de Fenton (reação 5). A reação 4 em meio aquoso apresenta uma velocidade próxima de zero, contudo na presença de algum íon de metal redox ativo (Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ti^{3+}) a sua velocidade aumenta de maneira significativa, causando danos oxidativos em biomoléculas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BAYNES; DOMINICZAK, 2015; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).



Primeiramente, esse radical reage com as biomoléculas por reações de abstração e adição do hidrogênio, formando produtos característicos denominados biomarcadores de estresse oxidativo. A membrana celular é o principal alvo dos radicais livres por ser rica em ácidos graxos poli-insaturados (*PUFA*, *poly unsaturated fatty acids*) que podem ser rapidamente oxidados. Esse dano peroxidativo afeta a funcionalidade e integridade das membranas, impossibilitando a célula de manter gradientes iônicos e produzindo assimetria na membrana fosfolipídica (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

As reações em cadeia da peroxidação lipídica ou lipoperoxidação iniciam-se quando o HO^{\cdot} abstrai um átomo de hidrogênio de um *PUFA* (Figura 3). Os produtos de oxidação secundários (radicais de peroxila de lipídeos e peróxidos de lipídeos), se degradam formando outros produtos característicos reativos como o 4-hidroxinonenal (HNE) e o dialdeído malônico (MDA), que reagem com proteínas gerando os produtos finais da lipo-oxidação avançada. Além dessas reações, o HO^{\cdot} pode reagir por adição a ácidos nucleicos, fenilalanina e tirosina, formando compostos hidroxilados característicos e ligações cruzadas. Estas reações com os aminoácidos que compõem as proteínas podem comprometer a atividade enzimática, o transporte ativo das membranas celulares, causando a morte celular devido a possíveis clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; BERGER et al., 1999).

Figura 3 - Via de lipoperoxidação.



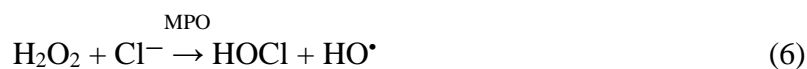
Fonte: Adaptado de Baynes e Dominiczak (2015).

RH: ácido graxo poli-insaturado; R'H: compostos doadores de elétrons ou átomo de H; R•: radical de lipídeo; ROO•: radical peroxila; ROOH: peróxido de lipídeo; ROH: álcool de lipídeo; GPx: glutatona peroxidase; Meⁿ⁺: metal catiônico; HNE: 4-hidroxinonenal; MDA: dialdeído malônico.

A Figura 3 demonstra como HO• ataca os *PUFA* formando um R• no carbono, que reage com o O₂ do meio e forma um ROO•, que já abstrai um hidrogênio de um lipídeo vizinho, formando ROOH e desencadeando reações em cadeia; isso ocorre até que acabe o suprimento de *PUFA*. A vitamina E é o principal agente antioxidante que cessa a reação em cadeia nas membranas, neutralizando o ciclo de reações da lipoperoxidação. Os ROOH podem ser reduzidos pela glutatona peroxidase (GPx), formando ROH inertes ou se decompor a variadas “espécies carbonila reativas” como o HNE e MDA, que reagem com proteínas, formando os biomarcadores do estresse oxidativo (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

1.3.2.4 Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é produzido nos neutrófilos quando íons Cl⁻ são oxidados pela enzima MPO na presença de H₂O₂ (reação 6). Essa enzima, uma hemoproteína presente nos neutrófilos e também encontrada em monócitos, é a única da classe das peroxidases que possui a propriedade de catalisar a conversão do H₂O₂ à HOCl. Este, por sua vez, é um poderoso oxidante, com potente ação antimicrobiana. Por ser extremamente reativo, também oxida outras biomoléculas, provocando muitos danos celulares (BAYNES; DOMINICZAK, 2015; HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; WINTERBOURN; KETTLE, 1994; ZUURBIER et. al., 1992).



Essa ERO é formada no processo inflamatório quando neutrófilos se infiltram nos tecidos, são ativados e formam o fagossoma. Um total de 5 X 10⁶ dos neutrófilos humanos

ativos em 1 mL, produzem, aproximadamente, 88,0 μM de HOCl em 2 h, podendo atacar diversas biomoléculas de microorganismos ou mesmo do tecido adjacente (KALYANARAMAN; SOHNLE, 1985; WEISS, 1989).

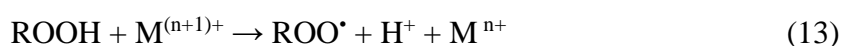
1.3.2.5 Radical peroxila (ROO^\bullet) e alcóxila (RO^\bullet)

O radical ROO^\bullet apresenta a maior meia-vida das ERO, aproximadamente 7 s, enquanto que o radical RO^\bullet apresenta 1 μs ; são mais conhecidas como produtos da lipoperoxidação, na qual há a decomposição de peróxidos orgânicos e reações de carbono radicalar com oxigênio. Outras ERO, principalmente, $^1\text{O}_2$ e HO^\bullet são as precursoras para a sua formação (MATTILA et al., 2015; VALKO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007).

Com o aparecimento do radical ROO^\bullet ocorre a formação de um radical RO^\bullet e hidroperóxidos de lipídeos (ROOH). As reações a seguir (reações 7 – 14) demonstram a formação dessas espécies reativas (MATTILA et al., 2015).



Na reação (7) ocorre o início do processo onde aparecem os radicais de lipídeos e na (8), a adição de uma molécula de oxigênio no radical de carbono (R^\bullet), formando o radical ROO^\bullet . Após (reação 9), este radical gerado abstrai um átomo de hidrogênio de outra molécula de lipídeo, como ocorre na reação (7). A reação (9) é conhecida como a reação que desencadeia a propagação, pois ela fornece os radicais de carbono para a reação (8) e leva a acumulação de ROOH que pode ser decomposto espontaneamente em condições críticas como, por exemplo, altas temperaturas, ou através da oxidação ou redução de metais de transição, ou interações com radicais (reações 10 - 14) (MATTILA et al., 2015).



1.3.2.6 Oxigênio singlete (1O_2)

A molécula de oxigênio no seu estado fundamental é um triplete (3O_2) que pode aceitar dois elétrons de um outro composto, e o 1O_2 é o primeiro estado eletronicamente excitado desta molécula, onde há a inversão do spin do elétron no orbital antiligante. A diferença entre essa ERO e o oxigênio molecular está na ausência de restrição na transferência de elétrons, sendo altamente reativo. Sua formação pode ocorrer através da reação entre H_2O_2 e HOCl ou pela dismutação espontânea do $O_2^{\cdot-}$ (BECKMAN; AMES, 1998; MATTILA et al., 2015).

Pode causar danos nas proteínas pela oxidação dos aminoácidos, principalmente da histidina, metionina e triptofano e, também, dar início ao processo de lipoperoxidação, produzindo os ROO^{\cdot} e RO^{\cdot} (BRADLEY; MIN, 1992; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

1.3.3 Estresse oxidativo

Por definição, a condição bioquímica na qual há desequilíbrio entre a presença de níveis relativamente altos de espécies reativas e a insuficiência de mecanismos de defesas antioxidante do organismo, é denominada estresse oxidativo que causa danos em biomoléculas, em especial, nas proteínas, lipídeos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; NELSON; COX, 2014).

Sendo um processo bastante complexo, o impacto do estresse oxidativo no organismo depende de alguns fatores como o tipo de oxidante, o local e intensidade de sua produção, a composição e atividade de vários antioxidantes e a habilidade dos sistemas de defesa antioxidante (DURACKOVÁ, 2007).

As células do organismo estão constantemente expostas às ERO e ERN que podem ser geradas tanto por fontes endógenas como exógenas. A radiação γ e UV, ultrassom, alimentos, drogas, poluentes, toxinas e xenobióticos são geradores exógenos enquanto que a atividade de determinadas células (neutrófilos), enzimas produtoras de ERN (NO sintase e xantina oxidase), metabolismo oxidativo (mitocôndria) e doenças são geradores endógenos. As fontes exógenas estão diretamente relacionadas com as fontes endógenas, uma vez que a primeira pode ser causa e a segunda, consequência (KOHEN; GATI, 2000).

Os principais alvos de oxidação das ERO são os ácidos graxos poli-insaturados, principalmente para o $O_2^{\cdot-}$, o HO^{\cdot} e ROO^{\cdot} , que são potentes iniciadores da lipoperoxidação e estão diretamente relacionados à patogênese de um conjunto vasto de doenças. Uma vez iniciada a lipoperoxidação, é gerada uma cascata de reações simultâneas que, também, podem levar à morte de células neuronais. O sistema nervoso central é extremamente sensível a essas

espécies reativas por apresentar uma capacidade antioxidante relativamente pequena. A sobrecarga oxidativa no microambiente neuronal causa oxidação dos lipídeos, proteínas e DNA que geram produtos como álcoois, aldeídos, cetonas e óxidos de colesterol que, em sua maioria, também são tóxicos aos linfócitos e macrófagos, prejudicando o sistema de defesa (CHERUBINI et al., 2005; FERRARI, 2000; RAHAL et al., 2014).

Alguns marcadores do estresse oxidativo como MDA e antioxidantes endógenos, como metaloenzimas (Cu, Zn-SOD) e glutathiona peroxidase dependente de selênio (GSHPx) são considerados muito importantes. O MDA é um composto de três carbonos formado pela peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente do ácido araquidônico, um dos produtos finais de lipoperoxidação e decomposição da membrana. Em várias patologias é observado o aumento do nível de MDA quando há excesso de ERO, sendo possível a correlação entre o estresse e os danos causados. A Cu, Zn-SOD é uma enzima intracelular encontrada em todas as células aeróbias e sua atividade depende das reservas de cobre e zinco dos tecidos. Através dela ocorre a dismutação do ânion radicalar superóxido em uma espécie menos tóxica, o peróxido de hidrogênio. A GSHPx é uma enzima intracelular encontrada em muitas células de mamíferos que pode metabolizar o H_2O_2 e hidroperóxidos de lipídeos (RAHAL et al., 2014).

As ERO estão envolvidas diretamente em patologias como doença de Alzheimer, esclerose múltipla, mal de Parkinson, câncer, síndrome de Down, entre outras. No processo de envelhecimento o estresse oxidativo é consequência do desacoplamento das reações de transporte de elétrons e da elevação e acúmulo dos níveis de metais o que causa aumento das oxidações biomoleculares, como as proteínas, alterando a homeostase celular ou até mesmo levando à apoptose celular (DURACKOVÁ, 2010; FINKEL; HOLBROOK, 2000; NIKI et al., 2010; RODRIGUES, 2007; SALGANIK, 2001; VALKO et al., 2006).

Dados da literatura demonstraram a interdependência entre estresse oxidativo, sistema imunológico e inflamação. O processo de envelhecimento é um dos melhores exemplos dos efeitos e alteração da homeostase, uma vez que é acompanhado da deterioração dos sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imune. As mudanças nas funções imunológicas relacionadas ao envelhecimento são originadas nos processos de estresse oxidativo e/ou inflamatório (PIZZA et al., 2013).

Os fagócitos, pertencentes ao sistema imune celular, são ativados para produzir defesa antimicrobiana e atuam produzindo espécies reativas, sendo responsáveis por manter a homeostase entre a produção e eliminação das ERO. Os neutrófilos atuam de maneira efetiva sobre a inflamação, respondendo a estímulos quimiotáticos. Após estímulo, ocorrem outros eventos como rolamento, adesão e transmigração sob mediação de moléculas de adesão

presentes nas superfícies de células endoteliais dos leucócitos. A integridade do sistema vascular pode ser alterada pelo estresse oxidativo e as ERO em excesso, principalmente o $O_2^{\cdot-}$, estão entre os principais contribuintes para a disfunção endotelial, que ocasiona o comprometimento da parede vascular, promovendo a oxidação de proteínas e lipídeos (KEANEY JR.; LOSCALZO, 1999; WOLIN, 2000).

O comprometimento do endotélio vascular, que tem a função de manter a homeostase e regular o tônus vascular, pode estar associado a várias patologias como aterosclerose, diabetes e hipertensão (BARBIOR, 1984; GLASSER; SELWYN; GANZ, 1996; JOHNSTONE et al., 1993; SPERTINI et al., 1991; TADDEI et al., 1997).

As substâncias chamadas de pró-oxidantes, podendo ser endobióticas ou xenobióticas, induzem o estresse oxidativo tanto pelo aumento na geração de ERO quanto pela inibição dos sistemas antioxidantes. Podem ser fármacos, metais de transição, pesticidas, vitaminas como o ácido ascórbico, as ERO e, também, podem ser geradas por atividade física, ansiedade mental e fatores ambientais. A estrutura dessas moléculas também influencia na atividade pró-oxidante, por exemplo, quanto mais substituições hidroxilas apresentar, maior será a sua atividade (RAHAL et. al, 2014).

De acordo com Kohen (1993), o organismo está constantemente exposto ao estresse oxidativo de diferentes origens e isso o levou a desenvolver mecanismos de defesa para proteção antioxidativa contra os metabólitos reativos. Os mecanismos envolvidos são os reparadores (enzimas reparadoras de DNA), os preventivos (prevenção de produção de ERO por quelação de metais), de defesas físicas (estabilização de sítios biológicos, interferência estérica) e de defesa antioxidante.

1.3.4 Antioxidantes

As pesquisas relacionadas à atividade antioxidante têm se voltado aos produtos naturais em função de seus variados benefícios à saúde e, também, de possíveis problemas relacionados ao consumo de antioxidantes sintéticos. Em ambos os casos, a sua utilização na dieta é um mecanismo de defesa contra as ERO e ERN; a indústria de alimentos, bebidas, cosmética e até a medicina têm utilizado esse recurso, uma vez que os próprios medicamentos também podem aumentar a produção dessas espécies reativas no organismo. O estresse oxidativo tem relação direta com a gênese e a evolução de patologias como câncer, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas, e no processo de envelhecimento. Em vista disto, a busca por moléculas antioxidantes, principalmente derivadas de produtos naturais, têm aumentado

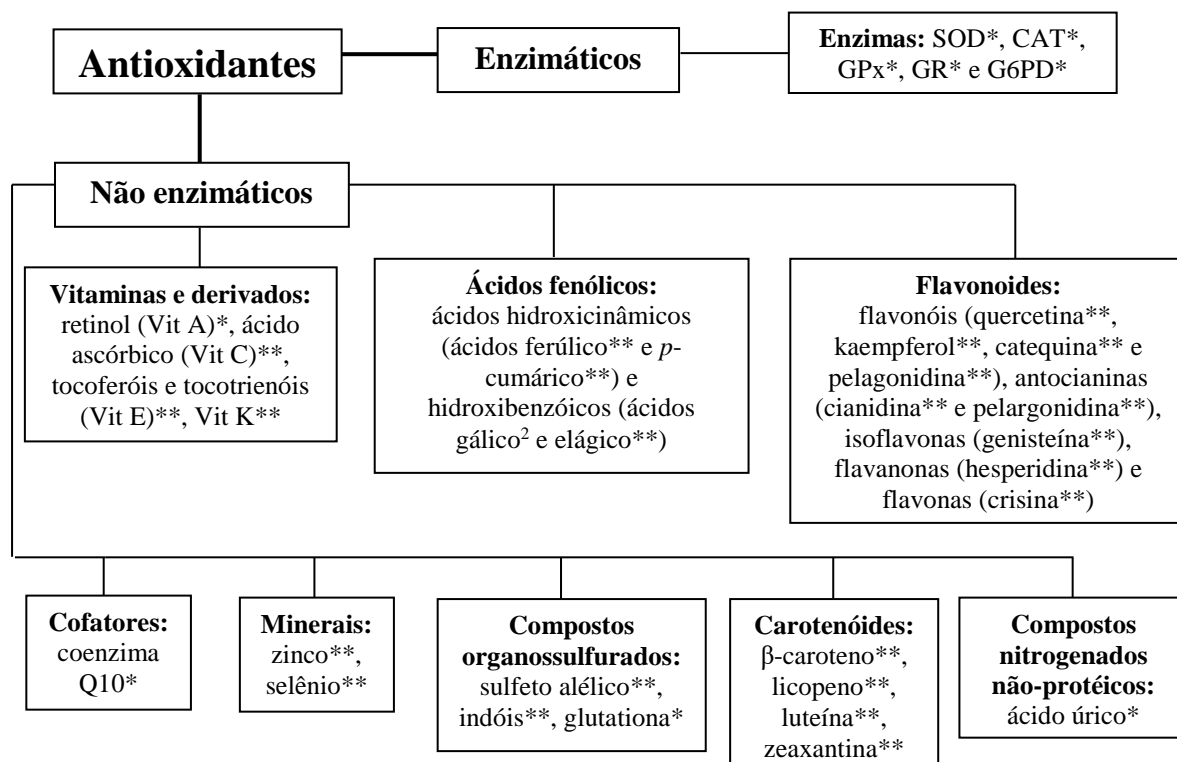
consideravelmente (ALAM; BRISTI; RAFIQUZZAMAN, 2013; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010; RAHMAN, 2007; SOARES, 2002).

Segundo a definição de Halliwell e Gutteridge (1995), substâncias antioxidantes são quaisquer compostos que, em baixa concentração comparados a do substrato oxidável, atrasam ou inibem, significativamente, a oxidação deste substrato. Após 12 anos, Halliwell (2007) as definiu como qualquer substância que atrasa, previne ou elimina o dano oxidativo a uma molécula-alvo e, no mesmo ano, Khlebnikov et al. (2007) definiram os antioxidantes como qualquer substância que sequestre ou elimine a produção das ERO, ou que aja indiretamente para regular as defesas antioxidantes.

Um bom antioxidante deve, após sequestrar o radical, formar um novo radical que seja estável e, também, deve apresentar substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical em função do seu potencial de redução, ter capacidade de deslocar o elétron desemparelhado em sua estrutura, quelar metais de transição presentes no processo oxidativo e ter acesso ao local de ação o que dependerá de sua polaridade e seu coeficiente de partição (HALLIWELL, 1990; MANACH et al. 2004).

As defesas antioxidantes do organismo podem ser enzimáticas e não enzimáticas (Figura 4). A CAT, glutatona peroxidase (GPx) e SOD são as principais defesas antioxidantes enzimáticas uma vez que pelas reações que catalisam, convertem as ERO em moléculas mais estáveis, como a água e oxigênio, enquanto que compostos de origem exógena adquiridos por meio da dieta, são considerados antioxidantes não enzimáticos. Nesta categoria estão incluídos carotenoides, compostos fenólicos, produtos sintéticos, quelantes e vitaminas, como tocoferóis e ascorbato, que bloqueiam e previnem o estresse oxidativo pela captura (“inibição”) das espécies reativas. No organismo, há sistemas específicos de reparo do DNA dependentes de fatores ambientais e genéticos que são constituídos por proteases e fosfolipases (ABDALLA; FAINE, 2008; KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997; RAHAL et. Al., 2014; RAHMAN, 2007).

Figura 4 - Antioxidantes naturais separados em classes.



Fonte: Adaptado de Carochó e Ferreira (2013), Godman et al. (2011), Pietta (2000) e Ratnam et al. (2006). Antioxidantes *endógenos e **exógenos; (CAT) catalase; (GR) glutatona redutase; (GPx) glutatona peroxidase; (G6PD) glicose 6-fosfato desidrogenase; (SOD) superóxido dismutase.

Os antioxidantes atuam no organismo por diversos mecanismos que incluem a inibição de formação de radicais livres de lipídeos; a interrupção de reações em cadeia da auto-oxidação; a supressão do $^1\text{O}_2$; o sinergismo com outras substâncias antioxidantes; a conversão de hidroperóxido em compostos estáveis atuando como agentes redutores; a ativação das enzimas antioxidantes, como a SOD; a inibição de enzimas pró-oxidantes e através da conversão de metais pró-oxidantes em produtos estáveis por agentes quelantes de metais (DARMANYAN et al., 1998; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; KANCHEVA, 2009; KOHEN; FANBERSTEIN; TIROSH, 1997; MIN; BOFF, 2002; POKORNÝ, 2007).

1.3.5 Extratos vegetais e atividade antioxidante

Há mais de vinte anos, as pesquisas com antioxidantes obtidos de produtos naturais ganharam importância em vista da necessidade de substituição parcial ou total de antioxidantes sintéticos devido ao seu potencial carcinogênico e de outras patologias. Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de diversas partes dos vegetais, como cascas, folhas, frutos,

sementes, raízes, entre outros (ANDREO; JORGE, 2006; CHEN; PEARSON; GRAY 1992; KAHL, 1984).

Devido a formação de radicais livres, das ERO e de pró-oxidantes por fontes endógenas e exógenas, os tecidos vegetais sofrem estresse oxidativo e desenvolvem sistemas de defesas antioxidantes que incluem substâncias como ácidos fenólicos, carotenoides, flavonoides, tocoferóis, entre outras. Dados da literatura demonstraram que os compostos fenólicos são as principais fontes de substâncias que apresentam propriedades antioxidantes (ATOUI et al., 2005; KÄHKÖNEN et al., 1999; OZSOY; CANDOKEN; AKEV, 2009).

A extração de compostos bioativos pode ser feita por vários métodos como infusão, decocção, digestão, percolação, por Soxhlet, ultrassom, fluido supercrítico, dentre outras. A eficiência da extração desses compostos dependerá do tipo de método utilizado e, também, da natureza e tamanho das partículas do material vegetal, do tipo de solvente, da taxa de difusão do solvente através do material vegetal, da solubilização dos constituintes e da sua difusão para o exterior do material insolúvel, do tempo e da temperatura de extração (HANDA et al., 2008; OLIVEIRA; AKISUE, 2009).

Para a extração a partir de plantas medicinais, a infusão, maceração e percolação são os métodos mais empregados, com o objetivo de obter a porção ativa e eliminar o material inerte através de um solvente seletivo. Em relação a maceração é possível otimizá-la, ou seja, tornar o processo extrativo mais eficiente, empregando maceração de 2 ou 3 etapas, utilizando aquecimento e/ou agitação (HANDA et al., 2008).

A extração utilizando como solvente etanol ou solução hidroetanólica para se obter o extrato seco é considerada um método adequado para a análise químico-farmacológica. Comparando-se os extratos extremamente polares (aquosos) e extremamente apolares (hexânicos ou etílicos) com os de polaridade intermediária (etanólicos, hidroetanólicos e metanólicos), os extratos que apresentam polaridades mais altas ou baixas tendem a apresentar menor atividade biológica. Isso ocorre provavelmente devido à permeabilidade de membrana e metabolismo, no qual o balanceamento entre a lipofilicidade e a hidrofiliabilidade é importante para a afinidade de substâncias aos receptores biológicos (BRITO, 1996; CECHINEL; FILHO; YUNES, 1998; FERRI, 1996).

Soluções metanólicas ou hidroetanólicas 80 % apresentam algum grau de solubilidade para a grande maioria dos constituintes de interesse para análise fitoquímica, sendo frequentemente empregadas nos processos extrativos. Além dos fatores relacionados à eficiência do processo extrativo, também deve ser considerado a toxicidade, os riscos, a disponibilidade e custo do solvente e a estabilidade das substâncias extraídas (FALKEMBERG;

SANTOS; SIMÕES, 2007). Pelos vários relatos presentes na literatura e da experiência de seu grupo de pesquisa, Calixto (2001) evidenciou que, para a maioria das plantas, o processo de maceração prolongado a frio utilizando etanol-água (70:30 ou 50:50, v/v) extrai diferentes compostos ativos de diferentes polaridades.

Em estudo de Majhenic, Skerget e Knez (2007) foi possível observar que o extrato hidroetanólico 60 % de sementes de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.) obteve a maior atividade antioxidante comparado aos outros extratos aquoso, metanólico e hidroacetônico 35 %, pelos métodos de captura do radical DPPH[•] e sistema β -caroteno/ácido linoléico. Em outro estudo realizado por Martins et al. (2016), utilizando extratos hidrometanólicos 80 % das sementes de anis (*Pimpinella anisum* L.) e coentro (*Coriandrum sativum* L.), pertencentes a mesma família, foi comparado o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelos métodos de captura do radical DPPH[•], descolorimento do β -caroteno, entre outros. Em todos os ensaios realizados, o extrato hidrometanólico de sementes de anis apresentou maior teor de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante.

A atividade antioxidante do extrato hidrometanólico 80 % das folhas e botões de flores de *Cistus salviifolius* L. foi avaliada por Euch, Bouajila e Bouzouita (2015) pelos métodos de captura do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} e poder redutor do ferro (FRAP), além da quantificação de teor de compostos fenólicos, flavonoides, taninos e antocianidinas totais. O extrato hidrometanólico das flores apresentou melhores resultados quanto a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, enquanto o extrato das folhas obteve melhores resultados para os teores de antocianidinas e taninos totais.

O extrato etanólico de folhas *Pterygota alata* Roxb. e suas frações obtidas por partição líquido-líquido utilizando n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e água foram submetidos a testes antioxidantes pela captura do radical DPPH[•], FRAP e capacidade antioxidante total, além da quantificação do teor de flavonoides e compostos fenólicos totais. Jahan et al. (2014) observaram que, dentre essas amostras, a fração de clorofórmio obteve os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides, como também maior atividade antioxidante.

Em outro estudo, sete espécies de plantas entre extratos de suas folhas e frutas foram avaliadas em relação ao teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método de captura do radical ABTS^{•+} e FRAP. Teleszko e Wodjylo (2015) constaram que os extratos das folhas obtiveram resultados bastante significativos de teor de fenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante em comparação com os extratos das frutas.

O extrato hidroetanólico 70 % de folhas de *Lactuca sativa* L. (alface) foi avaliado por Harsha, Anilakuman e Mithila (2013) por sua capacidade de capturar os radicais DPPH[•], O₂^{-•},

HO• e NO•. Para todos os testes o extrato foi capaz de capturar a espécie reativa, porém apresentou melhor resultado para a captura do O₂^{-•}.

Arunachalam e Parimelazhagan (2014) avaliaram a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos das folhas, cascas e frutos de *Cordia alliodora* (Clarke) Gamble obtidos por ultrassom durante 60 min. Para todos os ensaios realizados referentes à atividade antioxidante (DPPH•, HO• e descolorimento do β-caroteno) e ao teor de compostos fenólicos totais, o extrato das folhas apresentou melhores resultados comparado aos extratos das cascas e frutos.

Através dos vários relatos presentes na literatura é possível observar uma correlação entre o teor de compostos fenólicos numa determinada planta ou extrato e sua atividade antioxidante. Na maioria dos casos relatados, quanto maior é a quantidade desses compostos maior é a sua atividade antioxidante.

1.3.6 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um processo biológico caracterizado como uma deterioração progressiva, dependente do tempo e associada à redução da homeostase molecular e celular que desencadeia alterações orgânicas e a diminuição da capacidade dos órgãos de executar funções normais, podendo causar patologias ou, até mesmo, a morte (MOI, 2004).

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo cerca de 15 % do peso corporal, que protege, reveste e delimita organismo. Este importante órgão faz parte do sistema tegumentar que está sujeito a alterações que caracterizam o envelhecimento; a produção de moléculas de adesão celular desencadeia muitas reações consecutivas que podem levar a processos inflamatórios e à produção das ERO, que são as principais causadoras do envelhecimento cutâneo (SCHNEIDER, 2009).

Dois fatores estão envolvidos no processo de envelhecimento da pele, intrínseco ou cronológico e extrínseco ou fotoenvelhecimento. Cerca de 80 % dos sinais de envelhecimento visíveis, como aumento de rugas, espessamento de camada exterior da pele - a epiderme, perda de firmeza e elasticidade, são provocados pelas radiações ultravioleta (UV) e, conseqüentemente, pelos radicais livres e espécies reativas, que atuam como bases, abstraindo átomos de hidrogênio como nucleófilos, e substituindo outros grupos como radicais, adicionando-se a sistemas insaturados. Em ambos os fatores são observados a formação de radicais livres e espécies reativas (HARRIS, 2009; MAGALHÃES, 2000; SCOTTI; VELASCO, 2003).

O envelhecimento cutâneo intrínseco é causado por fatores genéticos que podem ser agravados por fatores neuro-hormonais e está diretamente relacionado ao desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante do organismo e, além disso, os fibroblastos e queratinócitos, que são as células responsáveis pelas propriedades elásticas e de sustentação, se proliferam mais lentamente causando a redução de produção de colágeno e, conseqüentemente, da regeneração celular e da elasticidade (BEGATIN 2009; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

O envelhecimento cutâneo extrínseco é consequência, principalmente, da radiação UV que atinge diferentes níveis na pele, dependendo do seu comprimento de onda. A radiação UVA apresenta ondas mais longas (340-400 nm) que atingem queratinócitos da epiderme e fibroblastos da derme (camada intermediária); a radiação UVB por ter menor comprimento (290-320 nm) é mais absorvida na epiderme, afetando, principalmente, os queratinócitos. Ambas as radiações causam mudanças moleculares nas células e conduz à formação de radicais livres, provocando a degradação e dano dos sistemas antioxidantes de defesa da pele e no DNA de forma indireta e direta, respectivamente (BEGATIN, 2009; COSTA et al. 2012; MONTAGNER; COSTA, 2009; SCOTTI et al., 2007).

Apesar do envelhecimento da pele ser uma pequena parte do processo de envelhecimento do organismo como um todo, é evidente que o aumento da perspectiva de vida ocasione uma busca maior por tratamentos, prevenção e controle deste processo, uma vez que a aparência da pele interfere em aspectos psicológicos e sociais e na relação do indivíduo com o ambiente (DIEAMANT, 2012; PUJOL, 2011).

1.3.7 Correlação entre processo inflamatório e oxidativo

A inflamação é a resposta fisiológica normal do organismo à infecção ou lesão tecidual que permite que o indivíduo sobreviva às adversidades do meio e mantém a homeostase dos tecidos sob diversas condições nocivas, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células inflamatórias (neutrófilos, monócitos, macrófagos e, em alguns casos, linfócitos), além da liberação de mediadores citotóxicos, inflamatórios e quimiotáticos que, em conjunto, agem para conter, destruir e remover os agentes invasores e patógenos. Em geral, as respostas do organismo à inflamação localizada são auto-limitadas e resultam na reparação da lesão (MEDZHITOV, 2010; OKIN; MEDZHITOV, 2012).

Nas áreas de inflamação, causadas por invasão tecidual ou de microrganismos, como, também, por desordens imunes ou tecidos inespecíficos lesados, os neutrófilos se encontram em abundância, que são atraídos por sinais quimiotáticos endógenos ou gerados por agentes

invasivos. Quando ativados, sofrem um conjunto de alterações metabólicas com formação das ERO. Em condições normais, esses eventos são vitais para a sobrevivência humana, porém quando ocorrem em excesso, podem se relacionar com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e diversas patologias (SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; WRIGHT et al., 2010).

O estresse oxidativo está altamente associado às patologias relacionadas ao envelhecimento e, conseqüentemente, ao processo inflamatório. Como neste processo há o envolvimento de um grande número de células e mediadores, ainda não foi totalmente elucidado o que realmente desencadeia a resposta inflamatória. As citocinas são proteínas do sistema imunológico produzidas, principalmente, por leucócitos, atuando como comunicadores químicos entre as células e regulando a defesa do organismo contra patógenos (BAIERLE et al., 2015). Em estudo realizado por Baierle et al. (2015), foi observado em um grupo de 80 idosos acima de 60 anos que o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias era acompanhado do aumento de carbonilas proteicas, além da redução da atividade da enzima GPx, confirmando a correlação entre processo oxidativo e inflamatório nos parâmetros analisados.

Em outro estudo realizado por Vírgolice et al. (2008), foi observado em um grupo de 40 pacientes diabéticos entre 45 e 75 anos que altos valores de marcadores inflamatórios eram acompanhados do aumento do estresse oxidativo. Os autores sugeriram, também, a ligação entre obesidade e diabetes mellitus que pode ser representada pela inflamação e pelo estresse oxidativo.

Por outro lado, Biswas (2016) discute as controvérsias entre variados estudos com ensaios antioxidantes que ou causaram efeitos benéficos ou nenhum efeito, até mesmo, efeitos prejudiciais à saúde humana. Assim, as pesquisas relacionadas apontaram incertezas sobre o papel do estresse oxidativo nas patologias humanas. No entanto, inúmeras explicações foram propostas para esclarecer essa discrepância entre ensaios clínicos, epidemiológicos e/ou experimentais, aparecendo como um novo enigma para a ciência, conhecido como “paradoxo antioxidante”.

Como consequência da liberação excessiva de moléculas citotóxicas pelos neutrófilos e da grande produção de ERO no organismo em condições de estresse oxidativo, existe um grande interesse em encontrar reguladores das funções efetoras da célula, para que novas substâncias com atividade anti-inflamatória e antioxidante sejam produzidas. Neste contexto estão inseridos o estudo de produtos naturais, que têm demonstrado resultados satisfatórios

envolvendo diversas substâncias com efeitos positivos sobre o metabolismo oxidativo (BERGENDI et al., 1999; CABANIS et al., 1996; FOOK et al., 2005).

Como demonstrado neste trabalho, a espécie vegetal *C. verbenacea* apresentou atividade antioxidante pronunciada frente a diferentes ERO de importância biológica, podendo sugerir sua atuação em processos inflamatórios de forma benéfica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antioxidante do extrato de folhas de *C. verbenacea* frente a espécies reativas de relevância biológica para possível aplicação na prevenção do envelhecimento cutâneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Selecionar o extrato de folhas de *C. verbenacea* com maior potencial antioxidante através da comparação dos teores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais, além da atividade antioxidante de extratos etanólico, hidroetanólico 70 % e aquoso;
- b) Avaliar a atividade antioxidante do extrato selecionado por métodos *in vitro* e comparar seu comportamento frente a diferentes espécies reativas de oxigênio;
- c) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato selecionado de *C. verbenacea* em linhagem celular HepG2 e HaCat;
- d) Obter os perfis cromatográficos do extrato de *C. verbenacea* utilizando as técnicas de cromatografia em camada delgada e de cromatografia líquida de alta eficiência;
- e) Desenvolver formulação cosmética contendo o extrato de *C. verbenacea* para avaliar a atividade fotoprotetora.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os reagentes e substâncias foram obtidos das seguintes empresas: reagente Folin-Ciocalteu da Imbralab[®]; carbonato de sódio, 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH^{*}), persulfato de potássio, ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), crocina, dicloridrato de 2,2'-azobis-(2-metilpropanoamidina) (AAPH), metassulfato de fenazina (PMS), azul de nitrotetrazólio (NBT), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (trolox), quercetina, ácido ascórbico, bromato de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL), dimetilsulfóxido (DMSO), tampão fosfato-salino (PBS) da Sigma-Aldrich[®]; ácido acético glacial e peróxido de hidrogênio, álcool isopropílico da Merck[®]; meio de cultura DMEM, soro fetal bovino da Cultilab[®]; tripsina da Gibco[®]; solventes grau analítico (PA): metanol, acetato de etila, clorofórmio, isopropanol, hexano e tolueno da Sigma-Aldrich[®]; solvente grau cromatográfico: metanol da Chemys[®]. Fita da Transpore[®]. Água ultrapura (resistividade mínima de 18,2 MΩ.cm): obtida em ultrapurificador modelo Direct Q3 UV Merck Millipore[®]. Água deionizada (0,23 μS/cm): obtida do deionizador Gehaka[®].

Os equipamentos utilizados foram: balança analítica (Acculab[®]), banho-maria, pHmetro (Marconi[®]), sonificador Ultra Sonic Cleaner (Unique[®]), espectrofotômetros de placas Biotek[®] (Power Wave XS2) e com cubetas Shimadzu[®] modelo 1800 e OceanOptics[®] modelo USB 4000 com agitação magnética, CLAE-DAD-UV/Vis modelo Flexar Perkin-Elmer[®] (bomba quaternária, desgaseificador, injetor manual Rheodyne[®] de 6 pórtricos com *loop* de 20 μL, detectores DAD e UV/Vis, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera[®] 4.1.0.6386), aparelho de determinação de FPS Optometrics[®] modelo SPF-290S.

3.2 PREPARO DOS EXTRATOS DE *C. verbenacea*

3.2.1 Preparo dos extratos para a seleção do líquido extrator

As folhas de *C. verbenacea* foram coletadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), localizado no distrito de Betel, Paulínia-SP (22°47'15.91"S 47°06'42.87"O) em 31 de outubro de 2013, entre 11 h e 12 h, em condição ambiente com céu nublado. Foram

coletados exemplares para a preparação das exsicatas que foram enviadas para tombamento no Herbário São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP) sob o número 31235.

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar a 40° C por 72 h, e, posteriormente, à trituração em moinho de facas. A extração do material seco e moído foi realizada utilizando 1,0 kg de material vegetal para a extração com etanol e 50,0 g para a extração com etanol 70 % (pequena escala), por maceração à 35° C em 3 etapas com renovação do líquido extrator (24, 48 e 48 h), sob agitação ocasional. A relação droga vegetal/solvente total (3 etapas) foi de 1:15 (g/mL), sendo 1:5 em cada etapa. Para o preparo do extrato aquoso, o material vegetal (50,0 g) foi extraído por 4 h à 50° C com água deionizada, utilizando uma relação droga vegetal/solvente de 1:14 (g/mL).

As soluções extrativas obtidas de cada líquido extrator (etanol, etanol 70 % e água) foram reunidas e filtradas em papel de filtro. Apenas as soluções extrativas etanólica e hidroetanólica foram concentradas em rotaevaporador. Em seguida, a solução extrativa etanólica concentrada foi seca sob fluxo de ar em capela e as soluções extrativas hidroetanólica e aquosa foram liofilizadas, e, finalmente, todos os extratos foram colocados em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida até massa constante. Os extratos secos foram armazenados em frascos fechados em geladeira.

A coleta, secagem e moagem do material vegetal e a obtenção do extrato etanólico foram realizados pelo aluno de doutorado Juhan A. S. Pereira que desenvolve o projeto intitulado “Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC.”; e a obtenção do extrato aquoso foi realizada pela aluna de iniciação científica Jéssica Pereira de Azevedo, ambos do mesmo grupo de pesquisa.

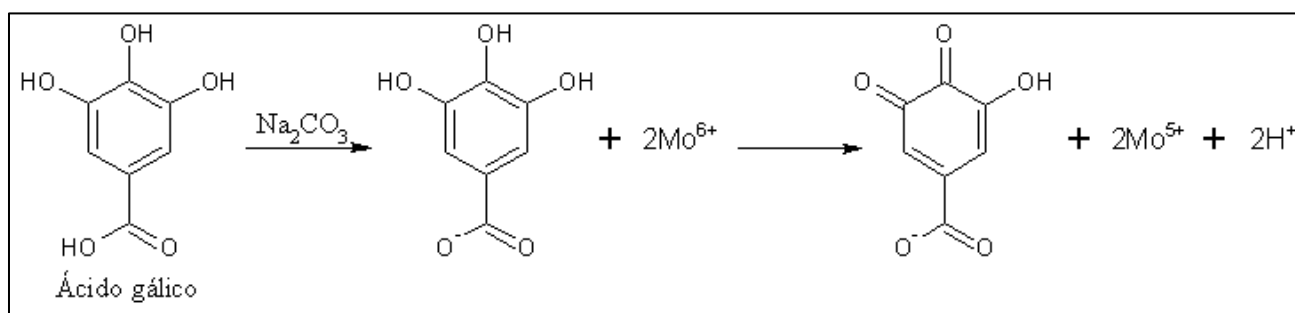
3.2.2 Preparo do extrato hidroetanólico 70 % em maior escala

Após a seleção do líquido extrator, através dos resultados obtidos nos ensaios preliminares de teor de fenólicos totais (item 3.3), teor de flavonoides totais (item 3.4), atividade antioxidante pelo método do DPPH• (item 3.5.1) e perfis cromatográficos (item 3.7.2), foi realizada uma nova extração com etanol 70 % por maceração em 3 etapas em maior escala, utilizando 1,0 kg do material vegetal seco e moído. A extração, concentração e secagem do extrato foram realizadas como descrito no item anterior.

3.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de *C. verbenacea* foi determinado por fotometria no visível utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e curva analítica de ácido gálico seguindo o método descrito por Singleton e Rossi (1965) e Singleton et al. (1999). A Figura 5 exemplifica a reação produzida no método com o ácido gálico. As absorvâncias das amostras foram medidas em 760 nm em espectrofotômetro UV/Vis de cubetas. Os extratos etanólico (EtOH), hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) e aquoso (Aq) foram solubilizados em etanol, etanol 70 % e metanol 20 %, respectivamente, e avaliados na concentração de 25,0 µg/mL; como branco, para cada extrato foi adicionado aos reagentes um volume do respectivo diluente correspondente ao volume da solução do extrato. Para a construção da curva analítica do ácido gálico, solubilizado em água deionizada, foram utilizadas as concentrações 1,3, 2,5, 4,0, 5,0, 7,5, 10,0 e 20,0 µg/mL. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em miligramas de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato seco.

Figura 5 - Reação do ácido gálico com o cátion molibdênio (Mo^{6+}), componente do reagente Folin-Ciocalteu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em meio ácido), que apresenta coloração amarela no complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e, após ser reduzido (Mo^{5+}), ocorre a formação dos complexos molibdênio-tungstênio com coloração azul.

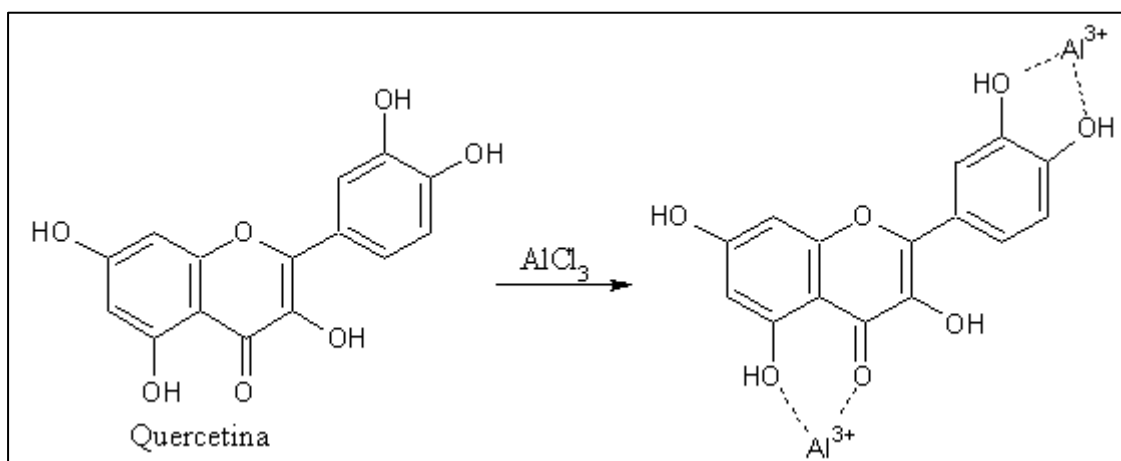


3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides totais dos extratos de *C. verbenacea* foi determinado conforme o método proposto por Ho, Yu e Su (2012) (método A). A Figura 6 demonstra a formação do complexo flavonoide- Al^{3+} , responsável pela absorção de luz Vis. As absorvâncias foram mensuradas em 415 nm em espectrofotômetro UV/Vis de cubetas. A quercetina foi utilizada

como padrão para obtenção de curva analítica. Os extratos foram solubilizados de acordo com o item 3.3 e o extrato EtOH foi avaliado na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que os extratos EtOH 70 % e Aq foram avaliados na concentração de 150,0 $\mu\text{g/mL}$; para cada extrato foi adicionado aos reagentes um volume do respectivo diluente correspondente ao volume da solução do extrato. Para a construção da curva analítica da quercetina, solubilizada em etanol 95 %, foram utilizadas as concentrações 0,9, 1,5, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em miligramas de flavonoides totais equivalentes à quercetina por grama de extrato seco.

Figura 6 - Formação do complexo flavonoide- Al^{3+} ($\lambda_{\text{max}} = 425 \text{ nm}$).



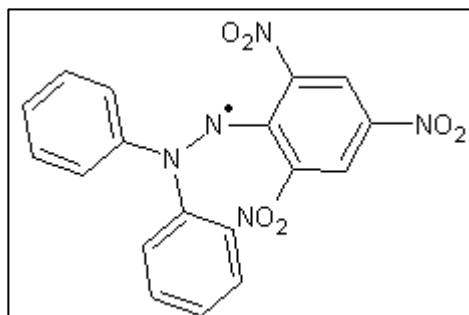
3.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH[•]

O ensaio de atividade antioxidante dos extratos foi realizado através da utilização do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) (Figura 7). O método seguido foi o descrito por Sharma e Bhat (2009) utilizando diferentes concentrações de extrato EtOH (5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0 e 70,0 $\mu\text{g/mL}$), EtOH 70 % (1,0, 3,0, 5,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0, 17,0, 20,0, 25,0, 30,0 e 35,0 $\mu\text{g/mL}$) e Aq (5,0, 10,0, 20,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0 e 80,0 $\mu\text{g/mL}$), solubilizados de acordo com o item 3.3 e como branco foi utilizado o metanol. A leitura das absorbâncias foi feita em 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis de cubetas. As leituras foram realizadas em triplicata e foram computadas as médias das absorbâncias de cada concentração, então foi calculada a porcentagem de captura do radical DPPH[•] tendo como referência o controle (MOLYNEUX, 2004). O ensaio também foi realizado para o ácido ascórbico, como antioxidante padrão, solubilizado em água deionizada em diferentes concentrações (0,9, 1,8,

2,6, 3,5, 4,4 e 5,3 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição.

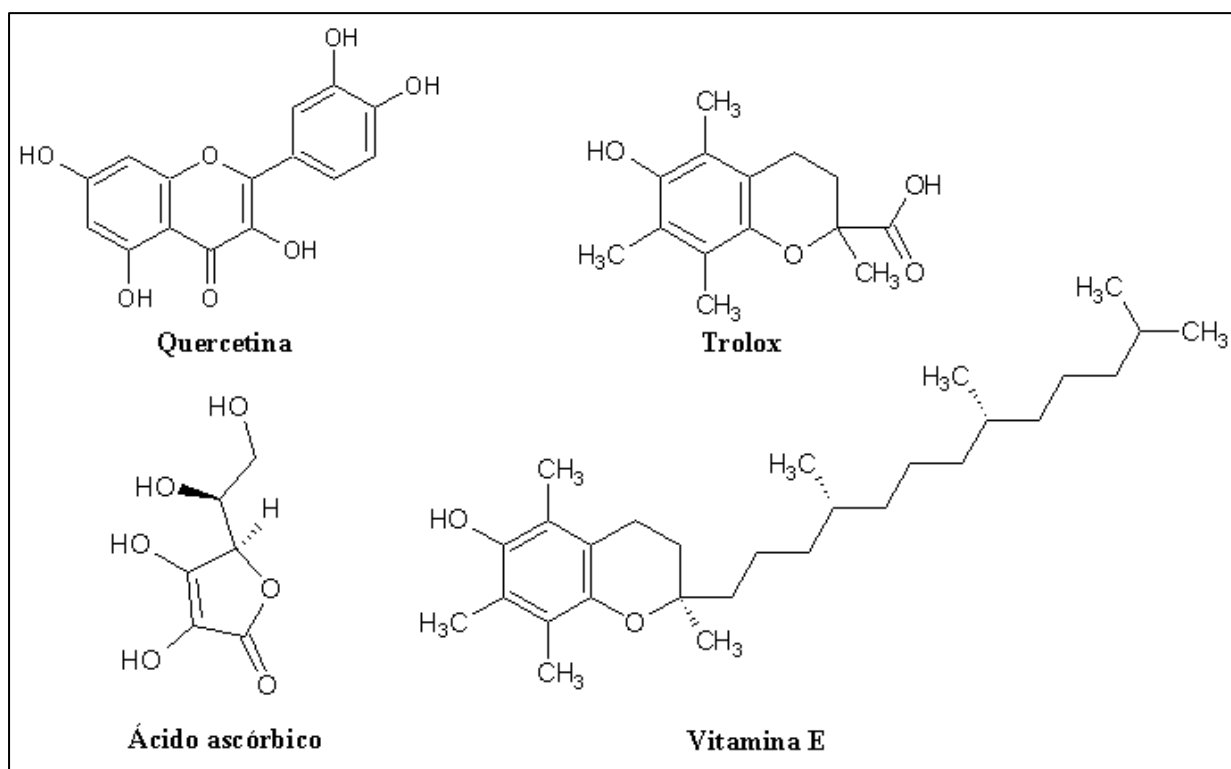
Figura 7 - Estrutura química do radical DPPH \cdot .



3.5.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ABTS $^{+\cdot}$

A partir dos resultados obtidos nos ensaios anteriores, foi selecionado o extrato EtOH 70 % para seguir com a investigação e também foram escolhidos três padrões antioxidantes hidrossolúveis para efeito comparativo, a quercetina, pertencente à classe dos flavonoides, o ácido ascórbico (vitamina C) e um análogo solúvel da vitamina E, o trolox. Suas estruturas químicas estão representadas na Figura 8. Inúmeros relatos da literatura sugerem que a vitamina C é um poderoso antioxidante encontrado em abundância nas frutas e vegetais e, além disso, tem a capacidade de regenerar a vitamina E após esta atuar como antioxidante (PACKER; SLATER; WILSON, 1979) e, também, tem como característica ser lipossolúvel devido à sua estrutura química (Figura 8). Em todos os ensaios antioxidantes a partir deste, o extrato EtOH 70 % foi comparado a esses padrões.

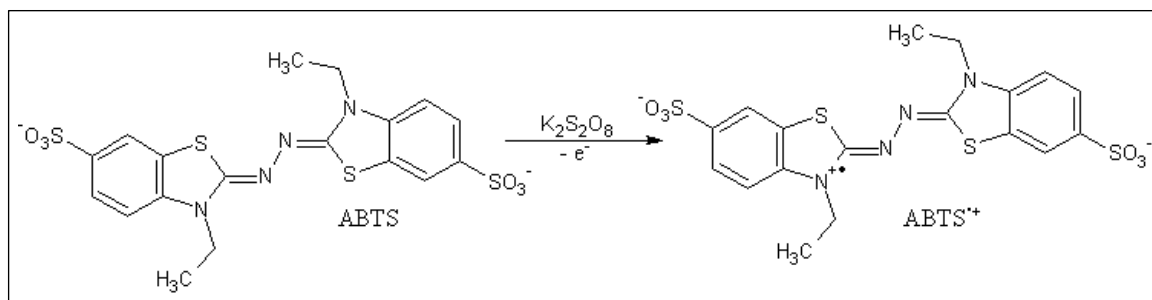
Figura 8 - Estruturas químicas da quercetina, ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E e seu análogo solúvel em água, trolox.



Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do ABTS^{•+} foi utilizado o método descrito por Re et al. (1999), com algumas modificações. O cátion radicalar ABTS^{•+} foi gerado pela oxidação do ABTS (7 mmol/L) com persulfato de potássio (140 mmol/L) na ausência de luz, à temperatura ambiente, por, aproximadamente, 16 h (Figura 9). Após ser formado, o radical foi diluído em tampão fosfato de sódio (pH 7,0) até se obter a absorbância de $0,750 \pm 0,020$, em 734 nm. Foi utilizado o espectrofotômetro de microplacas para realização das leituras das absorbâncias após incubação de 15 min na ausência de luz e na presença e ausência da amostra (extrato EtOH 70 % nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 6,0, 8,0, 10,0, 12,0, 15,0, 17,0 e 19,0 $\mu\text{g/mL}$) e padrões (ácido ascórbico: 1,0, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$; quercetina: 0,2, 0,4, 0,5, 0,7, 0,9, 1,0, 1,2 e 1,3 e trolox: 0,5, 1,0, 2,0, 2,5, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$). Tanto o ácido ascórbico como trolox foram solubilizados em tampão fosfato de sódio (pH 7,0). Para a solubilização do extrato EtOH 70 % e da quercetina, foi necessário preparar uma solução em DMSO e então realizar uma diluição com o mesmo tampão para obter a solução de trabalho. O volume total da reação foi de 300 μL , sendo 100 μL para a solução de ABTS^{•+} e 200 μL para as diferentes concentrações de amostra e padrões. Como branco foi utilizado 300 μL de tampão. As leituras das absorbâncias foram realizadas em triplicata e a partir da média de cada concentração, foi calculada a porcentagem de captura do radical

ABTS^{•+}. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição. O valor de CE₅₀ do extrato EtOH 70 % também foi convertido a capacidade antioxidante equivalente ao trolox (CAET) dividindo-se o valor de CE₅₀ do trolox (μ mol), pelo valor de CE₅₀ do extrato (g).

Figura 9 - Formação do radical ABTS^{•+}.



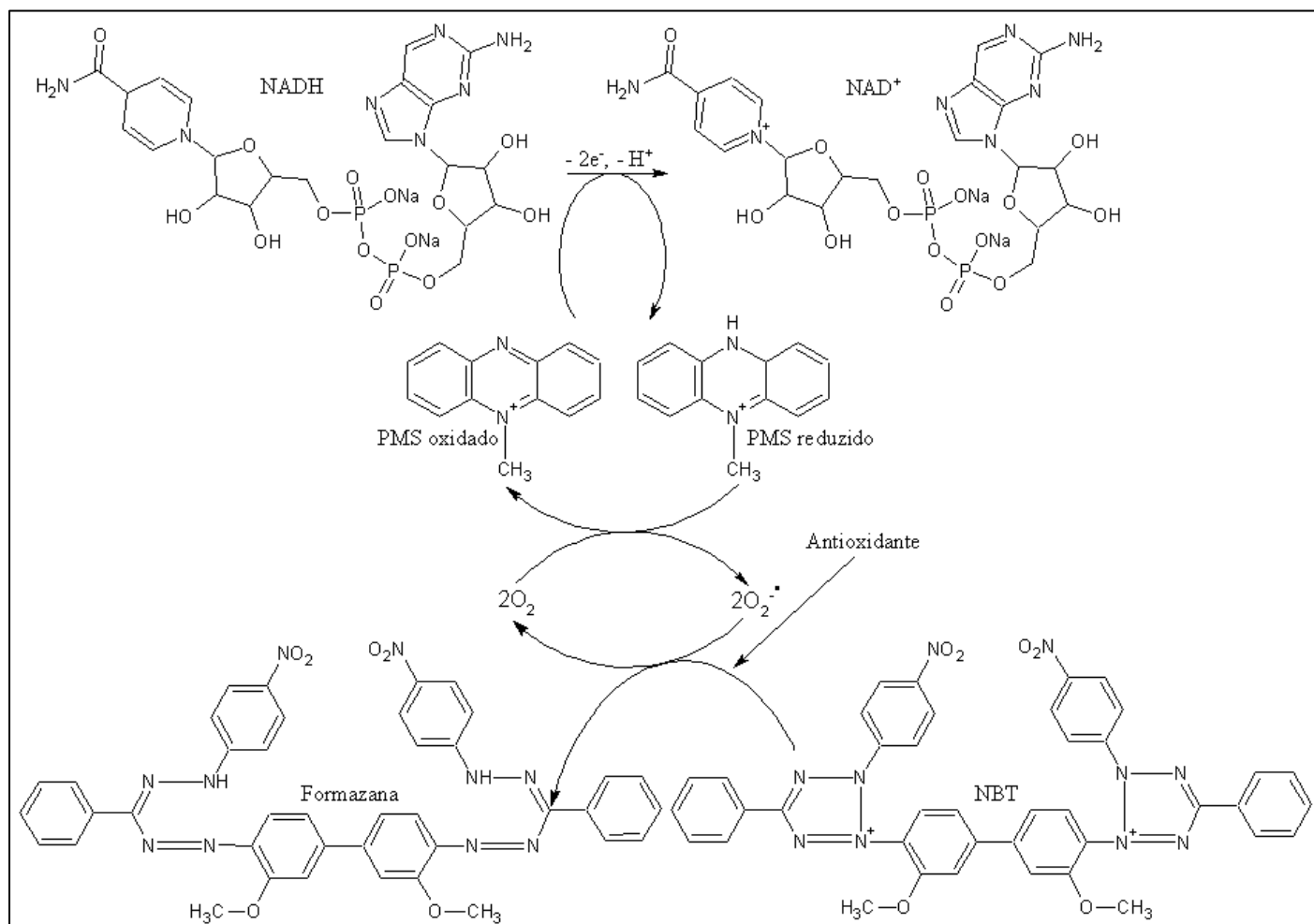
3.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ânion radicalar superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

Para o ensaio da atividade antioxidante pelo método do $O_2^{\bullet-}$, a reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), forma o ânion radicalar superóxido que reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT), reduzindo-o, para gerar uma formazana, na qual a intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração do radical (Figura 10).

O experimento foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3; 25 mmol/L), contendo PMS (372 μ mol/L), NBT (600 μ mol/L), NADH (1.560 μ mol/L), diferentes concentrações da amostra (extrato EtOH 70 %: 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 350,0, 400,0, 450,0 e 500,0 μ g/mL) e padrões (ácido ascórbico: 50,0, 55,0, 60,0, 65,0, 70,0, 75,0 e 80,0 μ g/mL; quercetina: 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0 e 40,0 μ g/mL e trolox: 250,0, 450,0, 550,0, 650,0, 850,0, 950,0 e 1.050,0 μ g/mL), completando com água para alcançar o volume final de reação de 300 μ L. A solubilização da amostra e padrões para o preparado das soluções de trabalho foi realizado como descrito no item 3.5.2., substituindo o tampão fosfato de sódio (pH 7,0) por tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3). Como branco da reação foram utilizados o tampão, PMS, NBT e água, completando o volume de 300 μ L. Após incubação de 7 min à temperatura ambiente, a absorbância foi monitorada em 560 nm, a fim de determinar a quantidade de formazana gerada (HAZRA; BISWAS; MANDAL, 2008). O monitoramento da

formazana é feito por fotometria com a mudança da coloração amarelo pálido do NBT para uma coloração púrpura da formazana; as moléculas que atuam como antioxidantes interagem com o $O_2^{\cdot-}$ inibindo a produção da formazana (ALVES et al., 2010). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição.

Figura 10 - Esquema da geração do $O_2^{\cdot-}$ e a ação de um antioxidante para inibir a formação de formazana.



Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2009).

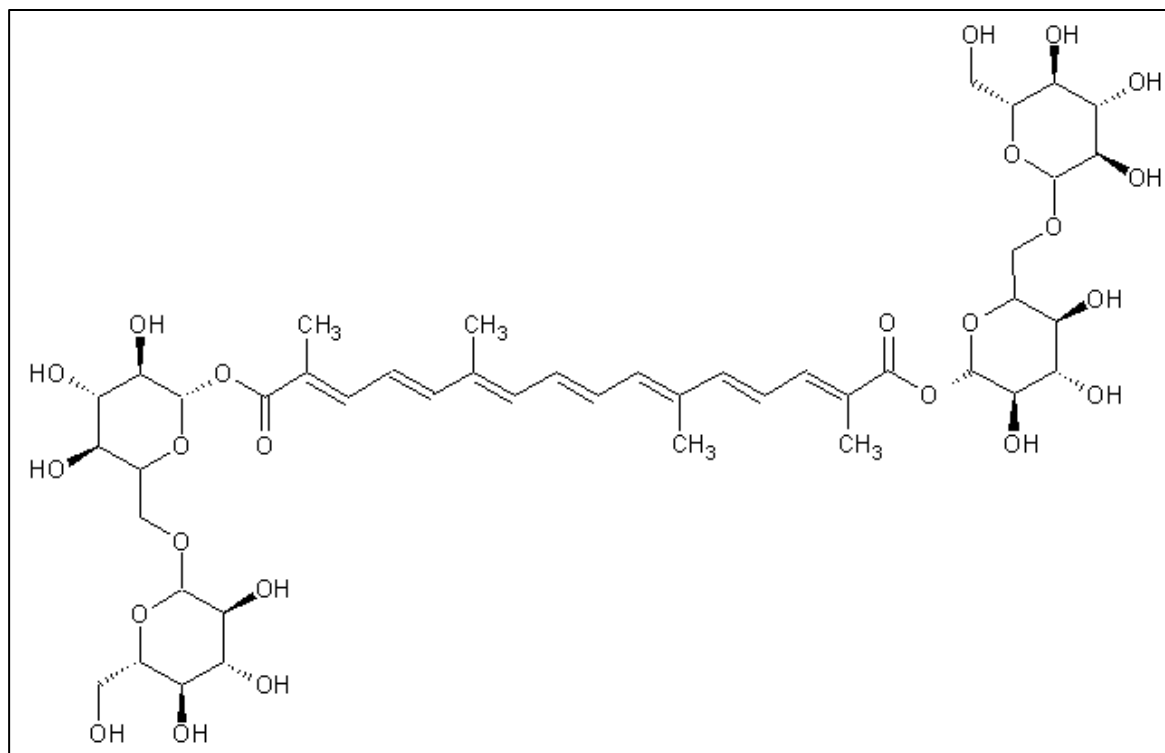
3.5.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do descoloramento da crocina

Tendo em vista a importância da lipoperoxidação, que gera o radical peroxila (ROO^{\cdot}), normalmente encontrado em amostras biológicas e alimentos, vários sistemas-modelo são utilizados para simular esta reação e avaliar a atividade antioxidante de uma determinada amostra.

Este ensaio foi inicialmente proposto por Bors, Michael e Saran (1984) e mostrou-se adequado para simular o processo de lipoperoxidação e avaliar a atividade antioxidante frente

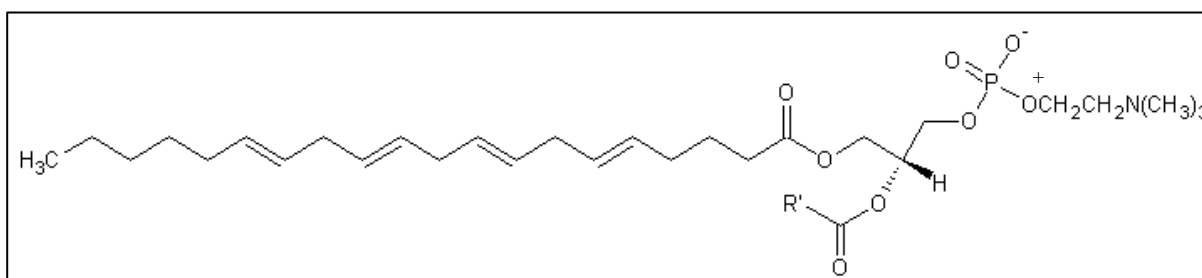
a este tipo de oxidação. A capacidade de captura das substâncias antioxidantes é medida através da proteção da crocina, que não sofrerá o descoloramento por um composto gerador de radicais livres. A crocina é um pigmento natural derivado da planta *Crocus sativus* L., classificada como carotenoide (Figura 11).

Figura 11 - Estrutura química da crocina.



Os fosfolipídios (Figura 12) são um dos componentes essenciais das membranas biológicas. É possível notar uma semelhança entre a estrutura da crocina e de um fosfolipídio, sendo relevante a utilização desse carotenoide para este sistema-modelo.

Figura 12 - Estrutura de um fosfolipídio (fosfatidilcolina).

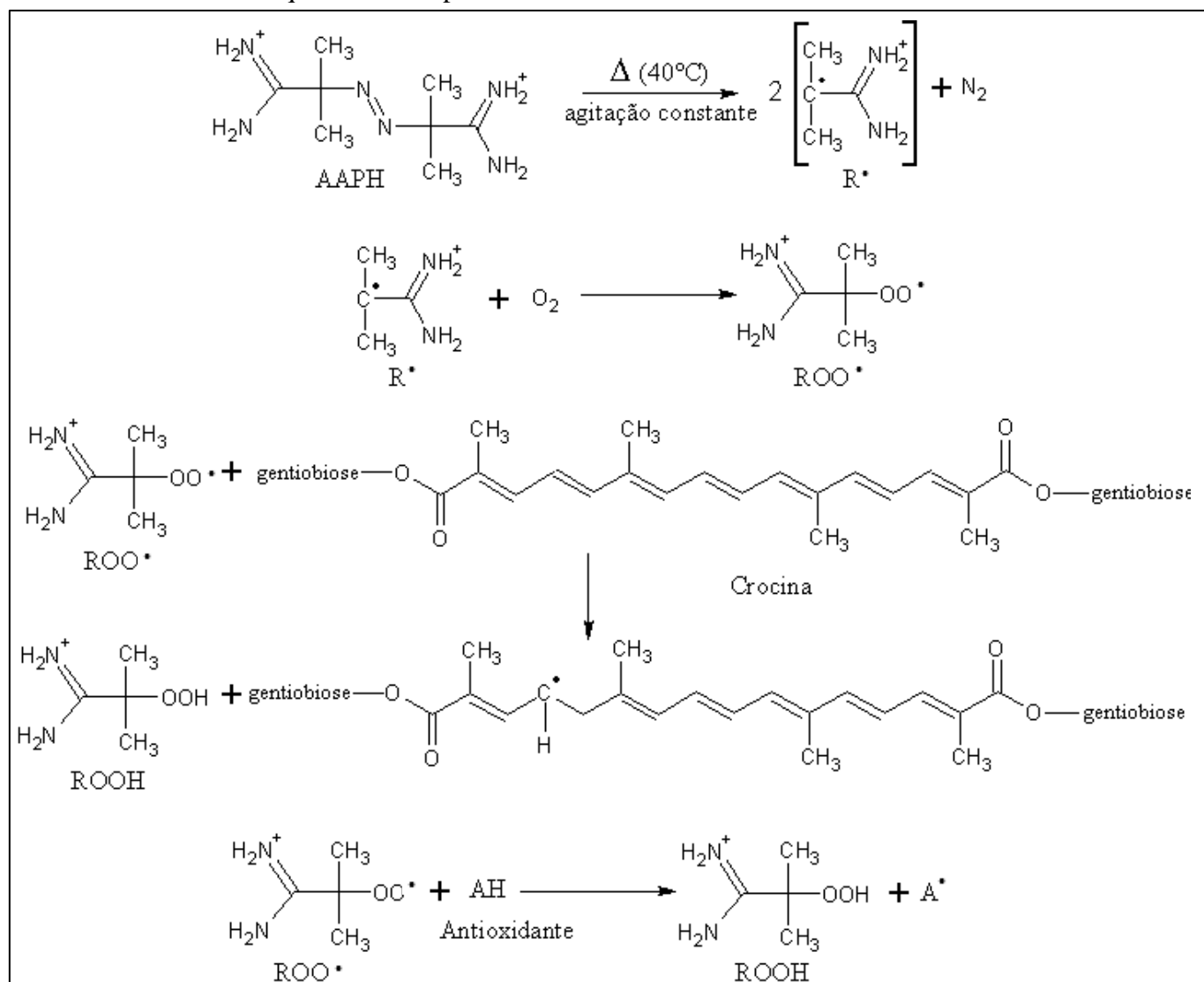


Fonte: Dowhan, Bogdanov e Mileykovskaya (2016).

Este método foi utilizado para analisar a capacidade antioxidante do plasma sanguíneo humano, mostrando-se ser eficaz para amostras complexas biológicas (TUBARO et al., 1998).

O ensaio do descoramento da crocina foi realizado de acordo com Tubaro et al. (1998) por meio do monitoramento do decréscimo da absorvância da crocina em função do tempo em 443 nm, durante 10 min em um procedimento de competição cinética, no qual a reação é iniciada pela adição do azocomposto AAPH, dicloridrato de 2,2-azobis-(2-metilpropanoamidina), que gera um radical livre por termólise à 40° C e com velocidade constante. Rapidamente, o O₂ dissolvido no meio reacional interage com este radical e gera o radical ROO• que é capaz de abstrair um átomo de hidrogênio da estrutura da crocina e gerar um radical em sua própria estrutura, rompendo o sistema de duplas ligações conjugadas, e, conseqüentemente, provocando seu descoramento e redução de sua absorvância na região do visível. Com a ação de uma substância antioxidante, o decaimento da absorvância diminui, sendo possível registrar um novo valor na variação da absorvância em função do tempo (velocidade de descoramento). Portanto, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO• e inibem a sua oxidação (Figura 13).

Figura 13 - Reações envolvidas no descolorimento da crocina através da termólise do AAPH e a ação de um antioxidante que inibe este processo.



Fonte: Adaptado de Assis et al. (2015) e Werber et al. (2011).

Experimentalmente, a reação foi realizada em volume total de 2 mL, em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0 com 25 $\mu\text{mol/L}$ de crocina (a partir de uma solução estoque em DMSO 6 mmol/L) e diferentes concentrações de amostra (extrato EtOH 70 %: 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0 $\mu\text{g/mL}$) e padrões (ácido ascórbico: 0,2, 0,5, 0,7, 1,0 e 1,2 $\mu\text{g/mL}$; quercetina: 0,3, 0,9, 1,2, 1,5, 1,8, 2,1 e 2,7 $\mu\text{g/mL}$ e trolox: 0,1, 1,9, 3,1, 4,4 e 6,3 $\mu\text{g/mL}$). Para o preparo das soluções estoques, o ácido ascórbico e trolox foram solubilizados no tampão fosfato de sódio (pH 7,0), enquanto que a quercetina foi solubilizada em DMSO. A reação tem início com adição de 50 μL (12,5 mmol/L, concentração final) de AAPH (em solução estoque fresca 0,5 mol/L em tampão fosfato de sódio 0,12 mol/L, pH 7,0), monitorada à 443 nm, sob agitação e temperatura de 40° C, constantes.

A velocidade do descoramento da crocina se torna linear em, aproximadamente, 1 min após a adição do AAPH, tendo sido monitorada por 10 min a cada 30 s em espectrofotômetro (OceanOptics® USB 4000). Para eliminar possíveis interferências das amostras, foi realizado para cada soluto, um ensaio sem crocina, considerando-o como branco da reação.

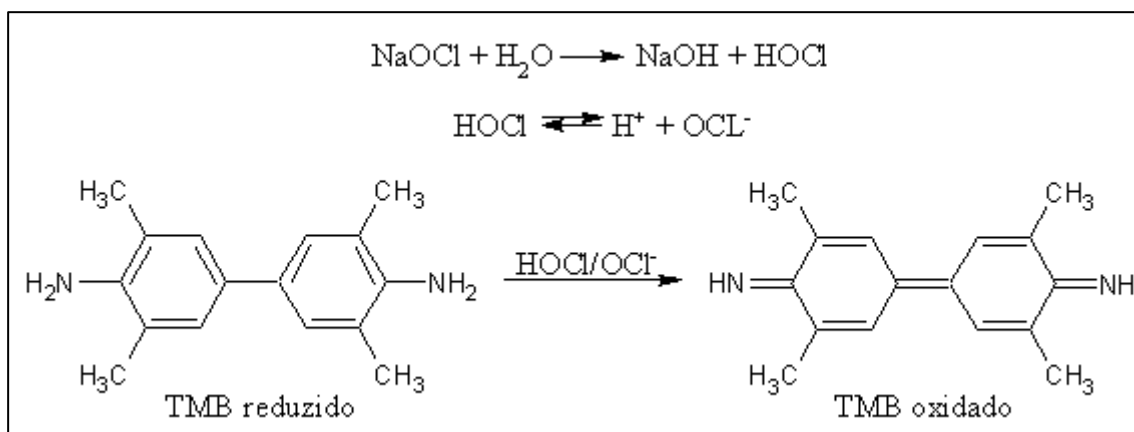
Mediante a competição cinética, o descoramento da crocina (V_0), devido ao radical peroxila, diminui na presença de um antioxidante. O antioxidante compete com a crocina pelo radical ROO^{\bullet} , tendo-se uma nova velocidade do descoramento (V). Os valores de V_0 e V podem ser calculados a partir da inclinação de regressão linear de cada concentração testada através da equação da reta. O coeficiente angular é o valor de V_0 e V ($y = ax + b$).

Para representação gráfica, é utilizado um gráfico V_0/V versus $[A]/[C]$, onde A é a concentração da amostra utilizada e C é a concentração de crocina, indicando a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o radical peroxila. A partir deste gráfico, outra regressão linear é feita e a partir da equação da reta é possível obter um novo valor de coeficiente angular. Pela divisão do coeficiente angular do extrato EtOH 70 % e do coeficiente angular dos padrões, é possível expressar os valores em equivalentes ao ácido ascórbico, quercetina e trolox.

Tubaro et al. (1998) fizeram uso da absorvidade molar (ϵ) dada na literatura para ajustar a concentração de uma solução de crocina em metanol, isolada a partir do saffron (*Crocus sativus* L.). Assis (2012) substituiu o metanol por DMSO, uma vez que a crocina é muito mais solúvel neste solvente, e obteve o seguinte valor de coeficiente da absorvidade molar: $\epsilon = 13.727 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a 443 nm. A concentração da crocina foi determinada através do valor de absorbância obtido e do valor de ϵ .

3.5.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa $HOCl/OCl^-$

Este ensaio foi realizado pelo método descrito por Costa, Ximenes e Fonseca (2004), no qual a capacidade antioxidante depende da habilidade da amostra em capturar o $HOCl$, impedindo-o de oxidar o TMB. Com a oxidação do TMB é gerado um cromóforo azul com máximo de absorbância em 655 nm e com grande sensibilidade para determinar a captura do $HOCl/OCl^-$ pela amostra (Figura 14).

Figura 14 - Oxidação do TMB pelo HOCl/OCl⁻.

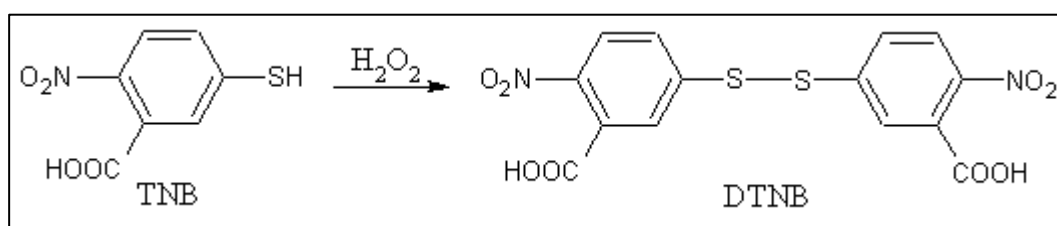
Para obter o agente oxidante padrão foi feita uma diluição do NaOCl 12 % em NaOH 10 mmol/L. A concentração do HOCl foi determinada através do valor de absorvância obtido e de sua absorvância molar ($\epsilon = 350 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, a 292 nm) (ZGLICZYNSKI et al., 1971). A solução de TMB (2,8 mmol/L) foi preparada com dimetilformamida 50 %, ácido acético 0,8 mol/L e iodeto de potássio 0,01 mol/L em um volume final de 5 mL, na proporção de 50:49:1 (v/v), respectivamente.

O teste foi realizado em microplaca, com diferentes concentrações da amostra (extrato EtOH 70 %: 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 30,0, 60,0 e 120 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em dimetilformamida) e padrões (ácido ascórbico: 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$; quercetina: 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 e 0,9 $\mu\text{g/mL}$ e trolox: 1,0, 1,5, 2,0, 3,0 e 3,5 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados em tampão, dimetilformamida e tampão, respectivamente) em meio tamponado com fosfato de sódio pH 7,4 (50 mmol/L), HOCl (30 $\mu\text{mol/L}$), incubação de 10 min e, após, foi adicionado o TMB (2,8 mmol/L), mantendo o volume de 60 μL , e variando o volume da amostra e dos padrões, de acordo com suas concentrações analisadas, totalizando 300 μL de volume final; como branco da reação foram utilizados o tampão e TMB. As incubações foram realizadas em temperatura ambiente por 5 min na ausência de luz, e as leituras da absorvância foram realizadas em triplicata em 652 nm e a partir da média de cada concentração, foi calculada a porcentagem de captura do HOCl. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (EPM) das porcentagens de inibição.

3.5.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa H₂O₂

A capacidade de inibição do H₂O₂ foi determinada segundo Ching, Jong e Bast (1994), com algumas modificações, no qual o H₂O₂ oxida o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) à ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB), com diminuição da absorvância a 412 nm e o aumento a 325 nm (Figura 15).

Figura 15 - Oxidação do TNB em DTNB pelo H₂O₂.



O TNB foi preparado segundo Ching, Jong e Bast (1994) e sua concentração foi determinada a partir de sua absorvância e absorvidade molar em 412 nm ($13.600 \text{ L M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), e a concentração do H₂O₂ foi determinada de acordo com Brestel (1985) ($\epsilon = 80 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, a 230 nm).

Realizou-se o ensaio em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L, pH 7,4, adicionando em tubo de ensaio diferentes concentrações da amostra (extrato EtOH 70 %: 50,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 350,0, 400,0, 450,0 e 500,0 $\mu\text{g/mL}$, solubilizado em DMSO e, posteriormente em tampão, obtendo a solução de trabalho) e dos padrões (ácido ascórbico: 38,0, 43,0, 53,0, 58,0, 73,0 e 78,0 $\mu\text{g/mL}$; quercetina: 15,1 e 30,2 $\mu\text{g/mL}$ e trolox: 125,1, 312,9 e 625,7 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados em tampão), H₂O₂ (0,3 mmol/L) e incubação por 30 min a 37° C; após, adicionou-se TNB (53 $\mu\text{mol/L}$), e incubou-se por mais 1 h a 37° C., obtendo um volume final de 1,0 mL. A leitura das absorvâncias foi realizada a 412 nm. A partir das absorvâncias obtidas, foi calculada a % de inibição pela equação $\%In = [1 - (Abs_{\text{max}} - Abs_{\text{amostra}}) / (Abs_{\text{max}} - Abs_{\text{min}})] * 100$, onde a $Abs_{\text{max}} = \text{tampão} + \text{TNB}$ (100 %) e $Abs_{\text{min}} = \text{tampão} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{TNB}$ (0 %).

3.5.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). A análise da variância One-way ANOVA seguida do teste Student-Newman-Keuls foi utilizada para

comparação entre extrato e padrões. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.01.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO DE *C. verbenacea* EM CÉLULAS HepG2 e HaCat

Para a avaliação da citotoxicidade do extrato EtOH 70 % das folhas de *C. verbenacea*, foi utilizado o método do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), que tem como princípio determinar a habilidade de células vivas em reduzir o MTT, formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. Os ensaios foram realizados em células de hepatoma humano (HepG2) que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos e em queratinócitos humanos (HaCat), encontradas na pele. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram incubadas a 37° C em atmosfera de 5 % de CO₂. As células com confluência de 80 a 90 % foram tripsinizadas. A atividade da tripsina foi interrompida pela neutralização com DMEM com soro e a suspensão foi centrifugada a 2.500 rpm por 3 min. Em seguida, as células foram semeadas em placas de 96 poços com densidade celular de 1,0 x 10⁵ células/mL para HaCat e 2,0 x 10⁵ células/mL para HepG2. As placas foram incubadas por 24 h para a completa adesão das células. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (doxorrubicina a 20 µg/mL em DMEM sem soro) e controle negativo (DMEM sem soro). Para a linhagem HaCat, foi utilizado um controle de veículo (DMSO 0,4 % em DMEM sem soro) e as concentrações de extrato utilizadas foram 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µg/mL, solubilizado em DMEM sem soro com 0,4 % de DMSO. Para a linhagem HepG2, foi utilizado DMSO 1,0 % em DMEM sem soro como controle de veículo e as concentrações de extrato foram 500, 250, 125, 62,5, 31,3 e 15,6 µg/mL, solubilizado em DMEM sem soro com 1,0 % de DMSO. O tratamento foi realizado durante 24 h.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido e 100 µL de MTT (preparado com 5 mg do sal de metiltetrazolium em 1 mL de PBS, alcançando a concentração final de 0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37° C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (entre 3 a 5 h). A solução de MTT foi retirada da placa e, para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de DMSO foram adicionados a cada poço e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas a 570 nm. Foram realizados 3 experimentos independentes com cada

linhagem celular e, para análise dos resultados, foi aplicada a análise da variância One-way ANOVA seguida do teste de Tukey para comparação entre extrato e controle de veículo, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5.01.

3.7 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.7.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

O extrato EtOH 70 % foi submetido à cromatografia em camada delgada visando uma análise fitoquímica preliminar utilizando placas de sílica gel com base de alumínio (0,25 mm) como fase estacionária, e como fase móvel, misturas de diferentes proporções com os solventes acetato de etila, clorofórmio, isopropanol, hexano, metanol e tolueno. Apesar da química verde propor a substituição de solventes tóxicos por solventes alternativos, fez-se necessário a utilização, em pequena quantidade, de alguns solventes mais tóxicos para se obter melhor resolução em CCD. Como revelador foi utilizado o H₂SO₄ 10 %. Para efeito comparativo, o extrato foi analisado também com o extrato EtOH e óleo essencial de folhas de *C. verbenacea*. Foi utilizada a concentração de 2,0 mg/mL para o extrato EtOH, solubilizado em metanol, aplicando-se 20 µL; de 4,0 mg/mL para o EtOH 70 % solubilizado em metanol 90 %, aplicando-se 40 µL; e de 5,0 mg/mL para o óleo essencial, solubilizado em éter etílico, aplicando-se 20 µL.

3.7.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e UV/Vis (CLAE-DAD-UV/Vis)

Inicialmente os três extratos foram testados (EtOH, EtOH 70 % e Aq) para comparar os perfis cromatográficos dos mesmos. Para isso, os extratos foram submetidos a um pré-tratamento, incluindo uma extração em fase sólida (EFS) em cartucho (C18; 500 mg, 6 mL; Agilent SampliQ[®]) e filtração em membrana (0,22 µm, PVDF). O pré-tratamento das amostras foi realizado pelo aluno de doutorado Juhan A. S. Pereira do mesmo grupo de pesquisa. As amostras (10,0 mg) foram solubilizadas em metanol: água 95:5 (1,0 mL), as soluções foram aplicadas no cartucho, eluídas com mais 4,0 mL de metanol: água 95:5. Após recolhidos, os eluatos foram secos em capela e, posteriormente, solubilizados em 1 mL de metanol e filtrados em membrana. Ao final as amostras dos extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq ficaram com as respectivas concentrações de 6,6, 2,8 e 3,2 mg/mL, sendo analisados por CLAE-DAD

utilizando como fase móvel água (A) e metanol (B) em modo gradiente: 5-100 % de metanol em 30 min, 100 % de metanol por 5 min; coluna PerkinElmer® C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detector de arranjo de diodos (DAD) com comprimentos de onda entre 190 a 400 nm.

Após a seleção do EtOH 70 %, outras condições cromatográficas (fase móvel e estacionária) foram avaliadas para otimizar a resolução cromatográfica e obter perfil cromatográfico mais amplo. Para isso foi realizado novamente o pré-tratamento da amostra da mesma forma já descrita e, ao final, sua concentração foi de 2 mg/mL.

Inicialmente, foi utilizado e adaptado o método descrito por Matias et al. (2013): coluna PerkinElmer® C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-2 min 5 % B, 2-10 min 5-25 % B, 10-20 min 25-40 % B, 20-30 min 40-50 % B, 30-40 min 50-60 % B, 40-50 min 60-70 % B, 50-80 min 70-100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

Sendo este um método complexo e com longo tempo de análise, foi desenvolvido outro método, a fim de simplificar e diminuir o tempo de análise. Para isso foi utilizada coluna PerkinElmer® C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-30 min 5-60 % B, 30-35 min 71 % B, 35-55 min 100 % B, 55-60 min 100 % B, vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

A partir desta condição, otimizações da fase móvel foram realizadas incluindo o aumento da força de eluição inicial (aumento de % de B no início) e alterações no tempo do gradiente.

Tendo em vista a dificuldade de separação das substâncias, a coluna C18 foi substituída por uma coluna Varian® difenil (4,6 x 250 mm; 5 µm) com a mesma fase móvel, começando com uma análise em modo gradiente exploratório: 40-100 % B em 40 min, 100 % B por 5 min, com vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e comprimento de onda de 250 nm. Baseado neste método e utilizando a mesma coluna e fase móvel, foi feita uma análise em modo gradiente: 0-40 min 30-70 % B, 40-60 min 70-100 % B, 60-65 min 100 % B; com vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detector UV/Vis de comprimento de onda de 250 nm.

3.7.2.1 Quantificação de substâncias pelo método do padrão externo

Para a quantificação das substâncias menos polares do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* por CLAE-DAD, foi utilizado o método cromatográfico desenvolvido pelo aluno

de doutorado Juhan A. S. Pereira, do mesmo grupo de pesquisa, para o extrato etanólico da mesma espécie. O aluno também isolou 3 substâncias a partir deste extrato, identificadas por análises espectrométricas como sendo 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A e outro triterpeno análogo à cordialina A, que foram utilizadas para a construção da curva analítica. O pré tratamento do extrato EtOH 70 % foi realizado como descrito no item anterior, e dos padrões, apenas com filtração em membrana (0,22 µm, PVDF). Todos foram solubilizados em acetonitrila 50 %, obtendo as seguintes concentrações: 8 mg/mL para o extrato EtOH 70 %; 0,0125, 0,0250, 0,0500, 0,1000, 0,2000, 0,3000 mg/mL para 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona; e 0,0031, 0,0125, 0,0500, 0,1000, 0,2000, 0,3000, 0,4000 e 0,5000 mg/mL para cordialina A e para o triterpeno análogo à cordialina A. As condições cromatográficas foram: coluna Thermo Scientific® C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm); fase móvel água (A) e acetonitrila (B) em modo gradiente: 0-10 min 6-20 % B, 10-13 min 20-35 % B, 13-60 min 35-68 % B, 60-62 min 68-100 % B, 62-72 min 100 % B, vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 µL e detector DAD com comprimento de onda de 254 nm.

3.8 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO FITOCOSMÉTICA E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO FPS

Para o desenvolvimento da formulação, buscou-se uma emulsão para uso facial do tipo O/A obtida a frio, para evitar qualquer perda de substância volátil do extrato; e com componentes para proporcionar um sensorial agradável e toque seco.

Inicialmente foi desenvolvida uma formulação sem a adição do extrato, denominada formulação base (FB) e sua composição está representada na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição da formulação base.

Componentes	% m/m
<i>Helianthus annuus</i> (Sunflower) Seed Oil, Polyacrylic Acid, Xylityl Sesquicaprylate, Glyceryl Stearate, Euphorbia Cerifera (Candelilla Cera) Wax, Sodium Hydroxide*	3,50
Glyceryl Stearate	1,00
Caprylic / capric triglyceride	1,40
Isopropyl Palmitate	1,20
Cyclopentasiloxane	1,10
Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, buthylparaben	0,60
Aqua	qsp 100

*Emulfeel

Uma vez que se encontram inúmeros componentes utilizados em produtos cosméticos e muitos deles apresentam mais de uma denominação química e/ou comercial, a nomenclatura INCI (*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) permite denominar de forma única e simplificada a composição dos ingredientes dos produtos cosméticos, tendo como objetivo facilitar a identificação de qualquer ingrediente, proveniente de qualquer país, por ser uma codificação universal, com um sistema para todos os países sem distinção de idioma, caracteres e alfabeto (BRASIL, 2009).

A partir da FB foram feitas mais 3 formulações, adicionando-se diferentes concentrações de EtOH 70 % de *C. verbenacea* (0,02, 0,2 e 2,0 %; m/m), baseadas no maior valor de CE_{50} obtido nas análises antioxidantes pelo método da captura do radical $O_2^{\cdot-}$, sendo as duas últimas 10 e 100 vezes maiores que a primeira. Para que o extrato se tornasse solúvel à formulação, foi necessário solubilizá-lo primeiro em 3 % (m/m) de etanol 70 % e 3 % (m/m) de propilenoglicol e, após, acrescentado à FB.

As formulações foram submetidas à avaliação *in vitro* de fator de proteção solar (FPS) utilizando o equipamento Optometrics[®] SPF-290S seguindo as determinações do fabricante. Para isto foram aplicados 110,0 mg de formulação sobre uma fita Transpore[®] a fim de se obter um filme de amostra de 2 mg/cm². Em seguida, essa fita foi submetida à incidência de radiação UV (290-400 nm) por uma lâmpada de xenônio. As leituras foram repetidas 12 vezes e o FPS foi calculado pelo *software* SPF, segundo Kale et al. (2010) e Duraisamy et al. (2011).

Para verificar se o EtOH 70 % de *C. verbenacea* potencializa o FPS de filtros solares químicos, a formulação foi acrescida de etilhexil metoxicinamato (*ethylhexyl methoxycinnamate*) (4,0 %; m/m) e avaliada pelo mesmo método.

Os resultados obtidos da avaliação do FPS para as formulações testadas foram submetidos à análise estatística utilizando o programa Statgraphics Centurion XV versão 15.1.02.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS DE *C. verbenacea*

A partir da relação entre massa inicial de droga vegetal utilizada para obter os extratos e a massa final do extrato seco, foram calculados os rendimentos (m/m) obtendo-se os seguintes valores: 13,0 % para o extrato EtOH (massa inicial = 1.000,0 g; massa final = 130,0 g), 21,0 % para o extrato EtOH 70 % (massa inicial = 1.000,0 g; massa final = 211,0 g) e 6,0 % para o

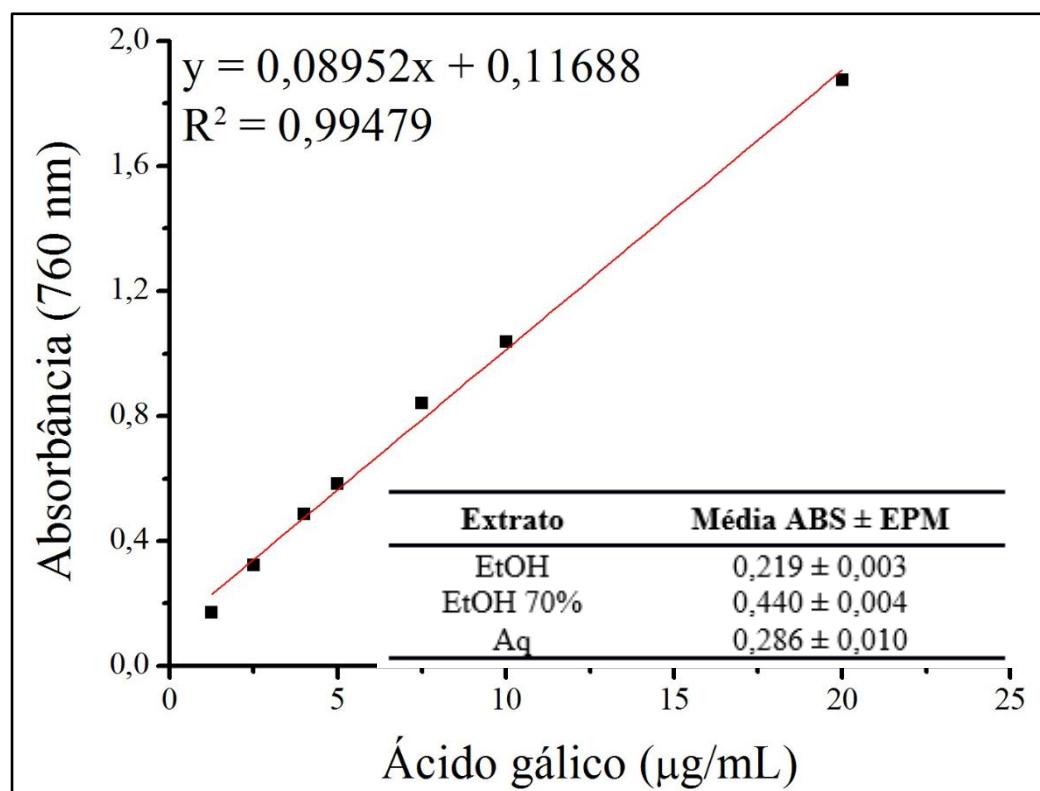
extrato Aq (massa inicial = 50,0 g; massa final = 3,0 g). Dentre os solventes utilizados para a extração da droga vegetal, o hidroetanólico 70 % foi o que proporcionou maior rendimento.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

O teor de compostos fenólicos totais presentes dos extratos de *C. verbenacea* foi determinado utilizando uma curva analítica do ácido gálico, como padrão externo na quantificação (Figura 16). Os resultados foram determinados a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do ácido gálico e foram expressos em miligramas de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por grama de extrato de *C. verbenacea*.

Os valores de absorvância real (absorvância da amostra - absorvância do branco) obtidos para os extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq de *C. verbenacea* na determinação de compostos fenólicos totais estão representados na Figura 16.

Figura 16 - Curva analítica do ácido gálico.



Nota: A tabela inserida representa os valores de absorvância reais obtidos para os extratos de *C. verbenacea* na determinação de compostos fenólicos totais. (ABS) absorvância; (EPM) erro padrão da média.

Considerando o valor de absorvância real dos extratos EtOH, EtOH 70% e Aq, a equação da reta que descreve a curva analítica do ácido gálico e a concentração das amostras (25,0 µg/mL) foi determinado que os extratos de *C. verbenacea* contêm 4,56, 14,44 e 7,56 µg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg de extrato, respectivamente, o que equivalem a 45,6, 144,4 e 75,6 mg de CFEAG por grama de extrato seco, ou também, 5 %, 14 % e 8 % (m/m) de compostos fenólicos totais.

Dentre os três solventes utilizados no processo extrativo para comparar o teor de compostos fenólicos totais, o solvente com polaridade intermediária (etanol 70 %) se mostrou o mais eficiente.

A água utilizada como solvente extrator é capaz de extrair ácidos orgânicos, açúcares, proteínas/peptídeos solúveis, aminoácidos resultando em extratos com muitas impurezas que podem interferir na quantificação dos compostos fenólicos. Já em associação com solventes orgânicos, contribui para melhorar a extração de compostos fenólicos por criar um meio menos polar do que a água (CHIRINOS et al., 2007; LAPORNIK; PROSEK; WONDRA, 2005; LIYANA-PATHIRANA; SHAHIDI, 2005).

Michielin et al. (2011) e Santi et al. (2014) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de extratos obtidos por diferentes métodos e solventes, bem como frações do extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea* pelo reagente Folin-Ciocalteu. Dentre os extratos analisados, os valores obtidos foram: 79,5 mgCFEAG/g (maceração) e 97,0 mgCFEAG/g (Sohxlet) para o extrato etanólico; 187,0 e 102,0 mgCFEAG/g (Sohxlet) para os extratos hidroetanólico 25 % e 50 %, respectivamente; e 111,0 mgCFEAG/g (Sohxlet) e 183,5 mgCFEAG/g (infusão) para o extrato aquoso.

Michielin et al. (2011) apontaram que apesar das frações diclorometânica e acetato etílico do extrato etanólico obtido por maceração terem se mostrado fontes ricas de compostos fenólicos (114,0 e 358,0 mgCFEAG/g, respectivamente), seu rendimento foi muito baixo (2,69 % e 0,26 %; m/m, respectivamente). Dos resultados analisados de todos os extratos e frações, foi possível concluir que os solventes menos polares extraíram menor quantidade de compostos fenólicos, enquanto que os de polaridade intermediária e muito polares extraíram mais substâncias fenólicas.

Como já foi evidenciado no estudo de Michielin et al. (2011), o resultado obtido por Santi et al. (2014) de teor de compostos fenólicos totais para a fração acetato etílico do extrato etanólico obtido por maceração foi o maior (311,4 mgCFEAG/g), porém com baixo rendimento.

O extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* apresentou maior teor de compostos fenólicos totais quando comparado aos extratos EtOH e Aq, além daqueles apresentados pela literatura como os extratos acetato etílico (72,0 mgCFEAG/g), acetônico (82,0 mgCFEAG/g), aquoso (111,0 mgCFEAG/g), diclorometânico (82,0 mgCFEAG/g), etanólico (97,0 mgCFEAG/g), hexânico (42,0 mgCFEAG/g) e hidroetanólico 50 % (102,0 mgCFEAG/g) (MICHIELIN et al., 2011), evidenciando a eficiência do solvente etanol 70 % em extrair compostos fenólicos.

A seguir estão apresentados dados da literatura para comparar com os resultados do presente trabalho. Estes estudos foram escolhidos baseados no tipo de extrato vegetal, utilizando líquidos extratores como etanol, soluções hidroetanólicas e água. Isto também se aplica à comparação dos resultados com os dados da literatura nos itens 4.3 e 4.4.

Majhenic, Skerget e Knez (2007) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de extrato hidroetanólico 60 % e aquoso de sementes de *P. cupana*. Os valores obtidos foram de 166,0 mgCFEAG/g para o extrato hidroetanólico 60 %, aproximadamente, 1,15 vezes maior que o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (144,4 mgCFEAG/g), e 181,0 mgCFEAG/g para o extrato aquoso, 2,4 vezes maior que o extrato Aq de *C. verbenacea* (75,6 mgCFEAG/g), aproximadamente.

Almeida (2013) avaliou o extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum* L. para obter o teor de compostos fenólicos totais. O valor obtido foi de 70,4 mgCFEAG/g, aproximadamente, 0,9 vezes menor que o extrato Aq de *C. verbenacea* (75,6 mgCFEAG/g). Mafioleti et al. (2013) também avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de extrato hidroetanólico 70 % de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. O valor obtido foi de 166,1 mgCFEAG/g, 1,15 vezes maior que o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (144,4 mgCFEAG/g), aproximadamente.

Castro (2014) avaliou os extratos hidroetanólicos 70 % da torta e das sementes verdes de *Coffea arabica* L. para obter o teor de compostos fenólicos totais. Os valores obtidos foram de 140,0 mgCFEAG/g para o extrato da torta e 155,0 mgCFEAG/g para o extrato das sementes, valores muito próximos ao obtido para o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (144,4 mgCFEAG/g).

O método de determinação de teor de compostos fenólicos totais pelo reagente Folin-Ciocalteu não pode fornecer valores exatos, já que outros compostos redutores, como o ácido ascórbico, podem reagir com o ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no reagente, formando o complexo azul de molibdênio. Além disso, ele reage com alguns compostos não fenólicos (ex. açúcares redutores) que também apresentam atividade antioxidante, sendo considerado por alguns autores um método para determinar a capacidade antioxidante total, já

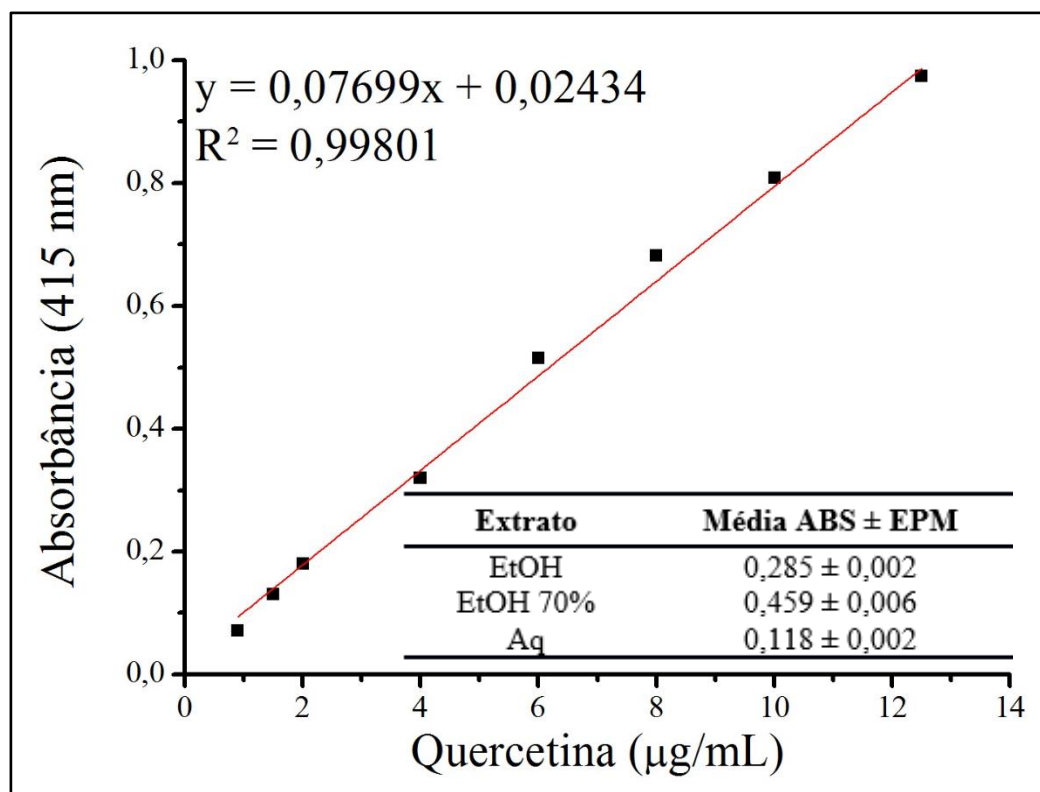
que apresenta elevada correlação com outros métodos antioxidantes, devido às similaridades químicas presentes nestes ensaios (EVERETTE et al., 2010; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS

Flavonoides são metabólitos secundários da classe dos compostos fenólicos que apresentam alto poder antioxidante (KIM et al., 1997; PIETTA, 2000; PINNELL, 2003). Devido ao interesse por substâncias naturais que podem agir como antioxidantes, o teor de flavonoides nos extratos de *C. verbenacea* foi avaliado. Foi obtida uma curva analítica com a quercetina (Figura 17) para que o resultado fosse expresso em mg de flavonoides equivalentes a quercetina (FLAVEQ) por grama de extrato de *C. verbenacea*.

Os valores das absorvâncias reais (absorvância da amostra - absorvância do branco) obtidos para os extratos de *C. verbenacea* na determinação de flavonoides totais estão representados na Figura 17.

Figura 17 - Curva analítica da quercetina.



Nota: A tabela inserida apresenta os valores de absorvância reais obtidos para os extratos de *C. verbenacea* na determinação de compostos flavonoides. (ABS) absorvância; (EPM) erro padrão da média.

Considerando o valor real de absorvência das amostras dos extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq, a equação da reta que descreve a curva analítica da quercetina (Figura 17) e a concentração de extrato de *C. verbenacea* utilizada durante o experimento (100,0 µg/mL para o extrato EtOH e 150 µg/mL para os extratos EtOH 70 % e Aq) foram determinados que os extratos de *C. verbenacea* contêm 3,38, 3,76 e 0,81 µg de FLAVEQ por 100 µg de extrato, respectivamente, podendo, também, ser expresso em 33,8, 37,6 e 8,10 mg de FLAVEQ por grama de extrato seco ou 3 %, 4 % e 1 % (m/m) de flavonoides totais.

Santi et al. (2014) também avaliaram o teor de flavonoides totais de extratos obtidos por maceração e infusão, bem como de frações do extrato das folhas de *C. verbenacea*. Dentre os extratos e frações analisadas, o extrato etanólico obteve o maior teor de flavonoides totais (65,0 mgFLAVEQ/g), enquanto que o extrato aquoso obteve o menor teor (24,7 mgFLAVEQ/g).

Dentre os três extratos analisados nesta pesquisa (EtOH, EtOH 70 % e Aq), o extrato EtOH 70 % apresentou o maior teor de flavonoides totais e, também, o extrato EtOH apresentou maior teor de flavonoides totais quando comparado ao extrato Aq, corroborando com os dados apresentados na literatura.

Ji-yong et al. (2012) utilizaram o extrato hidroetanólico 70 % das folhas verdes, verdes/amarelas e amarelas de *Ginkgo biloba* L. para determinar o teor de flavonoides totais. Os valores obtidos foram de 7,55, 15,72 e 26,39 mgFLAVEQ/g, aproximadamente 5,0, 2,4 e 1,4 vezes menor que o valor obtido para o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (37,6 mgFLAVEQ/g), respectivamente.

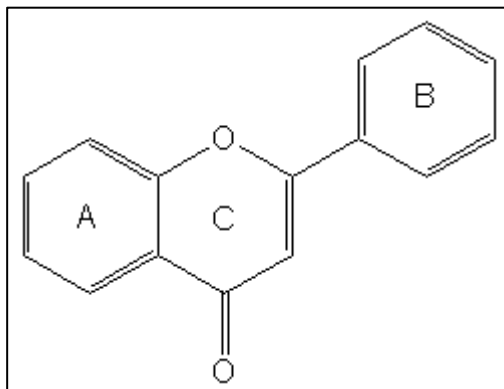
Vongsak et al. (2013) analisaram os extratos hidroetanólicos 70 % de folhas frescas e secas de *Moringa oleifera* L. para obter o teor flavonoides totais que foi de 19,0 e 53,5 mgFLAVEQ/g, 2 vezes menor e 1,4 vezes maior que o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea*, respectivamente.

Castro (2014) também avaliou o teor de flavonoides totais para os extratos hidroetanólicos 70 % da torta e das sementes verdes de *C. arabica*, obtendo os respectivos valores: 39,6 e 51,2 mgFLAVEQ/g, cerca de 1,05 e 1,4 vezes maior que o valor obtido para o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (37,6 mgFLAVEQ/g), respectivamente.

Os flavonoides (Figura 18) são a classe de metabólitos secundários pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos que possuem alta atividade antioxidante e propriedades quelantes. Um dos fatores que justifica a presença abundante dos flavonoides no reino vegetal é a capacidade que alguns deles apresentam em alterar as propriedades de absorção de radiação ultravioleta para radiações menos energéticas. Portanto, protegem a planta, principalmente as

folhas, da radiação UV, que causa danos fisiológicos, com conseqüente danos ao material genético (HARBONE; WILLIAMS, 2000).

Figura 18 - Estrutura básica de um flavonoide (flavona).



A atividade antioxidante desses compostos está diretamente relacionada com a capacidade de captura de radicais livres, que são produzidos naturalmente pelo nosso organismo no processo oxidativo, e sua estrutura química. Geralmente esta atividade depende da substituição dos grupos hidroxilas e dos anéis aromáticos, que, por ressonância, ocorre doação do próton e estabilização do elétron. Outros possíveis mecanismos envolvidos na atividade antioxidante dos flavonoides ocorrem pela inibição de enzimas oxidantes ou ativação de enzimas antioxidantes, bem como pela quelação de metais (PIETTA, 2000; POURMORAD; HOSSEINIMEHR; SHAHABIMAJD, 2006; SHARIFIFAR; DEGHNNUDEN; MIRTAJALDINI, 2009).

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Há 60 anos, Harman (1956) inspirou o desenvolvimento de muitos trabalhos científicos quando sugeriu que os radicais livres participavam de eventos fisiológicos e, particularmente, do processo de envelhecimento.

Nas pesquisas de interação de diversos compostos com radicais livres, é comum utilizar radicais-modelo, ou seja, não biológicos, destacando-se entre eles os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} para avaliar o potencial desta interação (PRABHU et al., 2011; RE et al., 1999).

Considerando a capacidade de captura de determinadas ERO por extratos vegetais, foi definido utilizar um conjunto de análises para avaliar a ação antioxidante, a fim de obter maior representatividade, do que apenas utilizar uma única medida.

A capacidade antioxidante foi avaliada com diferentes espécies reativas, sendo elas radicalares ou não, em sistemas-modelo, tais como DPPH• e ABTS^{•+} e o ensaio do descoramento da crocina (simulação da lipoperoxidação), ou biomoléculas representadas pelo HOCl, O₂^{-•} e H₂O₂. Os três tipos de extratos foram analisados apenas pelo método do DPPH•, a fim de selecionar o melhor extrato, tendo em vista, também, os outros resultados de determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais. A partir dessas comparações, o extrato EtOH 70 % foi selecionado para ser analisado nos outros ensaios.

4.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical DPPH•

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq de *C. verbenacea* foi realizada pelo método da captura do radical DPPH•. Primeiramente, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações (0,88 a 5,28 µg/mL) de ácido ascórbico, substância padrão com atividade antioxidante. Com os resultados obtidos foi possível obter uma curva analítica do ácido ascórbico (Figura 19) para certificar que o método foi efetivo para determinação da atividade antioxidante e, também, para comparar o potencial antioxidante dos extratos de *C. verbenacea* com o de uma substância pura com conhecida ação antioxidante. A porcentagem de captura do radical DPPH• foi calculada pela Equação 1.

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\max} - A_{\text{amostra}}}{A_{\max}} \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

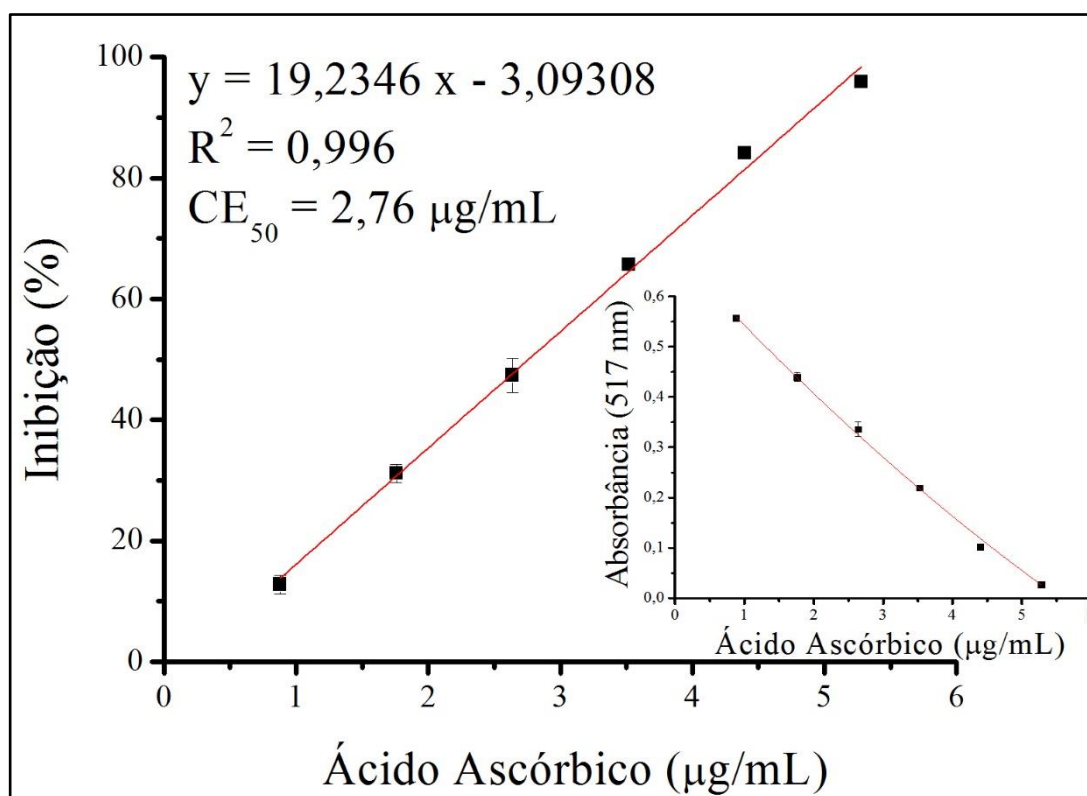
Onde:

% Inibição = porcentagem de captura (inibição) da espécie reativa;

A_{max} = absorvância da espécie reativa na ausência da amostra;

A_{amostra} = absorvância da espécie reativa na presença da amostra.

Figura 19 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH[•] *versus* a concentração de ácido ascórbico (µg/mL).

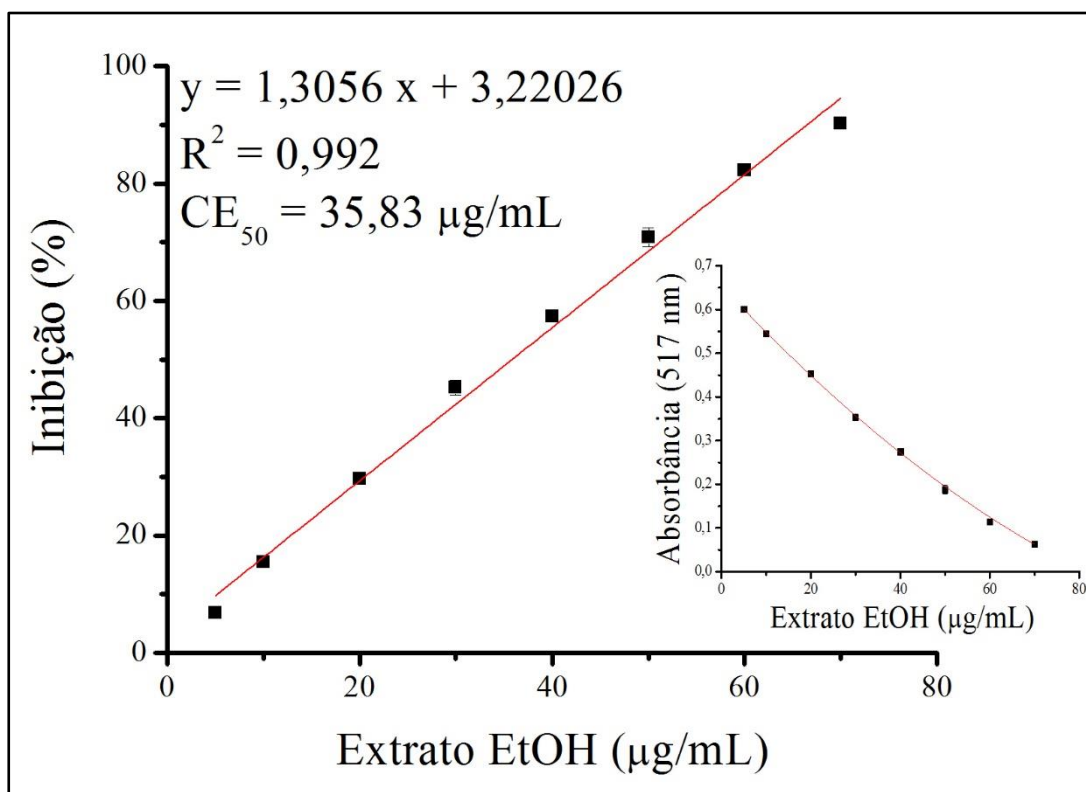


Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DPPH[•] (517 nm) *versus* a concentração de ácido ascórbico (µg/mL).

A partir da equação da reta (Figura 19) foi possível calcular o valor de CE_{50} , que corresponde à concentração de ácido ascórbico necessária para capturar 50 % dos radicais DPPH[•] em solução. As análises foram feitas em triplicata e os resultados são as médias das inibições.

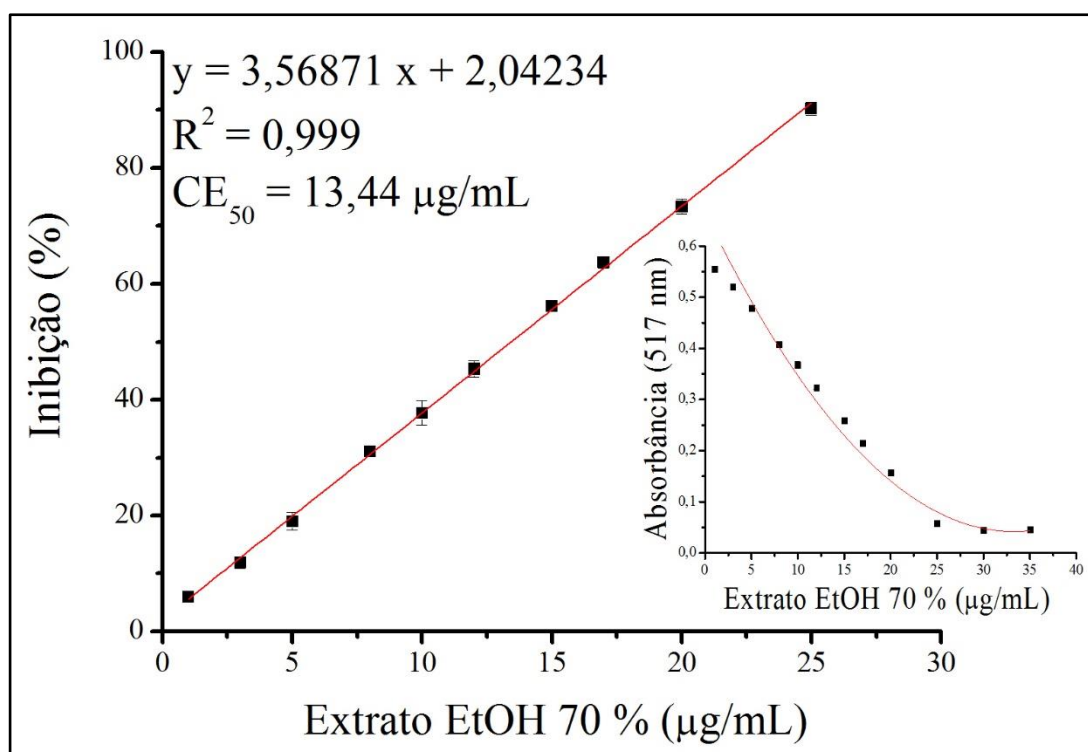
Em seguida, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações dos extratos de *C. verbenacea* (5,0 a 70,0 µg/mL para o extrato EtOH; 1,0 a 35,0 µg/mL para o extrato EtOH 70 %; 5,0 a 80,0 µg/mL para o extrato Aq) e obtidos os gráficos das concentrações dos extratos *versus* a porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH[•] (Figuras 20 a 22).

Figura 20 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH^{*} versus a concentração de extrato etanólico (EtOH) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



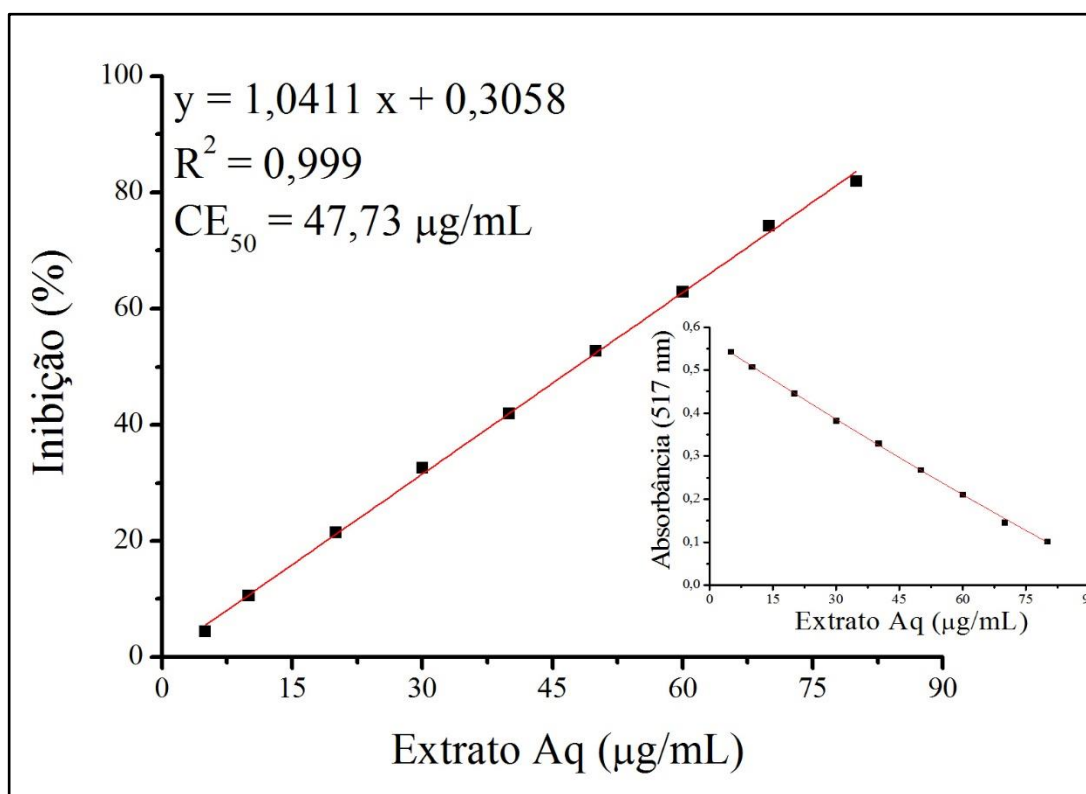
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DPPH^{*} (517 nm) versus a concentração de extrato EtOH ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 21 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH* versus a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DPPH* (517 nm) versus a concentração de extrato EtOH 70 % ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 22 - Porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH* versus a concentração de extrato aquoso (Aq) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DPPH* (517 nm) versus a concentração de extrato Aq ($\mu\text{g/mL}$).

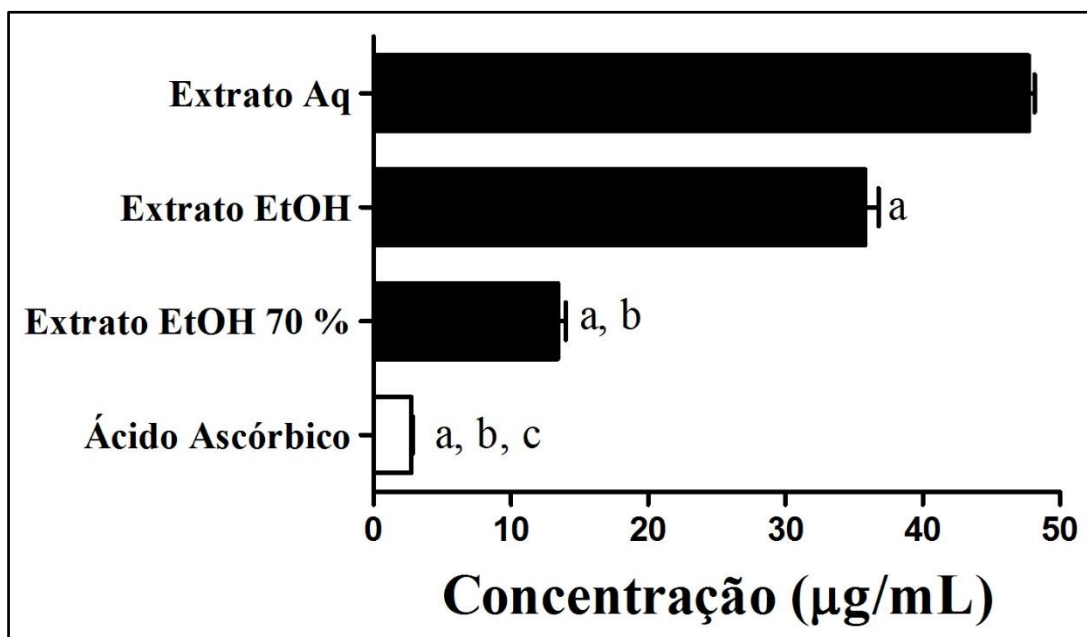
O radical DPPH* apresenta uma coloração violeta e absorção de luz visível em 517 nm. Quando uma solução de uma substância, que possui atividade antioxidante, é adicionada a uma solução contendo este radical livre, ocorre uma mudança na coloração da solução devido à capacidade dessas substâncias capturarem o radical DPPH* que, em sua forma reduzida, apresenta coloração amarelada e não absorve luz em 517 nm.

Extratos vegetais normalmente contêm substâncias as quais lhes conferem coloração, o que pode provocar absorção no comprimento de onda específico da reação do radical DPPH* com substâncias antioxidantes. Para minimizar esta interferência, as soluções dos extratos em todas as concentrações utilizadas foram avaliadas fotometricamente em 517 nm. Contudo, os extratos nas concentrações testadas não absorveram neste comprimento de onda, não interferindo nos resultados obtidos.

A partir das equações das retas (Figuras 20 a 22) foi possível calcular o valor de CE_{50} , correspondendo à concentração de extrato necessária para capturar 50 % dos radicais livres presentes em solução. Para os extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq, os valores obtidos foram de 35,83 $\mu\text{g/mL}$, 14,44 $\mu\text{g/mL}$ e 47,73 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Na Figura 23 estão apresentados os respectivos valores de CE_{50} dos extratos e padrão para a captura do DPPH^{*}, cujos valores em ordem crescente de CE_{50} variaram de ~ 2,0 até 50,0 $\mu\text{g/mL}$: ácido ascórbico < extrato EtOH 70 % < extrato EtOH < extrato Aq.

Figura 23 - Inibição (captura) do DPPH^{*} (CE_{50} $\mu\text{g/mL}$) pelo padrão e extratos.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato Aq; b, diferenças com extrato EtOH; c, diferenças com extrato EtOH 70 %.

Michielin et al. (2011) e Santi et al. (2014) realizaram o estudo comparativo da atividade antioxidante frente ao radical DPPH^{*} de extratos obtidos por diferentes métodos e solventes e frações do extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea*. Dentre os vários tipos de extratos analisados, os valores de CE_{50} obtidos para os extratos etanólico foram de 82,5 $\mu\text{g/mL}$ (Soxhlet) e 316,7 $\mu\text{g/mL}$ (maceração); para os extratos hidroetanólicos 25 e 50% foram de 27,4 e 29,0 $\mu\text{g/mL}$ (Soxhlet), respectivamente; e para o extrato aquoso foram de 38,0 $\mu\text{g/mL}$ (Soxhlet) e 133,2 $\mu\text{g/mL}$ (maceração).

Vale ressaltar que quanto menor for o valor de CE_{50} , mais eficiente é a atividade antioxidante do extrato. Michielin et al. (2011) e Santi et al. (2014) analisaram também a fração acetato etílica do extrato etanólico obtido por maceração. Esta fração obteve o melhor CE_{50} (9,2 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente), porém foram frações que apresentaram rendimento muito baixo. De qualquer forma esta informação sugere a relevância de substâncias de média polaridade na ação antioxidante, como por exemplo flavonoides na forma de agliconas pouco hidroxiladas.

Com relação aos extratos obtidos por Soxhlet, os extratos hidroetanólicos 50 % e 25 % apresentaram menores valores de CE_{50} sugerindo que as principais substâncias responsáveis

pela atividade antioxidante possuem afinidade com solventes mais polares como água e etanol; como foi também observado no presente estudo, o extrato EtOH 70 % apresentou menor valor de CE_{50} , ou seja, foi a menor concentração necessária para capturar 50 % do radical DPPH[•] em solução. Comparando-se este resultado com os resultados da literatura, é possível observar que o extrato EtOH 70 % foi similar ou tão eficiente quanto as frações acetato etílico do extrato etanólico obtido por maceração, mostrando como esta mistura de solventes foi eficaz na extração de substâncias antioxidantes.

Silva et al. (2007) realizaram uma pesquisa de atividade antioxidante com extratos supercríticos de *C. verbenacea* através do método do radical DPPH[•]. Os resultados não foram promissores, tendo uma atividade antioxidante 117 vezes menor que a do padrão rutina. Como o CO₂ utilizado para a extração tem característica apolar, os compostos extraídos da planta também apresentam esta característica, que possuem baixa atividade antioxidante (KITZBERGER et al., 2007).

Bodini (2015) desenvolveu um filme de desintegração oral (FDO) contendo extrato etanólico 80 % das folhas e talos de *C. verbenacea* obtidos por digestão à 50° C por 1h e avaliou a atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•]. Foram analisadas três concentrações diferentes do extrato no FDO contendo 0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonoides (previamente quantificados) por FDO que obtiveram valores de porcentagem de inibição de 69,6, 74,3 e 79,8 %, respectivamente. Mesmo incorporado a uma forma farmacêutica, o extrato obtido desta espécie vegetal apresentou grande potencial antioxidante para este sistema-modelo de captura de radical livre.

Almeida (2013) avaliou a atividade antioxidante do extrato aquoso de *A. nodosum* pelo método do DPPH[•] e obteve um CE_{50} de 51,88 µg/mL, cerca de 1,1 vezes maior que o CE_{50} obtido para o extrato Aq de *C. verbenacea* (47,73 µg/mL). Castro (2014) também avaliou a atividade antioxidante pelo mesmo método dos extratos hidroetanólicos 70 % de torta e sementes verdes de *C. arabica*, obtendo os respectivos valores de CE_{50} : 17,0 e 17,52 µg/mL, aproximadamente, uma média de 1,3 vezes maior que o CE_{50} do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (13,44 µg/mL).

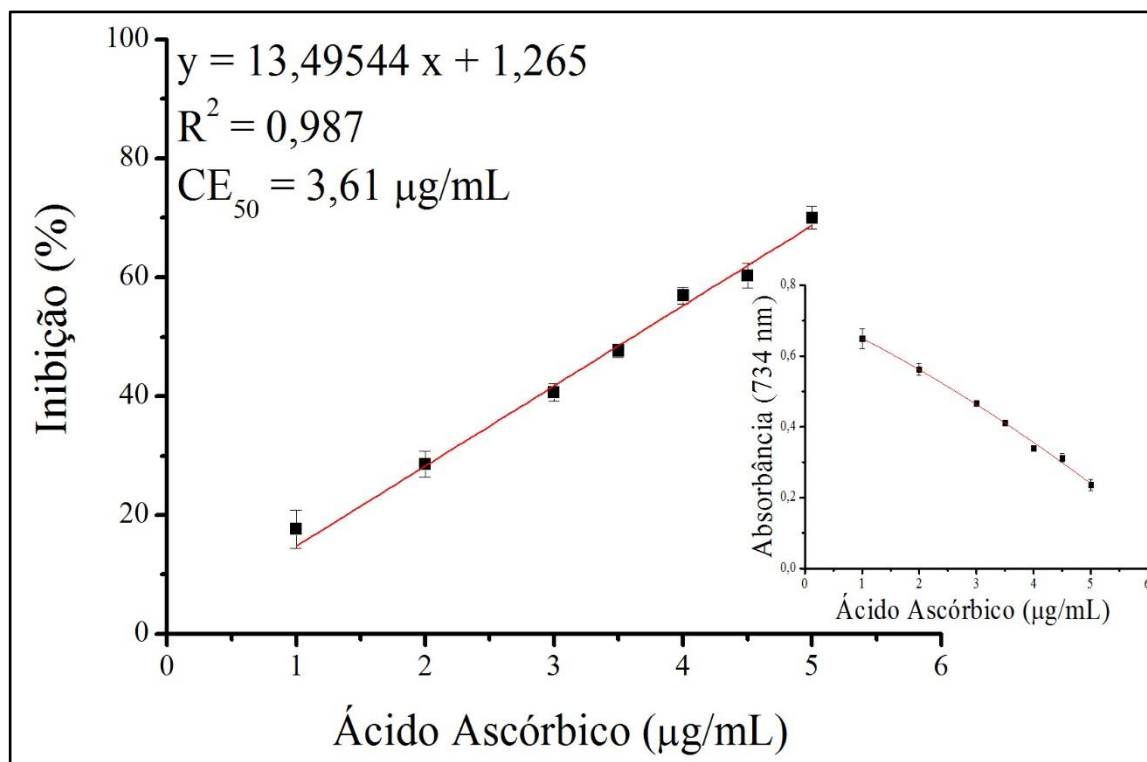
Vongsak et al. (2013) analisaram o extratos hidroetanólico 70 % de folhas secas de *Moringa oleifera* L. para avaliar a atividade antioxidante frente ao DPPH[•]. O valor de CE_{50} obtido foi de 62,94 µg/mL, cerca de 4,7 vezes maior que o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (13,44 µg/mL).

4.4.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS^{•+}

Neste ensaio observa-se a descoloração do meio reacional no qual, após a adição de um antioxidante, ocorre a redução da absorbância em 734 nm, sendo proporcional à concentração e à atividade antioxidante. O ensaio de captura do radical ABTS^{•+} é considerado um ensaio simples de triagem laboratorial, apresentando algumas vantagens por ser colorimétrico, não requerer equipamentos analíticos sofisticados e fornecer uma boa estimativa de atividade antioxidante de substâncias puras ou de misturas complexas, como extratos vegetais, por exemplo (KHALIL; PEPATO; BRUNETTI, 2008; PELLEGRINI et al., 1999).

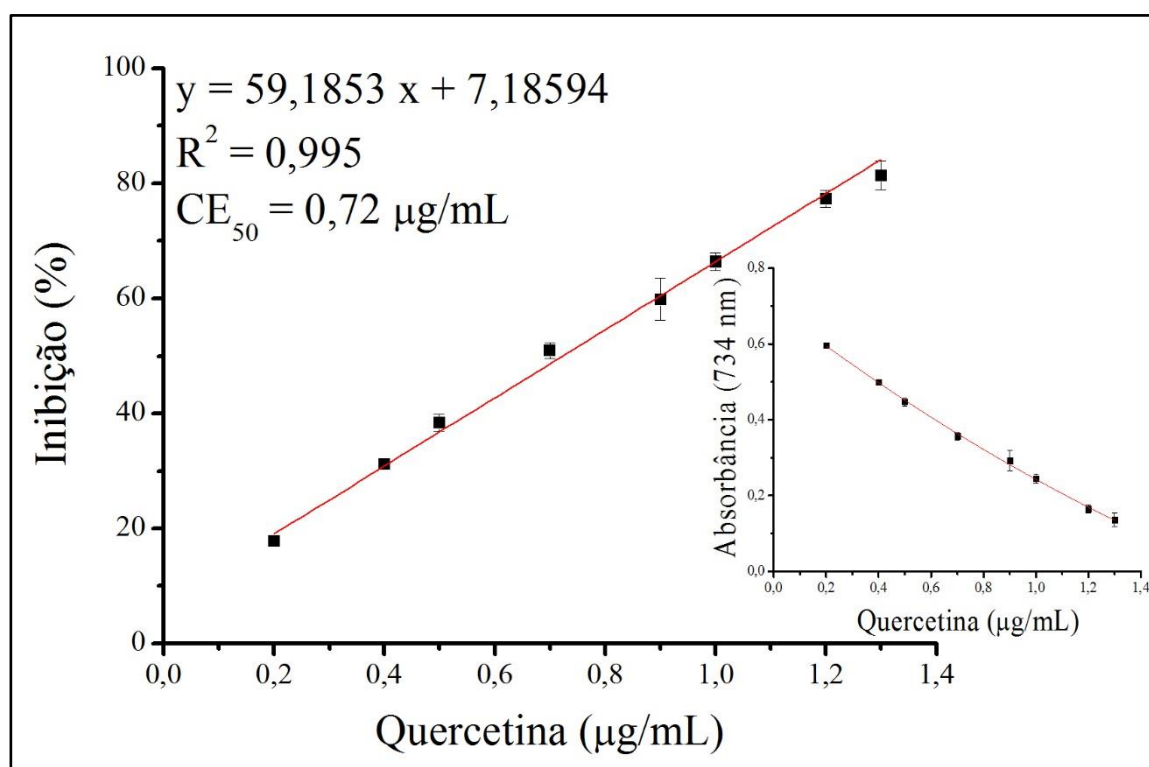
A porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS^{•+} foi calculada pela Equação 1. Os resultados obtidos foram expressos em concentrações do extrato EtOH 70 % ou padrões (ácido ascórbico, quercetina e trolox) que neutralizaram 50 % do radical (CE₅₀). Os valores foram obtidos através das equações da reta (Figuras 24 a 27). As análises foram feitas em triplicata e os resultados são as médias das inibições.

Figura 24 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS^{•+} *versus* a concentração de ácido ascórbico (µg/mL).



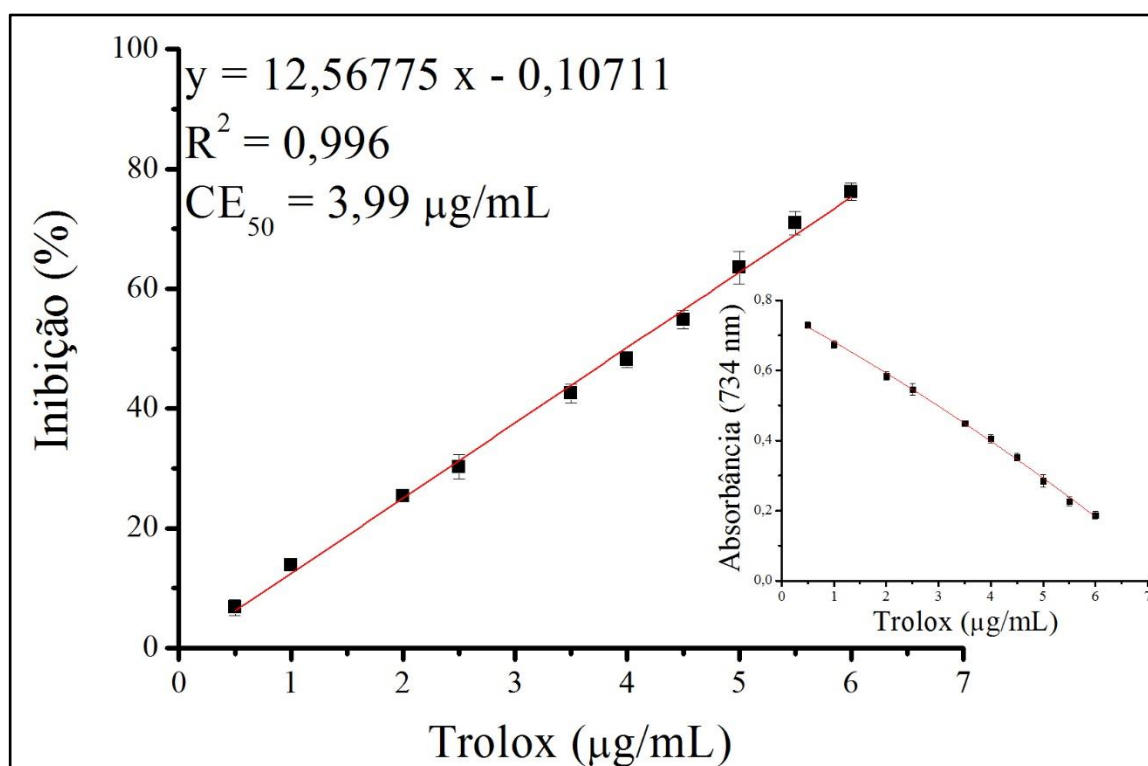
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do ABTS^{•+} (734 nm) *versus* a concentração de ácido ascórbico (µg/mL).

Figura 25 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS^{•+} *versus* a concentração de quercetina (µg/mL).



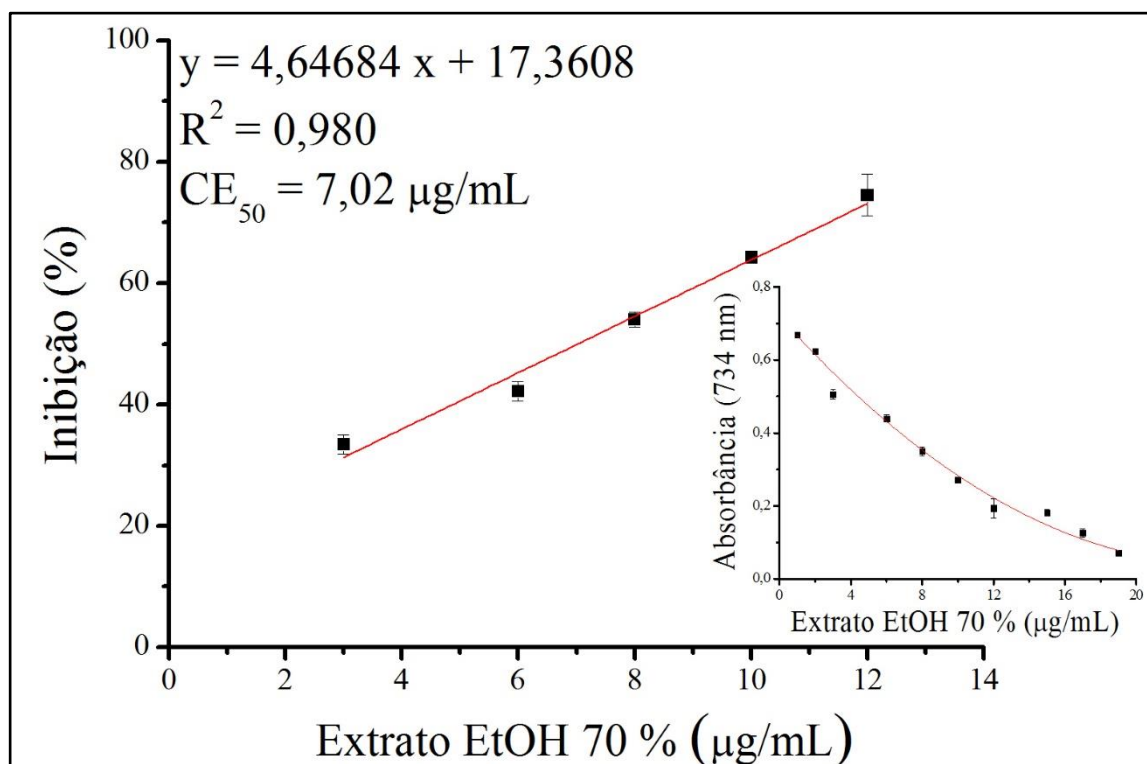
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do ABTS^{•+} (734 nm) *versus* a concentração de quercetina (µg/mL).

Figura 26 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS^{•+} *versus* a concentração de trolox (μg/mL).



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do ABTS^{•+} (734 nm) *versus* a concentração de trolox (μg/mL).

Figura 27 - Porcentagem de inibição (captura) do radical ABTS^{•+} versus a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) (µg/mL) de folhas de *C. verbenacea*.

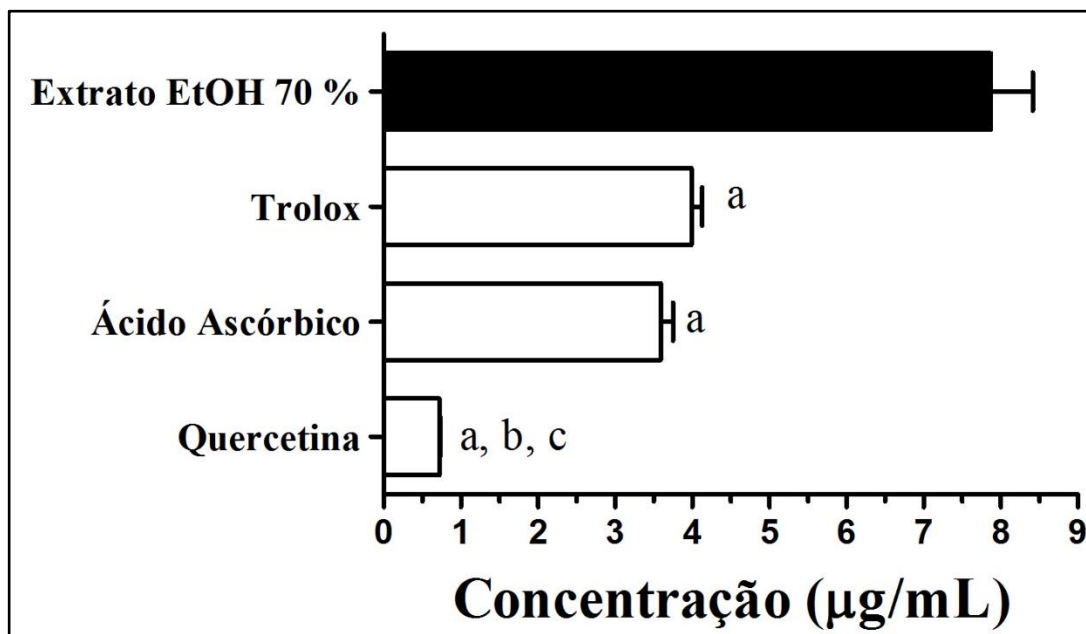


Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do ABTS^{•+} (734 nm) versus a concentração de extrato EtOH 70 % (µg/mL).

A partir das equações das retas (Figuras 24 a 27) foi possível calcular o valor de CE_{50} , correspondendo à quantidade de extrato necessária para capturar 50 % dos radicais livres presentes em solução. Para o extrato EtOH 70 % e padrões ácido ascórbico, quercetina e trolox os valores obtidos foram de 7,02 µg/mL, 3,61 µg/mL, 0,72 µg/mL e 3,99 µg/mL, respectivamente.

Na Figura 28 estão apresentados os respectivos valores de CE_{50} do extrato e padrões para a captura do ABTS^{•+}, cujos valores em ordem crescente de CE_{50} variaram de ~ 0,7 até 7,0 µg/mL: quercetina < ácido ascórbico < trolox < extrato EtOH 70 %.

Figura 28 - Inibição (captura) do ABTS⁺ (CE₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato EtOH 70 %; b, diferenças com trolox; c, diferenças com ácido ascórbico.

Apesar do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* apresentar uma concentração efetiva maior que a dos padrões testados, ainda assim é possível afirmar que esta concentração é baixa e muito próxima às concentrações efetivas do ácido ascórbico e trolox. Vale ressaltar que estas substâncias são puras e utilizadas como padrões antioxidantes, sendo o extrato uma mistura complexa e variada de substâncias.

Para efeito comparativo, foi convertido o valor do CE₅₀ do extrato EtOH 70 % (7,02 µg/mL) para CAET, obtendo 2.271,0 µmol/g de extrato. Michielin et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante pelo método do ABTS⁺ de extratos de *C. verbenacea* obtidos por diferentes métodos e solventes. O extrato hidroetanólico 25 % apresentou CAET (1.031,0 µmol/g), aproximadamente, 2 vezes menor que o EtOH 70 % (2.271,0 µmol/g). O extrato hidroetanólico 50 % também foi avaliado, apresentando 584,0 µmol/g de CAET, sendo, aproximadamente, 4 vezes menor que o extrato EtOH 70 %. Portanto, foi possível observar que os extratos hidroetanólico 25 % e 50 % foram menos eficientes em capturar o radical ABTS⁺ do que o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea*.

Não foram encontrados outros relatos na literatura sobre a atividade antioxidante frente ao radical ABTS⁺ de extratos ou produtos obtidos a partir da *C. verbenacea*.

Chiari (2011) avaliou a atividade antioxidante frente ao radical ABTS⁺ do extrato hidroetanólico 70 % de *Psidium guajava* L. e o CE₅₀ encontrado foi de 114,4 µg/mL, aproximadamente 16,3 vezes maior que o encontrado para o extrato EtOH 70 % de *C.*

verbenacea (7,02 µg/mL). Castro (2014) também avaliou a atividade antioxidante pelo mesmo método dos extratos hidroetanólicos 70 % de torta e sementes verdes de *C. arabica*, obtendo os respectivos valores de CE₅₀: 13,60 e 12,06 µg/mL, aproximadamente, uma média de 1,8 vezes maior que o CE₅₀ do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (7,02 µg/mL).

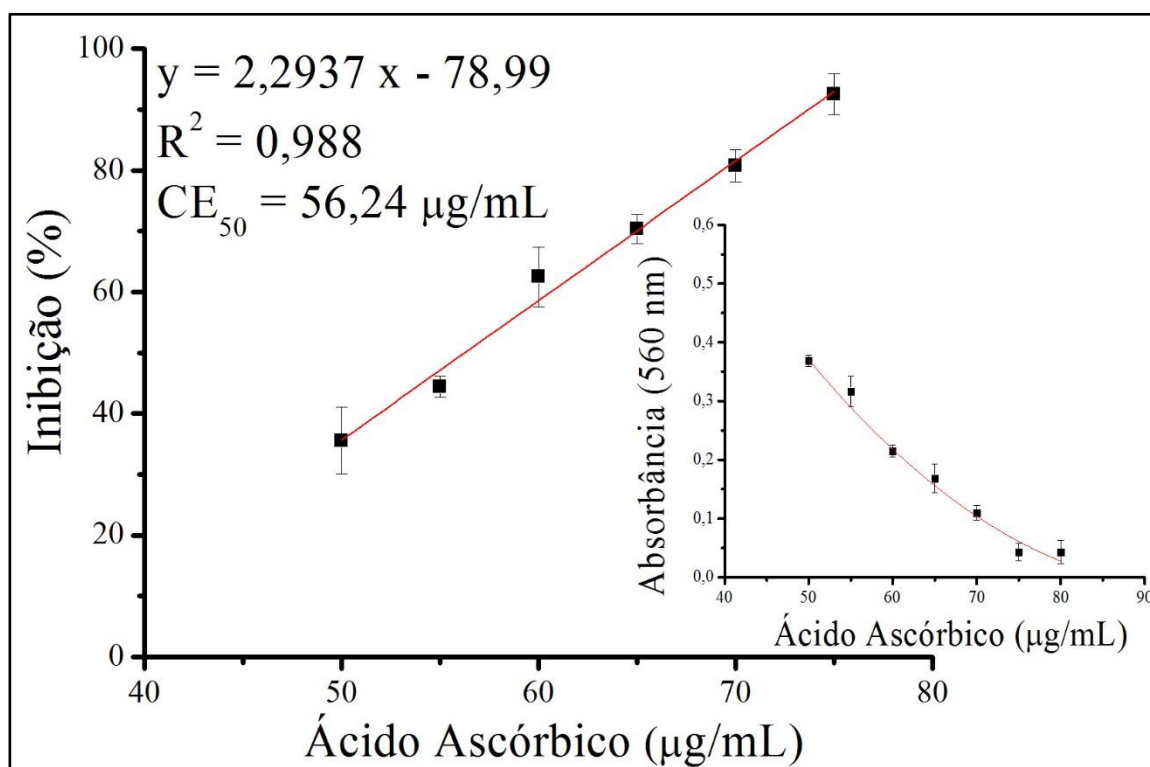
Lordêllo (2015) avaliou a atividade antioxidante frente ao radical ABTS^{•+} de extratos hidroetanólicos 70 % de folhas de *Mentha piperita* (CE₅₀ = 30,0 µg/mL), *Mentha rotundifolia* e *Mentha villosa*, que apresentaram os mesmos valores de CE₅₀ (40,0 µg/mL). Em comparação, estes extratos apresentaram um CE₅₀ cerca de 4,3 e 5,7 vezes maior que o do extrato EtOH 70% de *C. verbenacea* (7,02 µg/mL), respectivamente.

4.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do ânion radicalar superóxido (O₂^{-•})

O O₂^{-•} é uma ERO produzida constantemente no organismo humano em processos fisiológicos através da ativação de fagócitos, como neutrófilos, monócitos e eosinófilos, levando à produção de outras ERO e favorecendo o estresse oxidativo pelo desequilíbrio entre a capacidade antioxidante celular e a quantidade de espécies reativas presentes (CADENAS; DAVIES, 2000; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

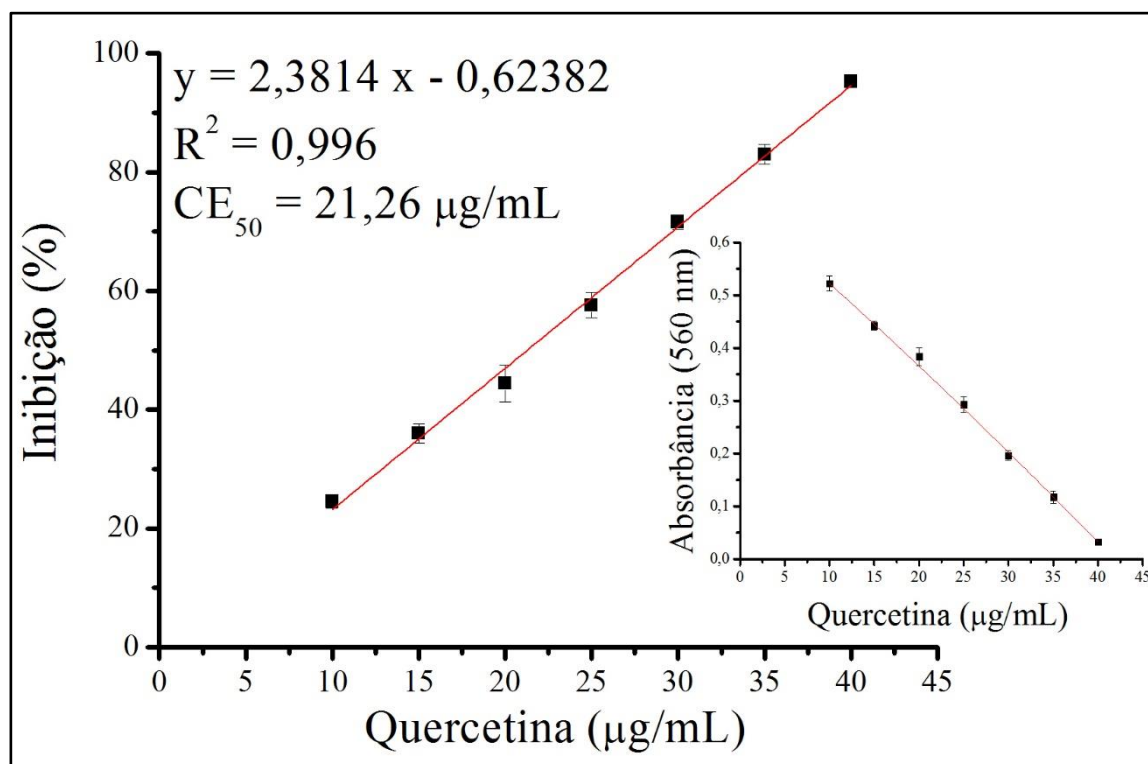
Nesta análise, a formação do ânion radicalar superóxido (O₂^{-•}) a partir do O₂ ocorre pela reação entre PMS e NADH que, então, reage com NBT para formar uma formazana de coloração violeta. O extrato EtOH 70 % e os padrões ácido ascórbico, quercetina e trolox foram testados em diferentes concentrações e os resultados obtidos foram expressos em termos de CE₅₀ obtidos através das equações das retas dos gráficos de porcentagem de inibição e calculada conforme a Equação 1 (Figuras 29 a 32). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados são as médias das inibições.

Figura 29 - Porcentagem de inibição (captura) do radical $O_2^{\cdot-}$ versus a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$).



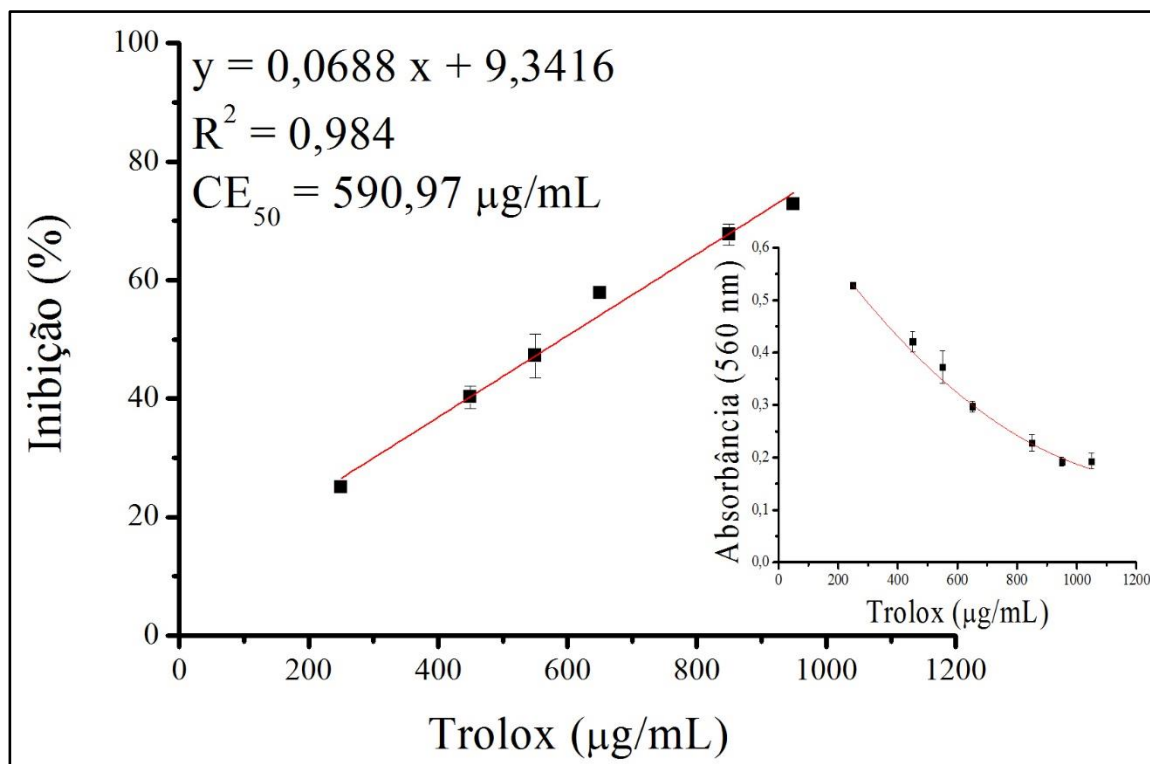
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância da formazana (560 nm) versus a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 30 - Porcentagem de inibição (captura) do radical $O_2^{\cdot-}$ versus a concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).



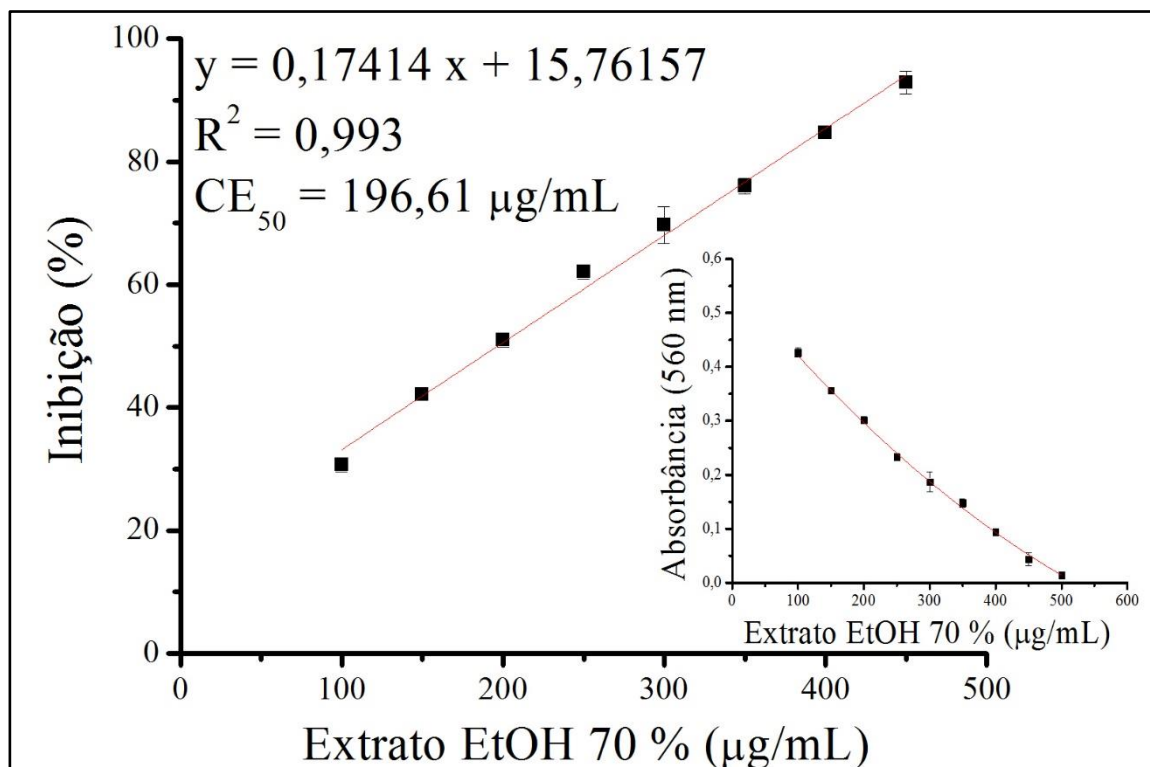
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância da formazana (560 nm) versus a concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 31 - Porcentagem de inibição (captura) do radical $O_2^{\cdot-}$ versus a concentração de trolox ($\mu\text{g/mL}$).



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância da formazana (560 nm) versus a concentração de trolox ($\mu\text{g/mL}$).

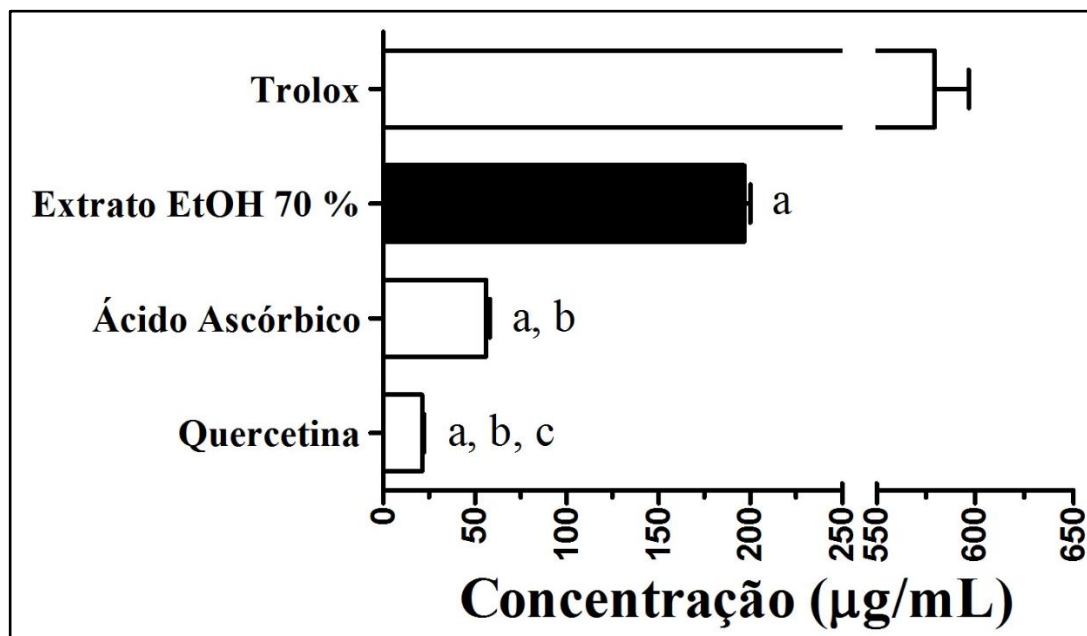
Figura 32 - Porcentagem de inibição (captura) do radical $O_2^{\cdot-}$ versus a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância da formazana (560 nm) versus a concentração de extrato EtOH 70 % ($\mu\text{g/mL}$).

Na Figura 33 estão apresentados os respectivos valores de CE_{50} do extrato e padrões para a captura do $O_2^{\cdot-}$, cujos valores em ordem crescente de CE_{50} variaram de $\sim 20,0$ até $600,0 \mu\text{g/mL}$: quercetina < ácido ascórbico < extrato EtOH 70 % < trolox.

Figura 33 - Inibição (captura) do $O_2^{\cdot-}$ (CE_{50} $\mu\text{g/mL}$), pelos padrões e extrato.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato trolox; b, diferenças com extrato EtOH 70 %; c, diferenças com ácido ascórbico.

A concentração necessária para capturar 50 % dos radicais $O_2^{\cdot-}$ em solução foi mais baixa para os padrões quercetina e ácido ascórbico. Mesmo que o extrato EtOH 70 % tenha apresentado valor de CE_{50} , aproximadamente, 10 e 4 vezes maior do que estes padrões, respectivamente, a concentração referente ao CE_{50} do extrato foi baixa, mostrando a eficácia de sua atividade antioxidante frente a este radical. Em relação ao CE_{50} do trolox, o extrato obteve uma concentração 3 vezes menor, sendo este um dado muito importante e promissor, que evidencia como uma mistura complexa de substâncias obteve maior atividade antioxidante que uma substância pura padrão. O trolox é um derivado sintético solúvel da vitamina E (anel cromanol) e não foi tão eficiente em capturar o $O_2^{\cdot-}$ em função da natureza das espécies químicas que estão reagindo com esta espécie reativa. A amostra em estudo deve conter misturas de compostos fenólicos e flavonoides, que foram mais eficazes em capturar o radical, tornando-se importante salientar que a quercetina testada também se mostrou mais eficiente que o extrato.

Michielin et al. (2011) também avaliaram a capacidade de captura do radical $O_2^{\cdot-}$ de diferentes extratos de *C. verbenacea*. A partir dos resultados de análises prévias, os autores selecionaram os extratos com maior atividade antioxidante pelos métodos do DPPH $^{\cdot}$ e ABTS $^{+\cdot}$ para realizar este ensaio. Os extratos hidroetanólicos 25 % e 50 % apresentaram melhor atividade antioxidante frente ao radical $O_2^{\cdot-}$, CE_{50} de 286,0 e 373,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. O extrato EtOH 70% analisado nesta pesquisa apresentou resultado ainda melhor, evidenciando

como esta mistura de solventes (etanol 70 %) foi eficaz em extrair substâncias antioxidantes que inibem esta espécie reativa radicalar.

Kajaria et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante frente ao radical $O_2^{\cdot-}$ de extrato hidroetanólico 30 % de partes aéreas de *Clerodendrum serratum* (L.) Moon., *Hedychium spicatum* (Ham-ex-Smith) e *Inula racemosa* Hook F., no qual os autores chamaram de extrato de *Bhāraṅgyādi*, que é a composição de um medicamento utilizado na medicina ayurvédica. Este extrato apresentou um CE_{50} de 774,70 $\mu\text{g/mL}$, cerca de 4 vezes maior que o CE_{50} obtido para o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (196,61 $\mu\text{g/mL}$).

Deuschle et al. (2015) analisaram o extrato hidroetanólico 70 % de folhas de *Calendula officinalis* L. para avaliar a sua capacidade em capturar o radical $O_2^{\cdot-}$, porém, nas concentrações testadas, entre 8,0 e 250,0 $\mu\text{g/mL}$, o máximo de % de inibição (captura) que o extrato apresentou foi de 7,0 %. Em comparação, na concentração, aproximadamente, de 200 $\mu\text{g/mL}$ do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea*, apresentou 50 % de inibição, apresentando uma capacidade antioxidante, aproximadamente, 7 vezes maior.

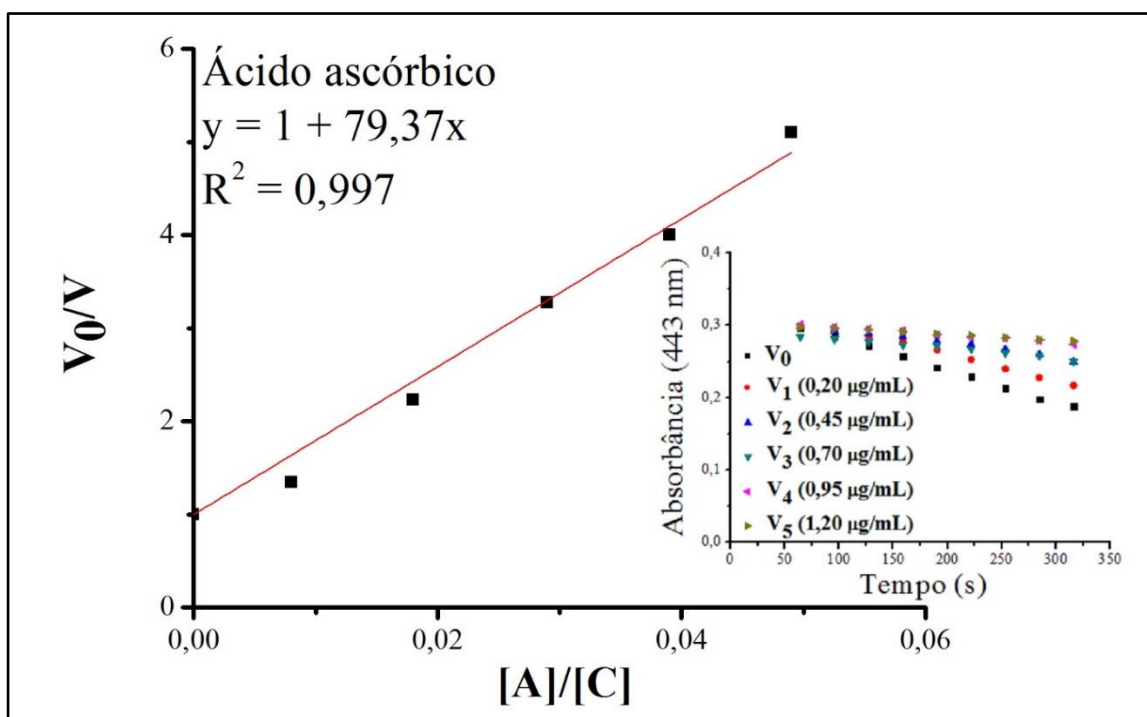
Sharma et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante frente ao radical $O_2^{\cdot-}$ de extrato hidroetanólico 70 % de folhas de *Euphoria nerifolia* Linn., obtendo valor de CE_{50} de 998,80 $\mu\text{g/mL}$, aproximadamente, 5 vezes maior que o do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (196,61 $\mu\text{g/mL}$).

4.4.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método do descoramento da crocina

As bicamadas de fosfolipídios das biomembranas são os principais alvos da lipoperoxidação pelo ataque das ERO. Quando a lipoperoxidação ocorre de maneira descontrolada nas biomembranas, sua estrutura e funcionalidade são danificadas, implicando na participação da causa de muitas doenças, podendo gerar graves consequências. Em vista disto, estudos que abordem a eficácia e mecanismos de ação de antioxidantes de ocorrência biológica têm sido estimulados (LÚCIO et al., 2009), o que torna importante estudar o extrato EtOH 70 % de folhas *C. verbenacea* frente ao radical livre ROO^{\cdot} .

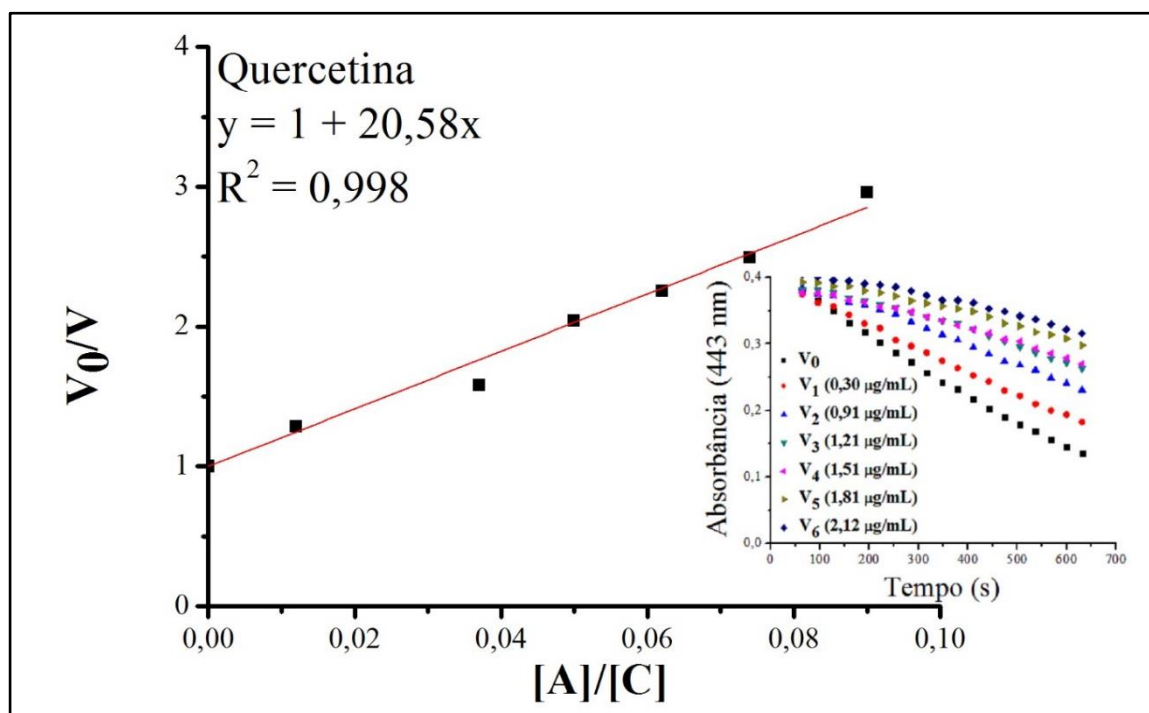
A capacidade de inibir o descoramento da crocina pelos padrões e amostra está representada nas Figuras 34 a 37.

Figura 34 - Razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de descoloramento da crocina com o ácido ascórbico.



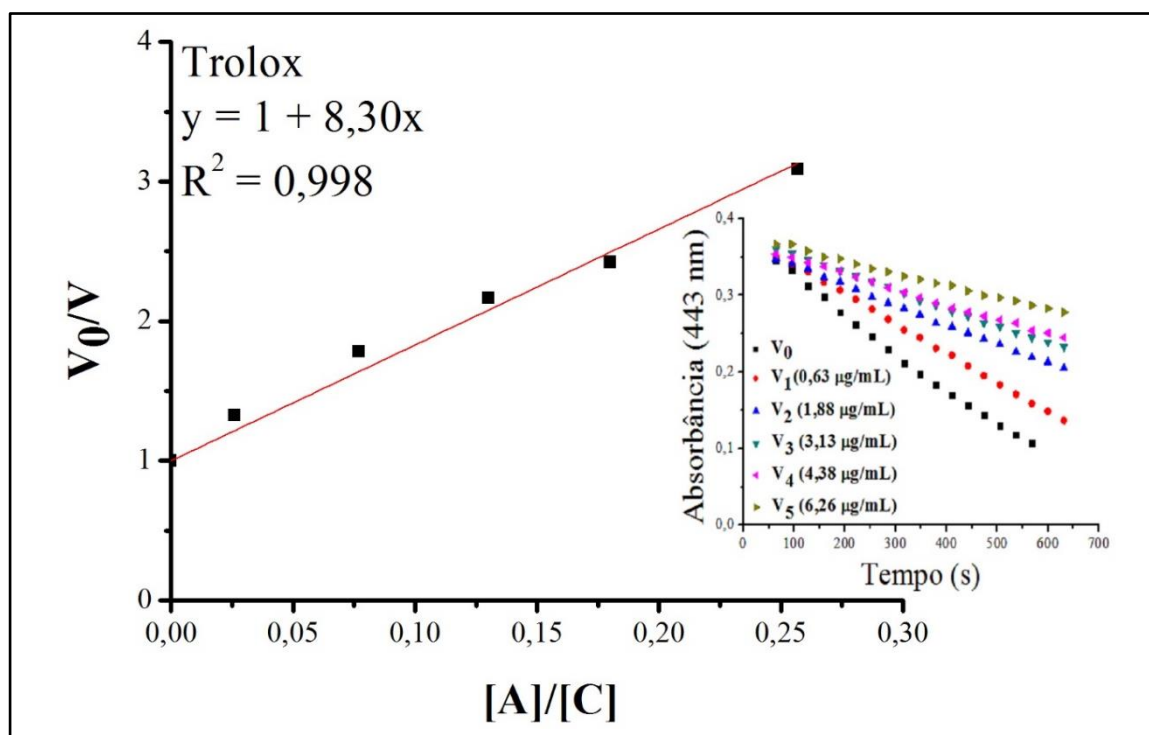
Nota: V_0 = velocidade na ausência de ácido ascórbico; V = velocidade na presença de ácido ascórbico; $[C]$ = concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração de ácido ascórbico (0,20 - 1,20 $\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e na presença (V) de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

Figura 35 - Razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de decoloramento da crocina com a quercetina.



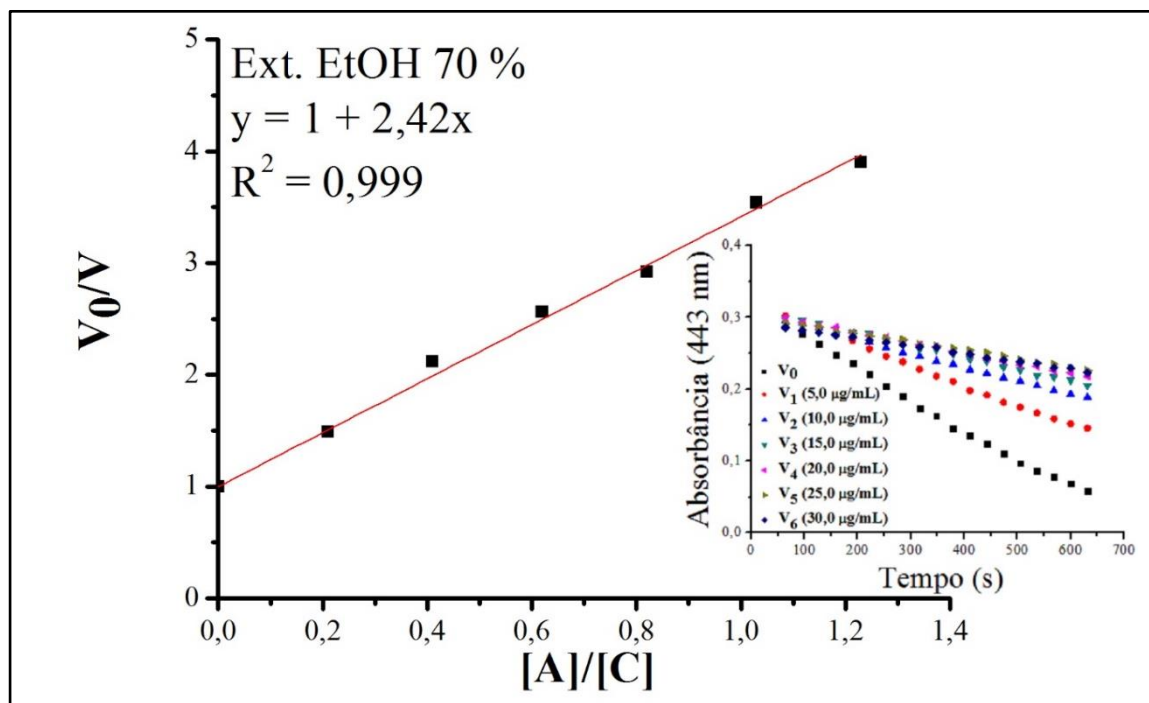
Nota: V_0 = velocidade na ausência de quercetina; V = velocidade na presença de quercetina; $[C]$ = concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração de quercetina (0,30 - 2,12 $\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e na presença (V) de quercetina ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

Figura 36 - Razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de decoloramento da crocina com o trolox.



Nota: V_0 = velocidade na ausência de trolox; V = velocidade na presença de trolox; $[C]$ = concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração de trolox (0,63 - 6,26 $\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorvância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e na presença (V) de trolox ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

Figura 37 - Razões das velocidades (V_0/V) e das concentrações ($[A]/[C]$), no ensaio de decoloramento da crocina com o extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: V_0 = velocidade na ausência de extrato EtOH 70 %; V = velocidade na presença de extrato EtOH 70 %; $[C]$ = concentração de crocina constante (24,4 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$ = concentração de extrato EtOH 70 % (5,0 - 30,0 $\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e na presença (V) de trolox ($\mu\text{g/mL}$), em função do tempo.

A partir dos resultados foi possível observar que, apenas para o ácido ascórbico, o ensaio de competição cinética foi analisado por 5 min, enquanto que os demais foram analisados por cerca de 10 min. Esta alternativa foi necessária devido a uma característica de cinética bifásica que este padrão apresentou. Segundo Bors e Buettner (1997), isso possivelmente ocorreu porque o ácido ascórbico, após doar os dois hidrogênios redutores, ficou susceptível a receber elétrons, devido ao radical ascorbila formado, que é um agente oxidante, ou seja, após os 5 min, provavelmente foi formado o radical ascorbila, ocorrendo o decaimento da tangente para todas as concentrações testadas (atividade pró-oxidante), e, portanto, para a análise correta dos resultados, foi escolhido utilizar metade do tempo de ensaio proposto pelo método descrito no item 3.5.4.

De acordo com os dados da Tabela 4, foi calculado o valor de equivalentes de ácido ascórbico, quercetina e trolox para o extrato etanólico 70 % de folhas de *C. verbenacea* (Tabela 5).

Tabela 4 - Equação de competição cinética entre padrões e amostra.

Padrões/Amostra	Equação de Competição Cinética ($y = V_0/V$; $x = [A]/[C]$)	R²
Ácido ascórbico	$y = 1 + 79,37x$	0,997
Quercetina	$y = 1 + 20,58x$	0,998
Trolox	$y = 1 + 8,30x$	0,998
Extrato EtOH 70 %	$y = 1 + 2,42x$	0,999

As análises foram realizadas conforme descrito em material e métodos (item 3.5.4), onde $y = V_0/V$; $x = [A]/[C]$. A inclinação da regressão linear indica a capacidade antioxidante relativa da amostra.

Tabela 5 - Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO^{*} em equivalentes ao ácido ascórbico, quercetina e trolox.

Padrões/Amostra	Equivalente de ácido ascórbico*	Equivalente de quercetina*	Equivalente de trolox*
Ácido ascórbico	1,000		
Quercetina		1,000	
Trolox			1,000
Extrato EtOH 70 %	0,030	0,118	0,292

*A equivalência aos padrões foi obtida pelo quociente das constantes de velocidade (coeficiente angular; amostra/padrões), apresentados na tabela 11.

A substância ou amostra analisada é mais eficiente que o padrão quando o resultado de equivalência for maior que 1,000, portanto, o extrato EtOH 70% não foi mais eficiente que nenhum dos padrões testados, ou seja, seu resultado de equivalência aos padrões foi menor que 1,000, podendo ser estimado em, aproximadamente, 33 vezes menos eficiente que o ácido ascórbico, 8 vezes menos que a quercetina e 3 vezes menos que o trolox.

Este ensaio também pode ser avaliado utilizando o valor de porcentagem de inibição (% In) do descoramento da crocina (LUSSIGNOLI et al., 1999), e, assim determinar o valor de CE₅₀. É possível observar que os valores de CE₅₀ encontrados para os padrões ácido ascórbico, quercetina e trolox seguem a ordem de eficácia do valor de coeficiente angular obtido na análise de competição cinética para o extrato EtOH 70 % (Tabela 4). Então, quanto maior o valor da inclinação da regressão linear, menor será o valor de CE₅₀, ou seja, mais eficiente é a ação antioxidante da amostra (Tabela 6).

Tabela 6 - Comparação de valores das constantes de velocidade (coeficiente angular) e CE₅₀ para o ensaio do descolorimento da crocina.

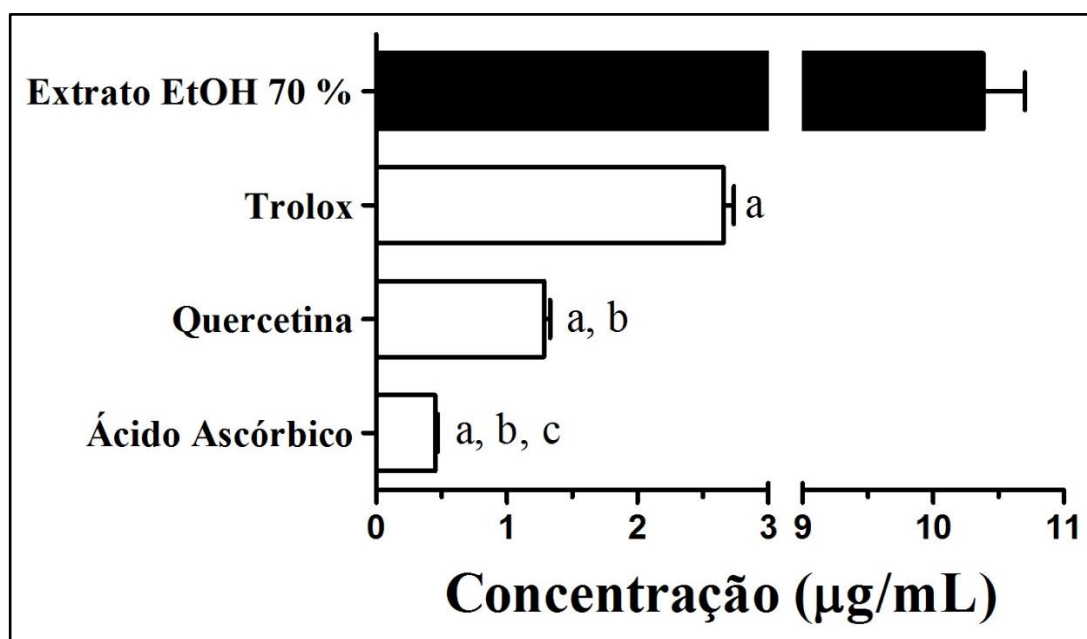
Padrões/Amostra	Inclinação da Regressão Linear*	CE ₅₀ (µg/mL)**
Ácido ascórbico	79,37	0,47
Quercetina	20,58	1,33
Trolox	8,30	2,61
Extrato EtOH 70 %	2,42	10,93

*Valores da inclinação da regressão linear em ordem decrescente de eficiência;

** Valores de CE₅₀ em ordem decrescente de eficiência, obtidos através da equação: % In = [1 - (ΔV / ΔV₀)] x 100.

Na Figura 38 estão apresentados os respectivos valores de CE₅₀ do extrato e padrões para a inibição do descolorimento da crocina, cujos valores em ordem crescente de CE₅₀ variaram de ~ 0,5 até 11,0 µg/mL: ácido ascórbico < quercetina < trolox < extrato EtOH 70 %.

Figura 38 - Inibição do descolorimento da crocina (CE₅₀ µg/mL) pelos padrões e extrato.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato extrato EtOH 70 %; b, diferenças com trolox; c, diferenças com quercetina.

Apesar do extrato EtOH 70% ter apresentado CE₅₀ cerca de 4, 8 e 20 vezes maior que as concentrações efetivas do trolox, quercetina e ácido ascórbico, respectivamente, ainda assim a concentração necessária para capturar 50 % dos radicais ROO[•] foi baixa, protegendo a crocina e impedindo seu descolorimento. Por este método *in vitro* que simula o processo de lipoperoxidação no organismo, foi possível comprovar a eficácia deste extrato em capturar esta espécie reativa radicalar.

Não foram encontrados relatos na literatura da atividade antioxidante da espécie vegetal *C. verbenacea* pelo ensaio do descoramento da crocina.

Lage et al. (2013) compararam a atividade antioxidante de extratos aquosos de cinco chás comerciais (verde, vermelho, branco, preto e azul) pelo método de descoramento da crocina. Foi verificado que os chás apresentaram atividade antioxidante, sendo que o verde é o mais eficiente e o azul, o menos. Os autores não apresentaram os resultados em termos de CE_{50} , não sendo possível fazer a comparação com o presente trabalho.

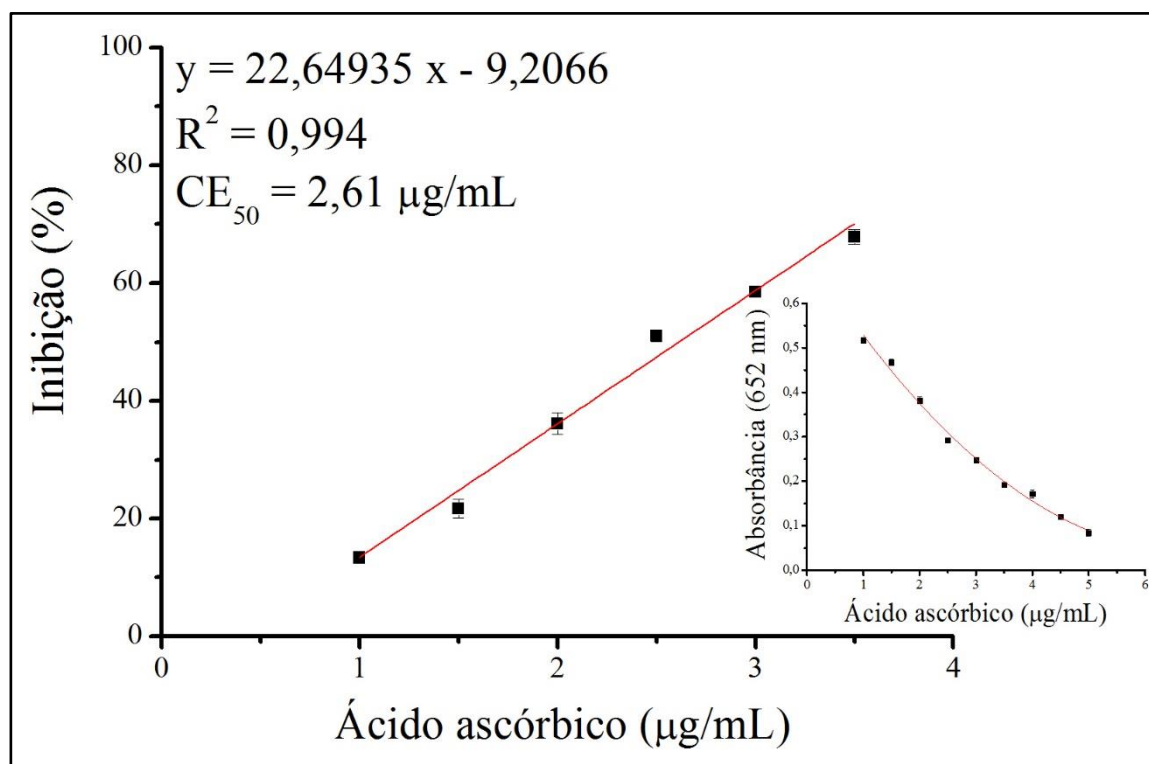
Prieto e Vázquez (2014) avaliaram três tipos de extratos de sementes de *C. arabica*, um hexânico, um metanólico e outro aquoso, quanto à sua capacidade em proteger a crocina para não sofrer o processo de descoramento. O extrato hexânico não mostrou atividade, pois este sistema de análise é adequado para amostras de caráter hidrofílico. Em média, na concentração de 100,0 $\mu\text{g/mL}$, os extratos aquoso e metanólico foram capazes de proteger a crocina em 50 %, ou seja, capturou 50 % dos radicais ROO^{\bullet} (CE_{50}). Este resultado é cerca de 10 vezes maior que o obtido para o extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* ($CE_{50} = 10,93 \mu\text{g/mL}$).

4.4.5 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa $\text{HOCl}/\text{OCl}^{-}$

Está estabelecido na literatura que a ativação de células fagocitárias durante o processo inflamatório está associada à produção significativa de ERO e a ativação dos neutrófilos leva à liberação do ácido hipocloroso no organismo. Em vista disso, é importante estudar o comportamento do extrato EtOH 70 % das folhas de *C. verbenacea* frente a esta espécie reativa.

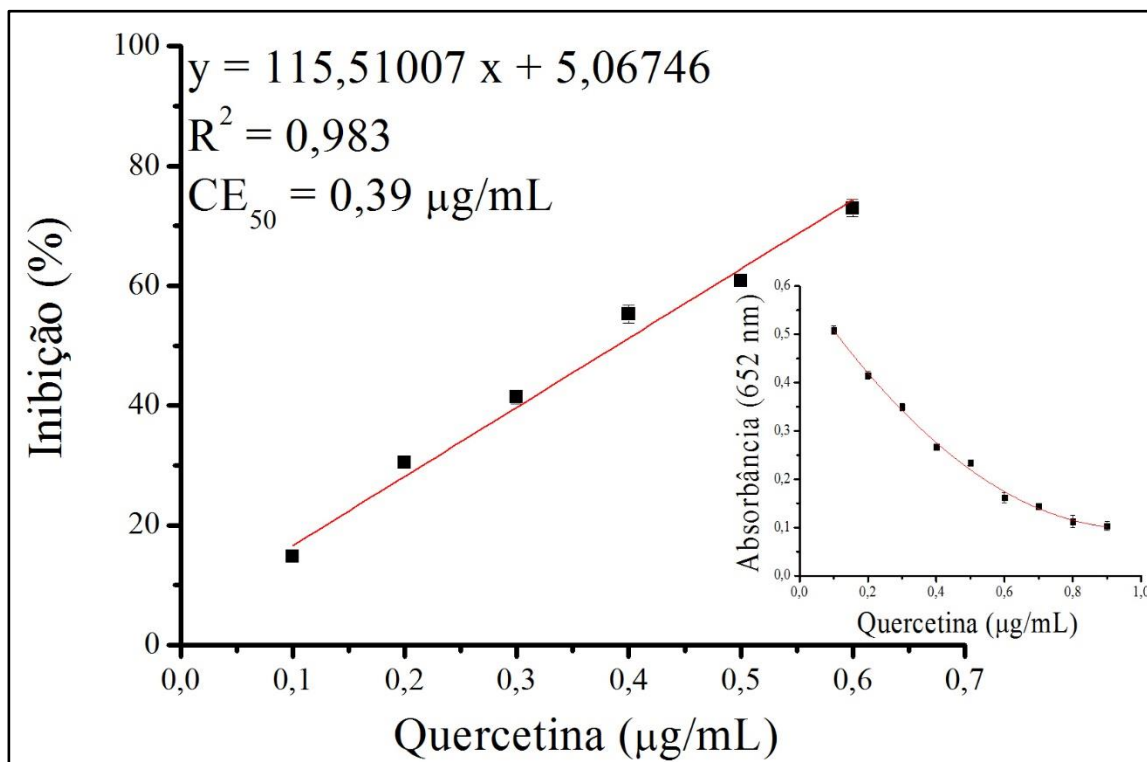
Para esta análise também foram utilizados os padrões ácido ascórbico, quercetina e trolox. Tanto os padrões quanto o extrato EtOH 70 % testados (Figuras 39 a 42), capturaram o ácido hipocloroso, sendo possível calcular os respectivos valores de CE_{50} .

Figura 39 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl *versus* a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$).



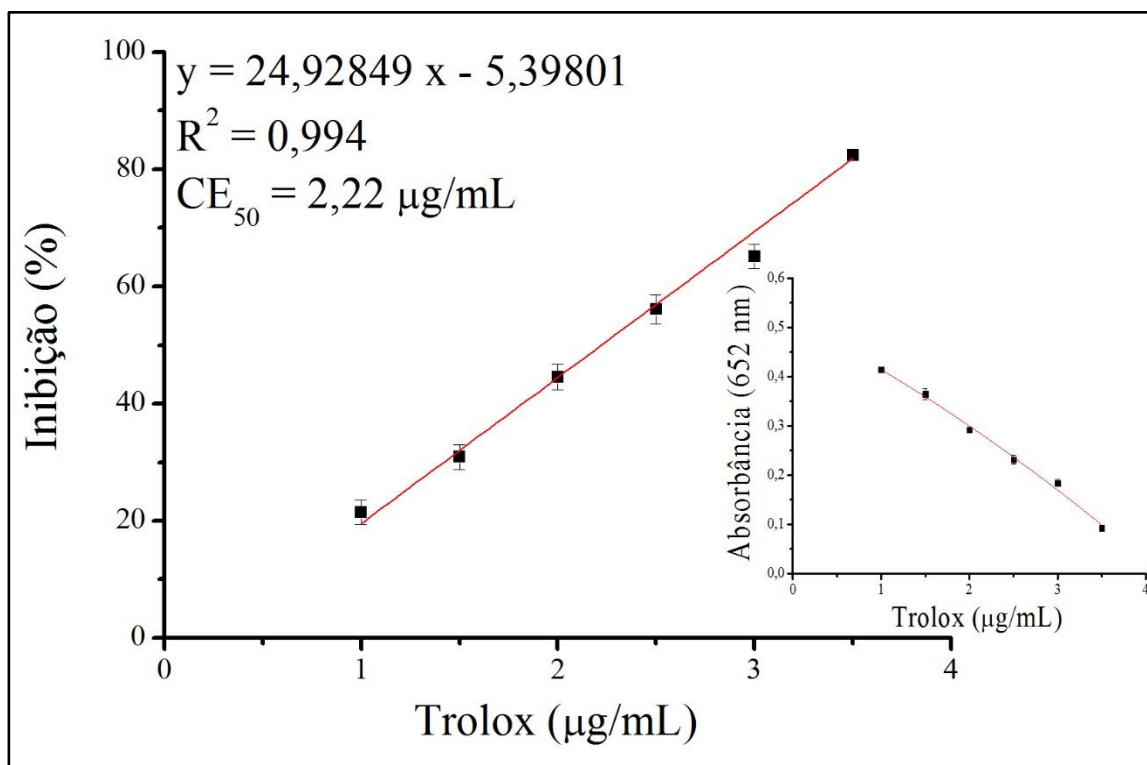
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância do TMB oxidado (652 nm) *versus* a concentração de ácido ascórbico ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 40 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl *versus* a concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).



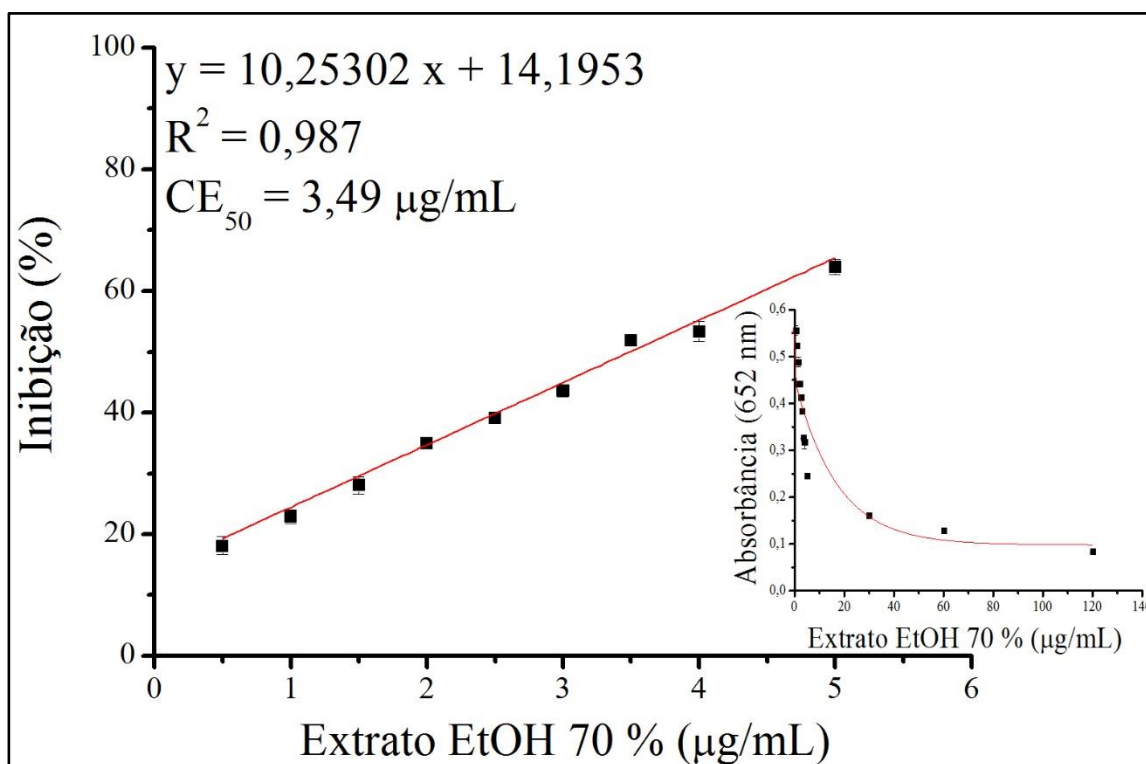
Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância do TMB oxidado (652 nm) *versus* a concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$).

Figura 41 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl *versus* a concentração de trolox ($\mu\text{g/mL}$).



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância do TMB oxidado (652 nm) *versus* a concentração de trolox ($\mu\text{g/mL}$).

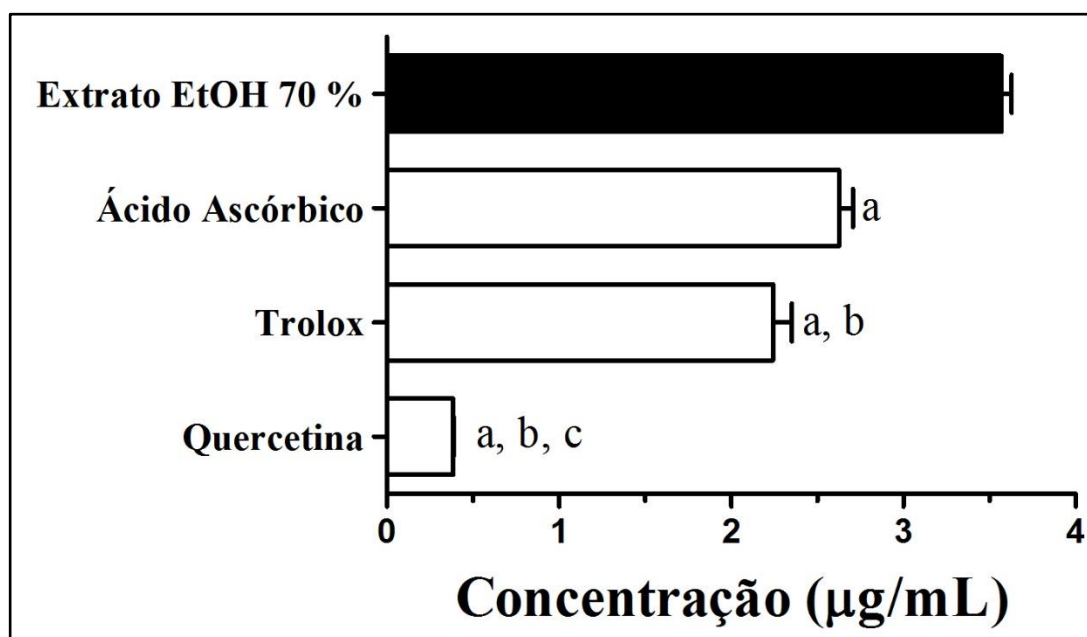
Figura 42 - Porcentagem de inibição (captura) do HOCl *versus* a concentração de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) ($\mu\text{g/mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do TMB oxidado (652 nm) *versus* a concentração de extrato EtOH 70 % ($\mu\text{g/mL}$).

Na Figura 43 estão apresentados os respectivos valores de CE_{50} do extrato e padrões para a captura do HOCl, cujos valores em ordem crescente de CE_{50} variaram de $\sim 0,4$ até $3,5 \mu\text{g/mL}$: quercetina < trolox < ácido ascórbico < extrato EtOH 70 %.

Figura 43 - Inibição (captura) do HOCl (CE_{50} $\mu\text{g/mL}$) pelos padrões e extrato.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato extrato EtOH 70 %; b, diferenças com ácido ascórbico; c, diferenças com trolox.

Apesar do extrato EtOH 70 % não ter apresentado um gráfico linear (absorbância do TMB oxidado *versus* a concentração de extrato), foi possível calcular o CE_{50} a partir da equação da reta da região linear (0,5 a 5,0 $\mu\text{g/mL}$), que, em relação aos padrões ácido ascórbico e trolox, foi semelhante. Vale ressaltar que mesmo o extrato sendo uma mistura complexa de substâncias, apresentou comportamento parecido ao de uma substância pura, evidenciando a eficácia desse extrato para capturar esta espécie reativa. Não houveram relatos na literatura que tenham analisado algum produto derivado de *C. verbenacea* por este método.

Ruby et al. (2015) analisaram os extratos hidroetanólicos 70 % de folhas de *Bergenia ligulata* (Wall) Eng., *Bergenia ciliata* (Royle) e *Bergenia stracheyi* Engl. para avaliar a atividade antioxidante frente ao HOCl e os respectivos CE_{50} obtidos foram: 87,79, 80,06 e 76,86 $\mu\text{g/mL}$. Estes CE_{50} comparados ao do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* (3,49 $\mu\text{g/mL}$) são, em média, 23 vezes maiores.

Eddine et al. (2015) obtiveram extratos etanólicos de *Rumex vesicarius* L. por maceração, sonicação e em aparelho Soxhlet para avaliar a atividade antioxidante pelo método do HOCl e os valores de CE_{50} encontrados foram, em média, 150,0, 170,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Em comparação ao CE_{50} obtido para o extrato EtOH 70% de *C. verbenacea* (3,49 $\mu\text{g/mL}$), estes valores são cerca de 43, 49 e 57 vezes maiores, respectivamente.

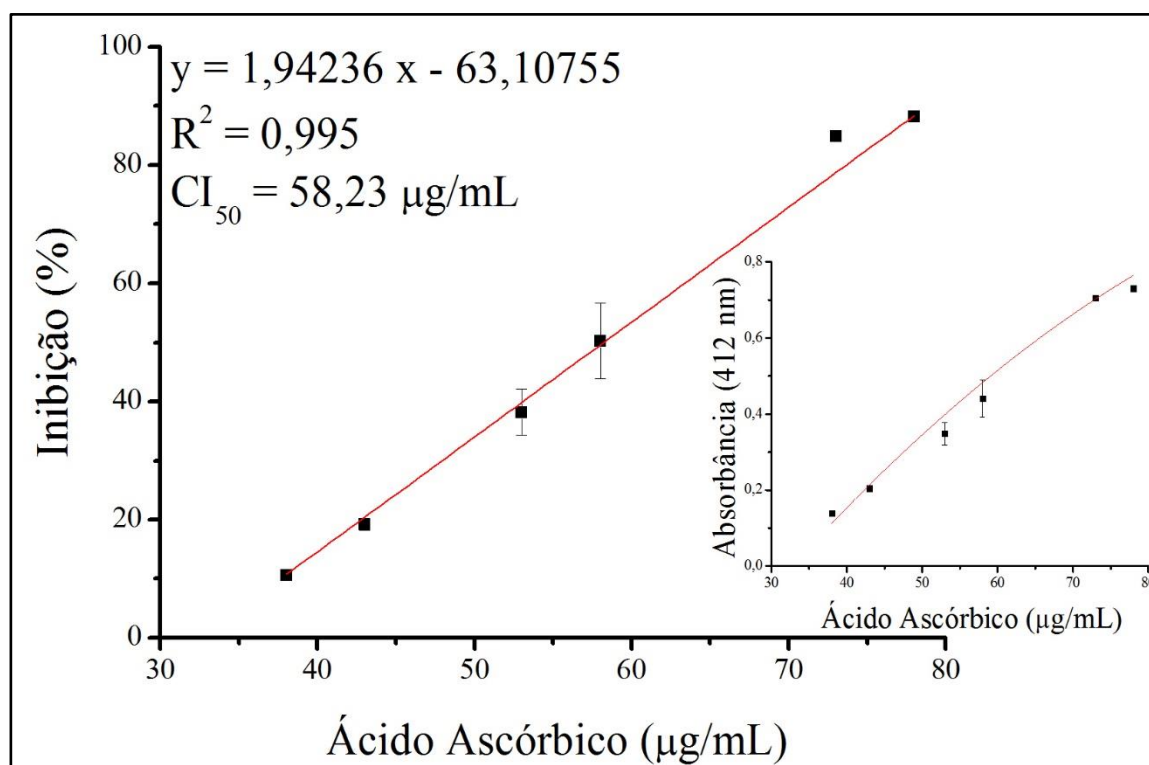
4.4.6 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da espécie reativa H₂O₂

O H₂O₂ é continuamente produzido nos tecidos do organismo e a suposta organela que contribui para a geração e consumo celular desta espécie reativa é a mitocôndria. Essa produção pode ocorrer pela dismutação do O₂^{-•}, gerado a partir da cadeia de transporte de elétrons (espontaneamente ou catalisada pela SOD), por via de reações de oxidases ou pela β-oxidação de ácidos graxos, ou diretamente por meio de oxidases como coproporfirinogênio III, D-aminoácidos, glicose, lisil, monoamina, xantina e urato (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010).

Neste ensaio, dentre os padrões analisados, apenas o ácido ascórbico inibiu a espécie reativa H₂O₂. Os outros dois padrões foram testados na concentração de até 100 μM para a quercetina e até 2,5 mM para o trolox, porém não ocorreu a inibição do H₂O₂. Devido a problemas de insolubilidade, não foram testadas maiores concentrações.

Na Figura 44 está representada a inibição do H₂O₂ pelo ácido ascórbico.

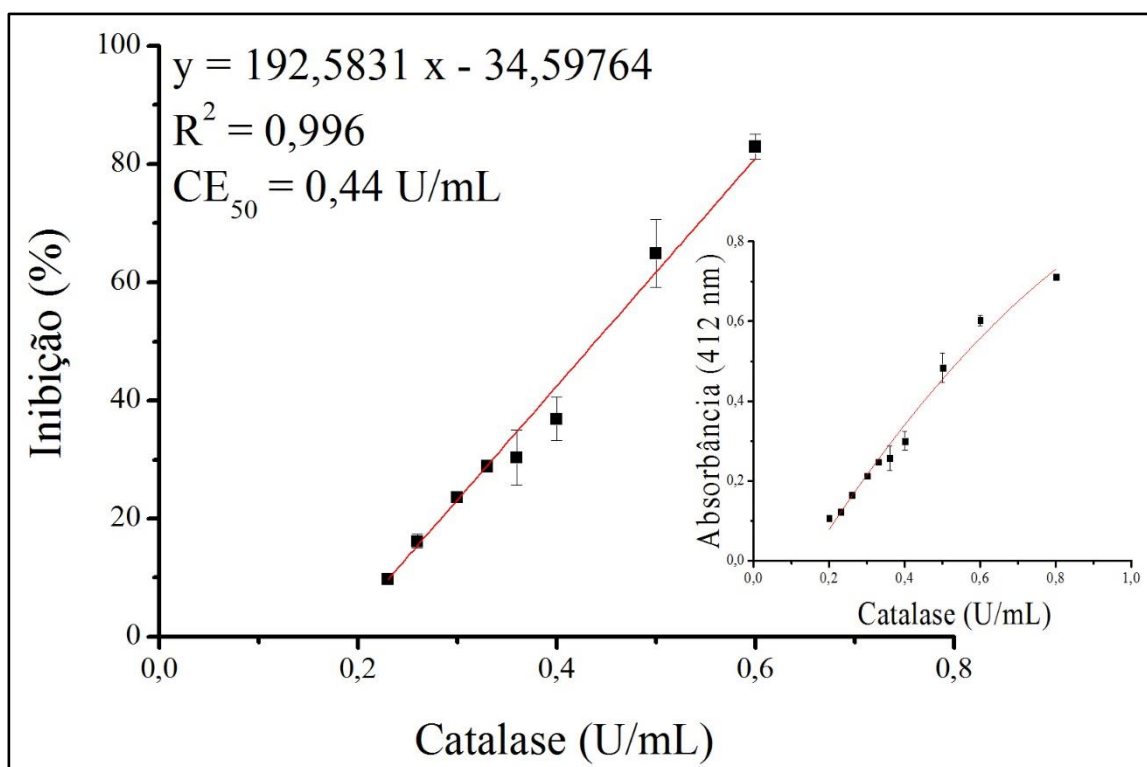
Figura 44 - Porcentagem de inibição (captura) do H₂O₂ *versus* a concentração de ácido ascórbico (μg/mL).



Nota: A equação da reta e os valores de R² e CE₅₀ são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DTNB oxidado (412 nm) *versus* a concentração de ácido ascórbico (μg/mL).

Como apenas um dos padrões testados foi capaz de inibir o H_2O_2 , foi utilizada a catalase para certificação do método, pois esta enzima é reconhecida pela sua eficiência e especificidade da conversão do H_2O_2 em água e oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2010). Assim, para avaliar a eficiência da enzima foi preparada uma solução com concentração de 20 unidades/mL (U/mL), considerando sua concentração do fabricante de 2950 U/mg de sólidos. Considerando a massa molecular de 240.000 Da (BUDAVARI et al., 2006), pode-se converter o valor obtido da CE_{50} de 0,44 U/mL (Figura 45) para 0,15 $\mu\text{g/mL}$.

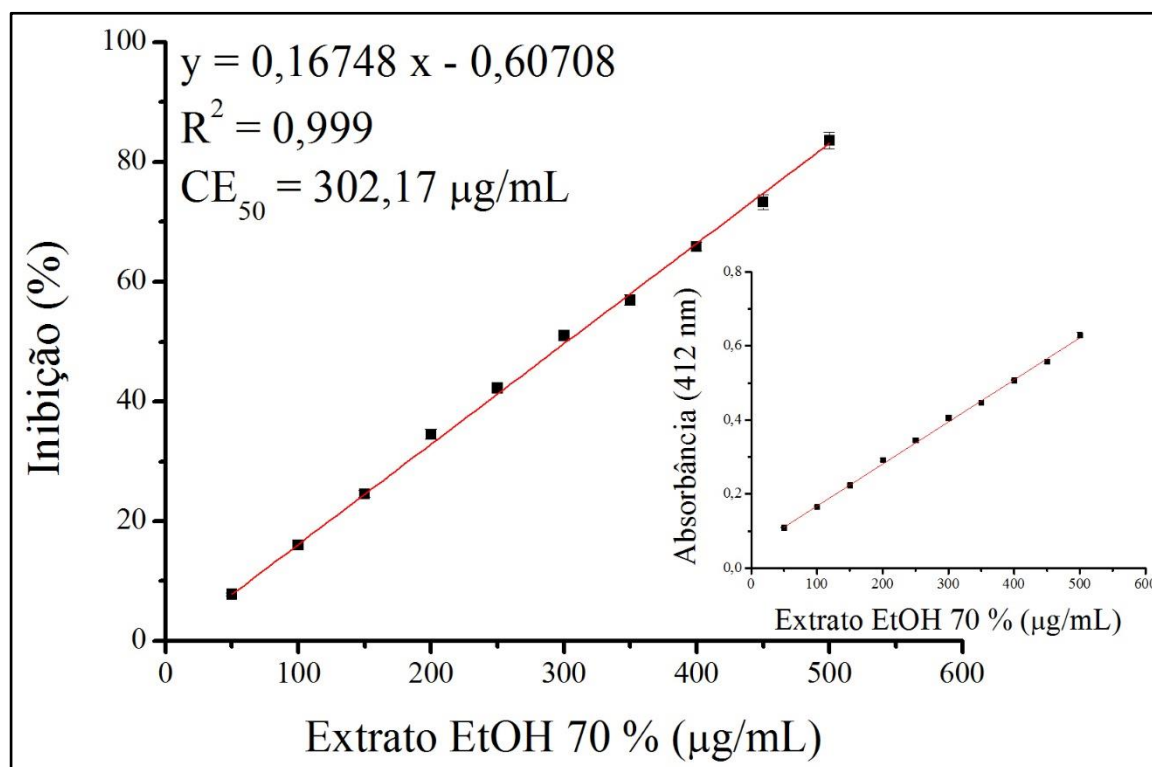
Figura 45 - Porcentagem de inibição (captura) do H_2O_2 versus a concentração de catalase (U/mL).



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorbância do DTNB oxidado (412 nm) versus a concentração de catalase (U/mL).

Como foi possível observar, nem mesmo padrões antioxidantes como a quercetina e o trolox, foram capazes de inibir o H_2O_2 que, depois do $\text{O}_2^{\bullet-}$, é a espécie reativa que desencadeia outras ERO no organismo. Na Figura 46 está representado a inibição do H_2O_2 pelo extrato EtOH 70% de *C. verbenacea*.

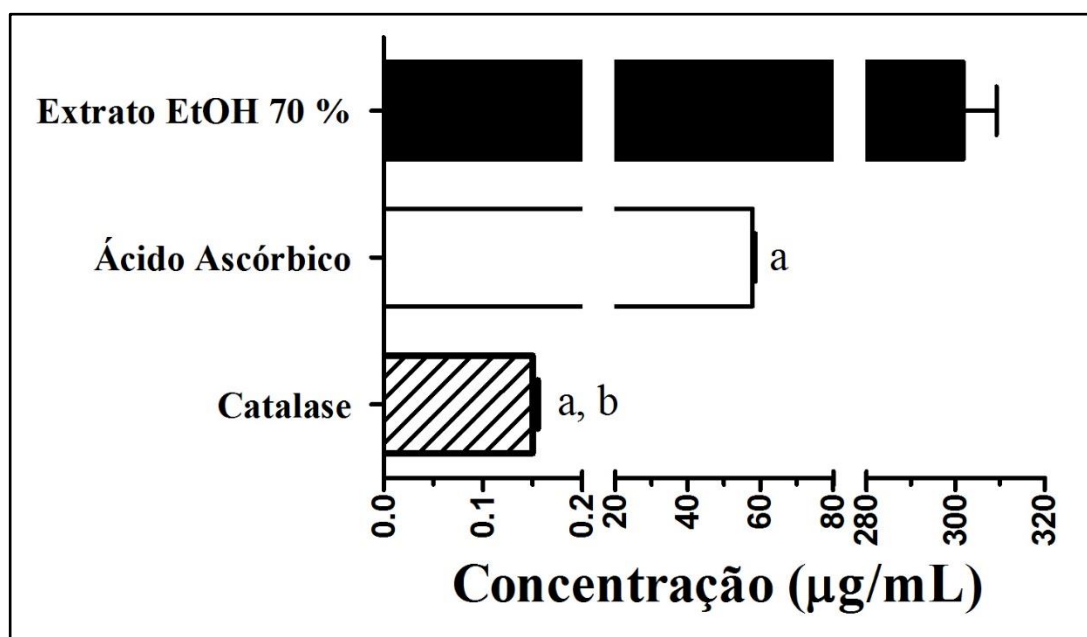
Figura 46 - Porcentagem de inibição (captura) do H_2O_2 versus a concentração de extrato de extrato hidroetanólico 70 % (EtOH 70 %) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de folhas de *C. verbenacea*.



Nota: A equação da reta e os valores de R^2 e CE_{50} são apresentados na figura. Abaixo e à direita também é apresentado o gráfico da absorvância do DTNB oxidado (412 nm) versus a concentração de extrato EtOH 70 % ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Na Figura 47 estão apresentados os respectivos valores de CE_{50} do extrato, padrão e enzima para a inibição do H_2O_2 , cujos valores em ordem crescente de CE_{50} variaram de $\sim 0,15$ até $300,0 \mu\text{g}/\text{mL}$: catalase < ácido ascórbico < extrato EtOH 70 %.

Figura 47 - Inibição (captura) do H_2O_2 (CE_{50} $\mu g/mL$) pelo padrão, enzima e extrato.



Nota: As diferenças entre amostras e padrão foram consideradas com $p < 0,05$. a, diferenças com extrato extrato EtOH 70 %; b, diferenças com ácido ascórbico.

Diante da dificuldade em capturar esta espécie reativa, mesmo com substâncias puras e utilizadas como padrões antioxidantes, como trolox e quercetina, o extrato EtOH 70% apresentou um resultado promissor, inibindo o H_2O_2 , uma espécie reativa que pode ser bastante prejudicial ao organismo quando em quantidades excessivas. Comparando-se com o ácido ascórbico, o valor de CE_{50} do extrato EtOH 70 % foi de, aproximadamente, 5 vezes maior. Considerando que o extrato é uma mistura complexa de substâncias e o ácido ascórbico, uma substância pura, este dado apresentado neste estudo tem uma grande importância, uma vez que na história do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, vários outros extratos foram analisados, como o extrato de *Morus nigra* L., de *Eugenia brasiliensis* Lam., *Rhamnus sphaerosperma* var. pubescens (Reissek) M. C. Johnst, além de outras substâncias purificadas, como o ácido cafeico, e nenhuma dessas amostras foram capazes de inibir o H_2O_2 .

Não houveram relatos na literatura desta análise para a espécie vegetal *C. verbenacea*.

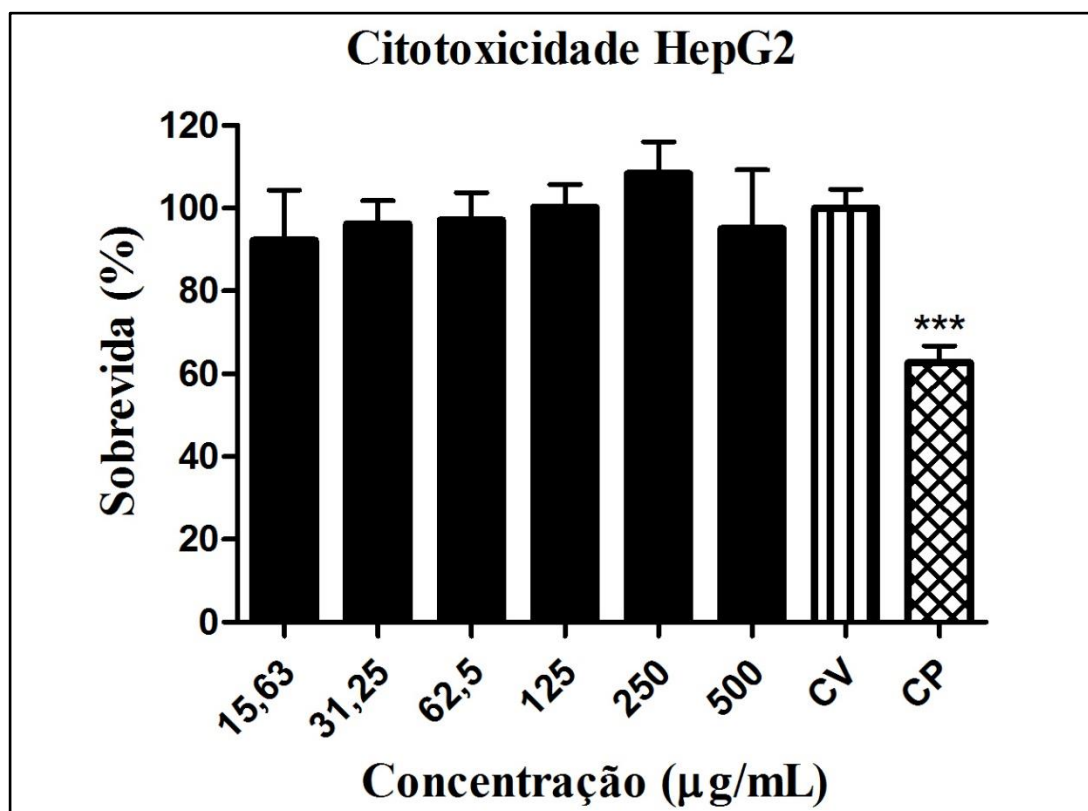
Hakime-Silva et al. (2013) avaliaram a atividade antioxidante frente ao H_2O_2 de extrato aquoso de *Agaricus blazei* Murrill. Em momento algum os autores revelaram a concentração de *A. blazei* utilizada no ensaio, contudo, este apresentou capacidade em inibir o H_2O_2 . Sendo assim, não foi possível comparar os valores de CE_{50} com o do presente estudo. Nenhum outro relato da literatura foi encontrado relacionado à capacidade em inibir o H_2O_2 por extratos vegetais por este método.

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO EXTRATO EtOH 70 % DE *C. verbenacea* EM CÉLULAS HepG2 e HaCat

A linhagem celular HepG2 consiste em células de hepatoma humano que, por serem metabolizadoras, permitem avaliar a toxicidade de possíveis metabólitos da substância em estudo (CHIARI et al., 2012), como, também, os queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes, linhagem HaCat, que são encontrados na pele. O uso indiscriminado de plantas medicinais pela população pode trazer certos riscos, sendo necessário realizar testes de toxicidade na busca de um tratamento eficaz, assim como produtos cosméticos e farmacêuticos devem ser submetidos a ensaios de segurança. Neste contexto, fez-se importante avaliar a citotoxicidade *in vitro* do extrato EtOH 70 % de folhas de *C. verbenacea*.

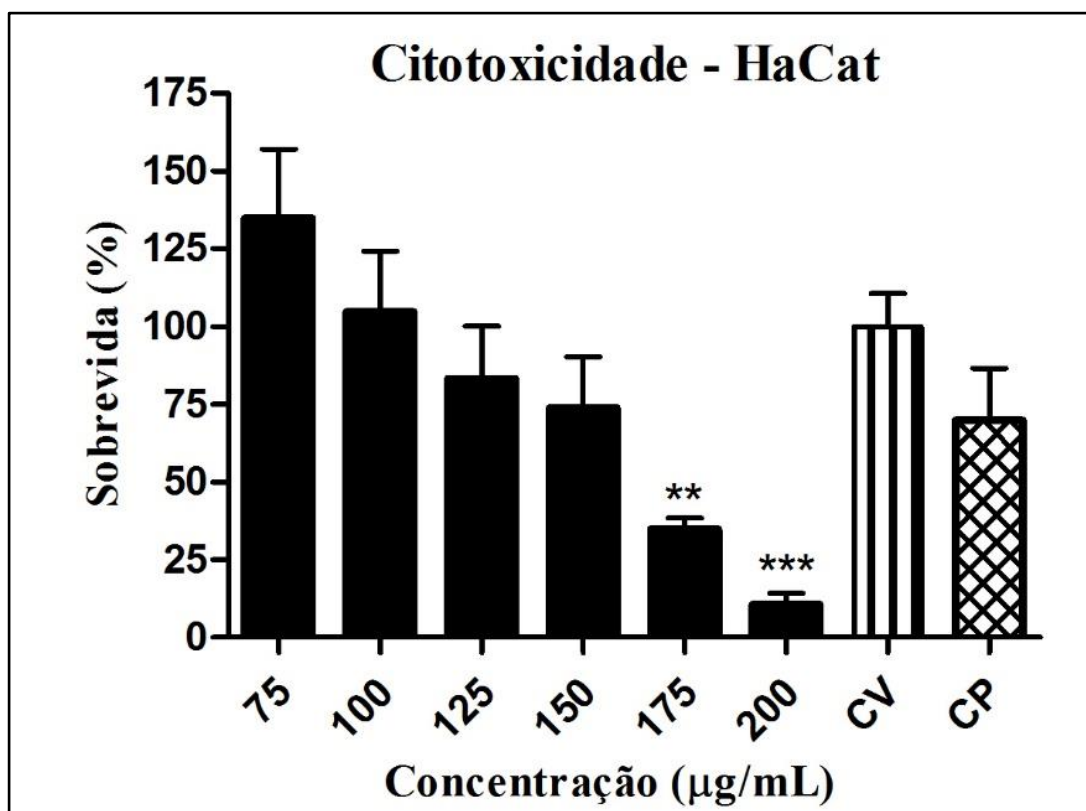
Nas Figuras 48 e 49 estão representos os perfis concentração-resposta para as linhagens HepG2 e HaCat.

Figura 48 - Determinação da viabilidade celular em HepG2 dada em porcentagem.



Nota: Todos os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey (***: $p \leq 0,001$, diferenças com CV). CV: controle de veículo; CP: controle positivo.

Figura 49 - Determinação da viabilidade celular em HaCat dada em porcentagem.



Nota: Todos os resultados estão expressos como média de três experimentos independentes \pm erro padrão ($M \pm EP$), analisados por One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey (**: $p \leq 0,01$, diferenças com CV; ***: $p \leq 0,001$, diferenças com CV). CV: controle de veículo; CP: controle positivo.

Apenas uma das linhagens analisadas apresentou uma tendência de perfil concentração-resposta. O extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* produziu morte celular estatisticamente significativa na linhagem HaCat nas concentrações de 175,0 e 200,0 $\mu\text{g/mL}$, atingindo o valor de CE_{50} de 163,8 $\mu\text{g/mL}$. Já para a linhagem HepG2, não houve morte celular considerável em nenhuma das concentrações testadas (de 15,63 a 500 $\mu\text{g/mL}$) não sendo possível o cálculo de seu CE_{50} . Este dado é muito importante, pois fornece informações de segurança quanto à aplicação desse extrato como medicamento, por exemplo, já que este tipo de célula é metabolizadora, indicando também que os metabólitos presentes no extrato não são citotóxicos nas concentrações testadas.

Como as células de pele (queratinócitos) apresentaram sensibilidade às concentrações mais altas testadas, a utilização desse extrato para aplicação cutânea, como, por exemplo, uma formulação cosmética, deve considerar que concentrações maiores que 163,8 $\mu\text{g/mL}$ causaram a morte de mais de 50 % dessas células. Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos EUA (*American National Cancer Institute, NCI*), um extrato vegetal é considerado citotóxico com

valor de $CE_{50} < 30,0 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990) e o extrato EtOH 70 % apresentou um valor aproximadamente 5 vezes maior.

Parisotto et al. (2012) avaliaram a citotoxicidade em linhagem de células mamárias cancerígenas (MCF-7) e de células de carcinoma de Ehrlich (EAC) de extrato fluído supercrítico e extrato etanólico obtido por maceração de folhas de *C. verbenacea*, também pelo método do MTT. Os extratos foram testados nas concentrações de 62,50, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem MCF-7 e 31,25, 62,50, 125, 250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem EAC. O extrato fluído supercrítico apresentou melhor comportamento na viabilidade dessas células, promovendo a morte celular nas concentrações mais altas testadas. É sugerido que o alto poder citotóxico de extratos fluídos supercríticos pode ocorrer devido à presença de dois sesquiterpenos, o α -humuleno e o *trans*-cariofileno, que possuem também atividade anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2007).

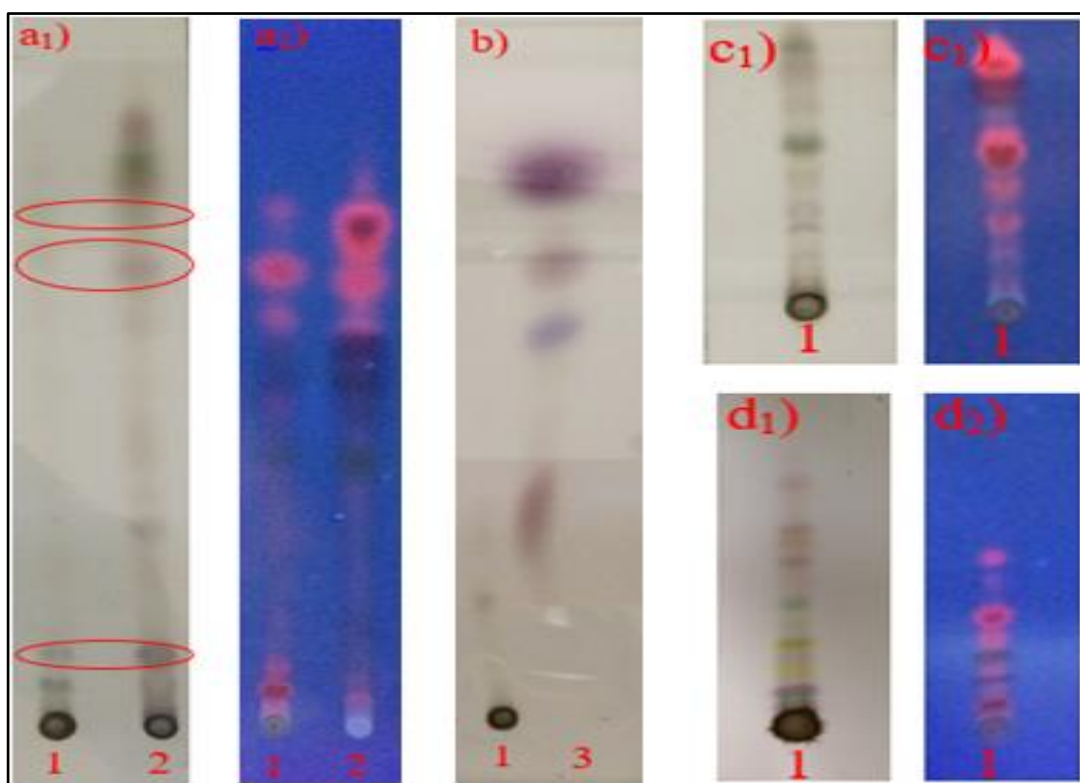
4.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS E ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.6.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A técnica de CCD consiste em separar componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana e o processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção regido por forças intermoleculares. Esta técnica é amplamente utilizada na análise de amostras vegetais, devido à sua simplicidade, rapidez e sensibilidade (EWING, 1972; COSTA, 2000).

Para efeito comparativo, o extrato foi analisado também juntamente com o óleo essencial (OE) obtido por hidrodestilação das folhas e com o extrato etanólico (EtOH) (fornecidos pelo estudante de doutorado de nosso laboratório Juhan A. S. Pereira) (Figura 50).

Figura 50 - Cromatoplasmas do extrato EtOH 70 %, do extrato EtOH e do óleo essencial de folhas de *C. verbenacea* (sílica gel).



Nota: Revelador: H₂SO₄ 10 % (v/v). Amostras: 1. extrato EtOH 70 %; 2. extrato EtOH; 3. óleo essencial. Fases móveis: a) clorofórmio: acetato de etila (60:40); b) tolueno: acetato de etila (92:8); c) clorofórmio: acetato de etila: MeOH (55:35:10); d) hexano: acetato de etila: isopropanol (70:28:2); a₂, c₁) e d₂): visualização da placa sob luz UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$).

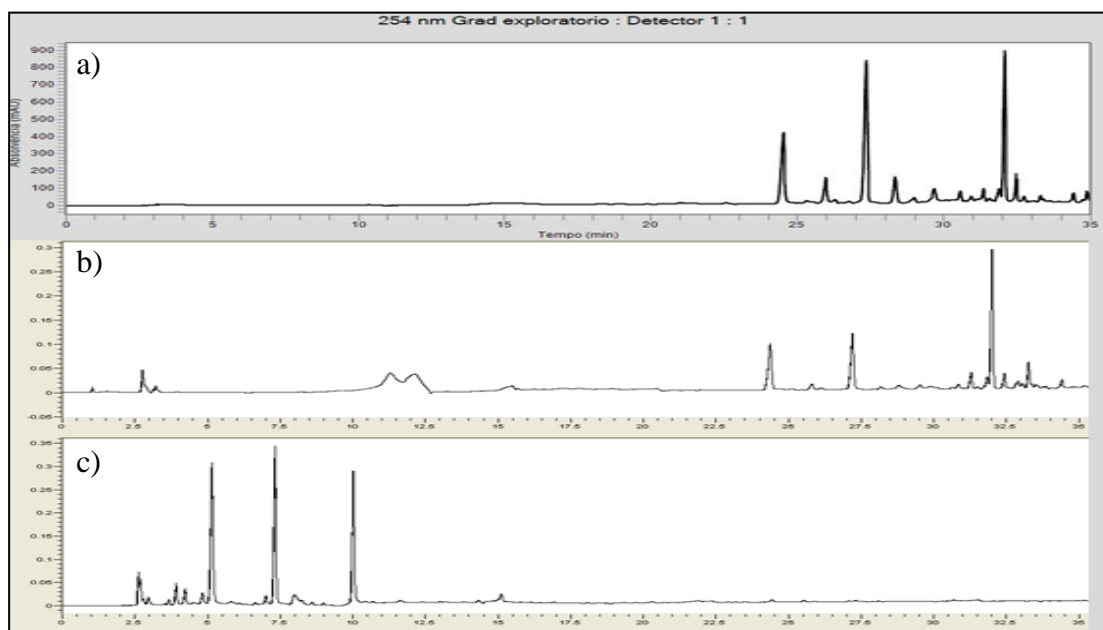
Na cromatoplasca da Figura 50a é possível observar manchas comuns entre o extrato EtOH 70 % e EtOH, sugerindo a presença das mesmas substâncias nestes extratos, porém com maior concentração no extrato EtOH (maior intensidade das manchas). A fase móvel utilizada foi de média polaridade e os constituintes mais polares do extrato EtOH 70 % não eluíram (mancha intensa na origem). Já com o óleo essencial (Figura 50b) não foi verificada a presença de nenhuma mancha comum com o extrato EtOH 70 %, indicando que não há componentes do óleo essencial no extrato EtOH 70 % ou que estão presentes em baixa concentração. A composição das fases móveis utilizadas nas cromatoplascas das Figuras 50c e 50d, mostraram que o extrato EtOH 70 % é bastante complexo, apresentando muitas manchas.

4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Os extratos EtOH, EtOH 70 % e Aq de *C. verbenacea* foram submetidos à análise por CLAE utilizando um gradiente exploratório para se obter seus perfis cromatográficos a fim de

compará-los quanto a sua complexidade em termos de tempos de retenção dos picos e componentes majoritários (maior área ou altura dos picos) (Figura 51).

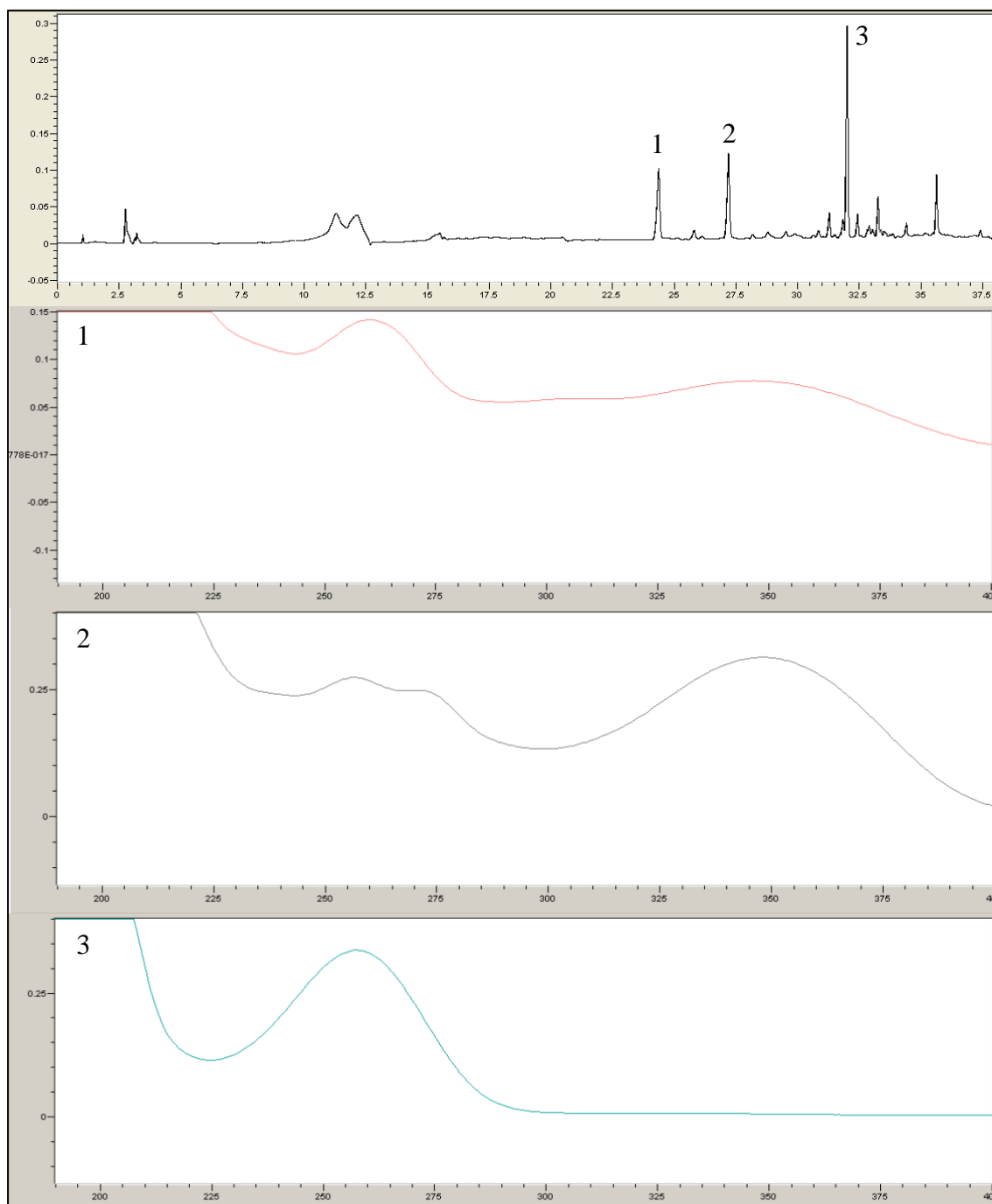
Figura 51 - Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD dos extratos EtOH (a), EtOH 70 % (b) e Aq (c).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel água (A) e metanol (B) em modo gradiente: 5-100 % de metanol em 30 min, 100 % de metanol por 5 min; coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector de arranjo de diodos (DAD) com comprimento de onda selecionado em 250 nm.

O cromatograma do extrato EtOH apresentou picos de maiores intensidades e áreas com t_R 24-33 min, comparado aos outros extratos. O perfil cromatográfico do extrato EtOH 70 % mostrou picos também com t_R entre 24-33 min, sendo os 3 principais correspondentes aos do extrato EtOH; também foram observados picos com t_R entre 2,5 e 15 min, ausentes no extrato EtOH. Já o cromatograma do extrato Aq apresentou picos majoritários com menores t_R (entre 2,5 e 11 min). Os espectros no UV dos picos principais do extrato EtOH 70 % estão representados na Figura 52.

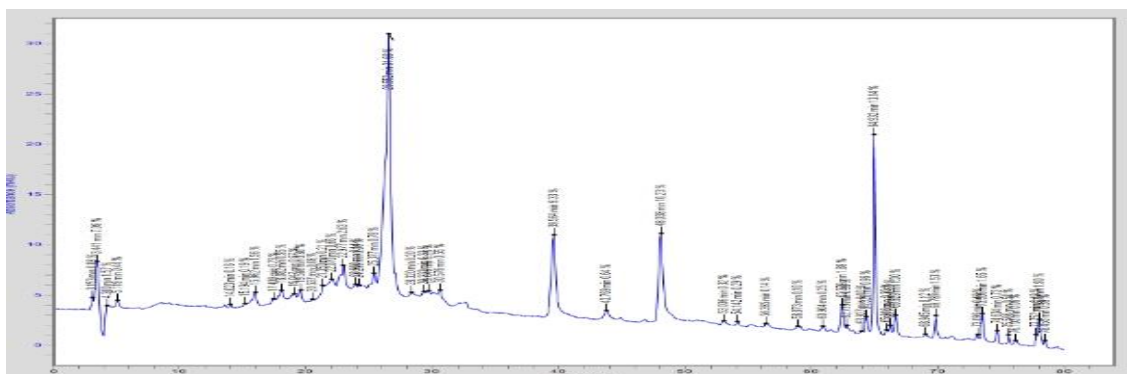
Figura 52 - Cromatograma obtidos por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (condições de análise na Figura 51) e espectros no UV referente aos picos 1, 2 e 3.



Os espectros no UV dos picos 1 e 2 (Figura 52) sugerem a presença de flavonoides ($\lambda_{\text{máx}}$ entre 250-280 e 350 nm) e o pico 3 (Figura 52) apresentou $\lambda_{\text{máx}} = 258$ nm. A partir destes dados foi possível observar a maior complexidade, em termos cromatográficos, do extrato EtOH 70 %, confirmando os resultados obtidos nas análises por CCD e fotométricas de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, e, conseqüentemente, de atividade antioxidante.

Considerando os resultados da análise do extrato EtOH 70 % utilizando o gradiente exploratório (Figura 51) e o método cromatográfico desenvolvido por Matias et al. (2013) e adaptado para a análise deste extrato (Figura 53), outras condições cromatográficas foram utilizadas e estão representadas nas Figuras 54 a 59.

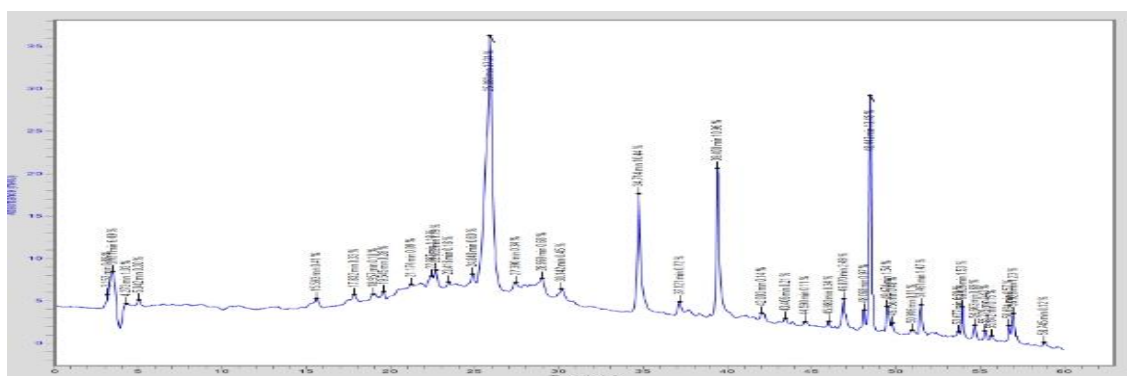
Figura 53 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 1).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-2 min 5 % B, 2-10 min 25 % B, 10-20 min 40 % B, 20-30 min 50 % B, 30-40 min 60 % B, 40-50 min 70 % B, 50-80 min 100 %; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

A adição de ácido acético (2 %) no solvente A, fez com que reduzisse o pH da fase móvel, aumentando a retenção das substâncias e a resolução dos picos (controle de ionização dos compostos fenólicos). Baseado nisso outro método foi avaliado (Figura 54).

Figura 54 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 2).

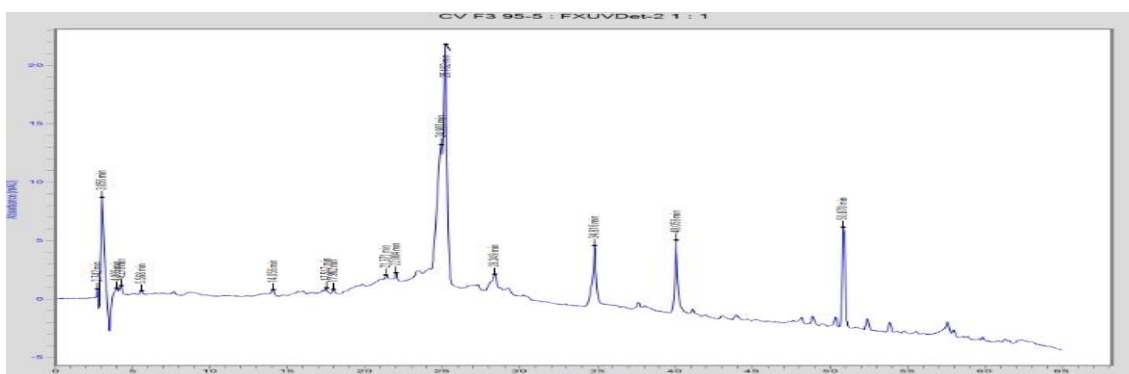


Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-30 min 5-60 % B, 30-35 min 71 % B, 35-55 min 100 % B, 55-60 min 100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

Comparando-se estes dois cromatogramas foi possível observar grande semelhança em seus perfis, porém o método utilizado na Figura 54 apresenta algumas vantagens em relação ao da Figura 53, como a simplificação do método e a diminuição do tempo de análise.

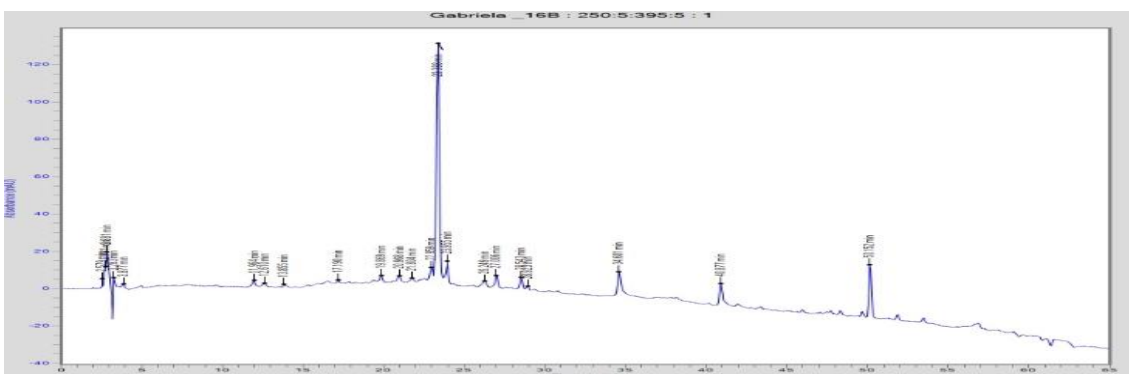
Outros métodos foram desenvolvidos a fim de melhorar a separação dos picos nos primeiros 30 min, aumentando a força de eluição, já que na condição estabelecida para o restante da corrida a resolução cromatográfica foi adequada. Durante os primeiros 30 min as porcentagens de B iniciais (0 min) testadas foram de 10 a 33 % e as porcentagens finais (30 min) de 58 a 60 %, enquanto que o restante do tempo de análise e a condição da fase móvel permaneceram iguais (Figuras 55 a 57).

Figura 55 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 3).



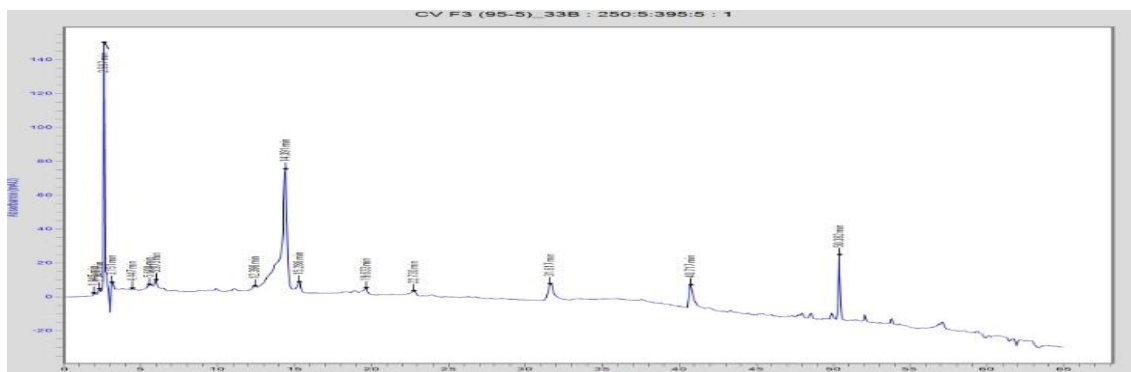
Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-30 min 10-60 % B, 30-35 min 71 % B, 35-55 min 100 % B, 55-60 min 100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

Figura 56 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 4).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-30 min 18-60 % B, 30-35 min 71 % B, 35-55 min 100 % B, 55-60 min 100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

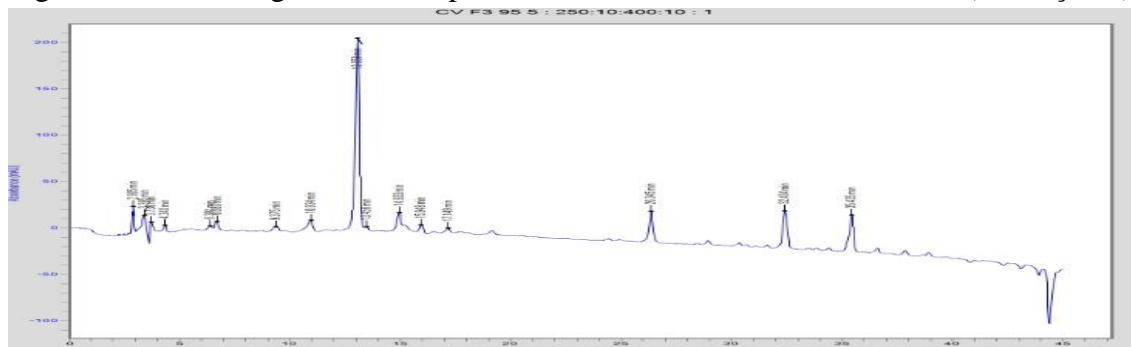
Figura 57 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 5).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-30 min 33-58 % B, 30-35 min 71 % B, 35-55 min 100 % B, 55-60 min 100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

Como as alterações na fase móvel não produziram efeito satisfatório na resolução cromatográfica, a coluna C18 foi substituída por uma difenil (Figuras 58 e 59) para modificar a seletividade da fase estacionária.

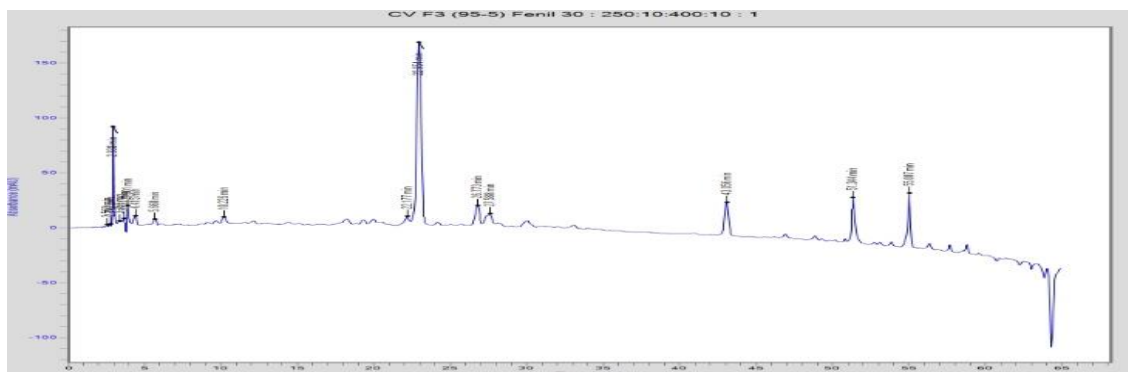
Figura 58 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 6).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-40 min 40-100 % B, 40-45 min 100 % B, vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

Baseado neste gradiente exploratório (Figura 58), outro método foi desenvolvido (Figura 59).

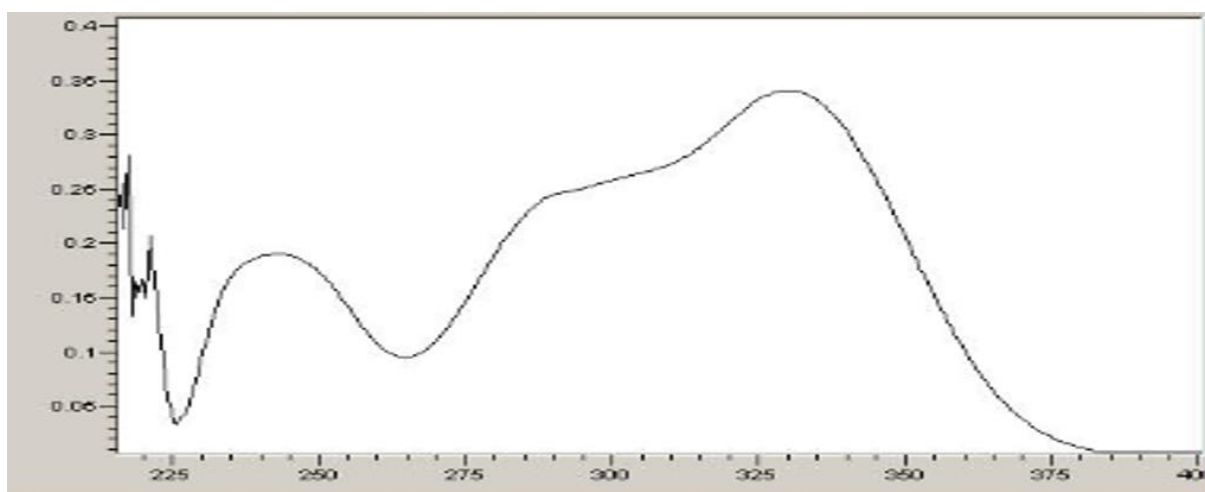
Figura 59 - Cromatograma obtido por CLAE-DAD do extrato EtOH 70 % (Condição 7).



Nota: Condições cromatográficas: fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0 min 30 % B, 0-40 min 70 % B, 40-60 min 100 % B, 60-65 min 100 % B; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda de 250 nm.

O pico majoritário com t_R entre 20 e 25 min possivelmente refere-se a duas substâncias, porém não foi possível separá-las com boa resolução e a análise do espectro no UV está representada na Figura 60. De qualquer forma, a coluna difenil pareceu mais adequada considerando-se a simetria dos picos e o método da Figura 59 permitiu obter um perfil cromatográfico do extrato, observando-se 3 substâncias de menor polaridade (t_R entre 40 e 55 min) e outras 4 de maior polaridade (t_R entre 20 e 30 min), considerando as que estão co-eluído ($t_R = 23$ min).

Figura 60 - Espectro no UV referente ao pico com $t_R = 23$ min da Figura 59.



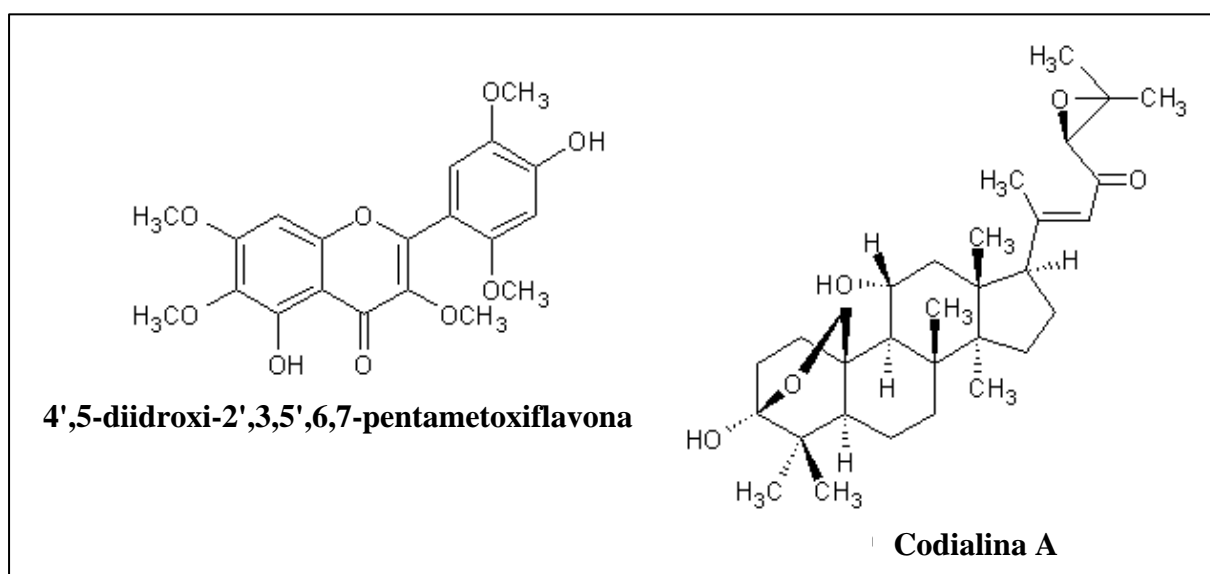
O espectro no UV revela que as substâncias que estão co-eluído no $t_R = 23$ min possivelmente pertencem à classe dos flavonoides apresentando duas bandas características e, mais especificamente, às flavonas e flavonóis, que apresentam a banda I (anel B) absorvendo entre 300 e 380 nm, aproximadamente, e a banda II (anel A) absorvendo entre 240 e 280 nm,

aproximadamente (CORRADINI et al., 2011). Além disso, pode-se sugerir que estes flavonoides podem ser glicosilados ou poliidroxilados devido à sua característica mais polar. Sendo estas as substâncias majoritárias do extrato, é possível apontar que podem estar altamente relacionadas à atividade antioxidante do extrato, uma vez que os flavonoides são potenciais substâncias antioxidantes.

4.6.2.1 Quantificação de substâncias pelo padrão externo

Para a quantificação das substâncias 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A (Figura 61) e outro triterpeno análogo à cordialina A, isoladas pelo aluno de doutorado Juhan A. S. Pareira do mesmo grupo de pesquisa, foram obtidas curvas analíticas baseadas no método cromatográfico, também, desenvolvido por ele.

Figura 61 - Estruturas químicas da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona e cordialina A.



A curva analítica do 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (Figura 62), foi obtida através das concentrações *versus* os valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 7), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando a pureza cromatográfica (97,9%).

Figura 62 - Curva analítica da 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona em CLAE-DAD.

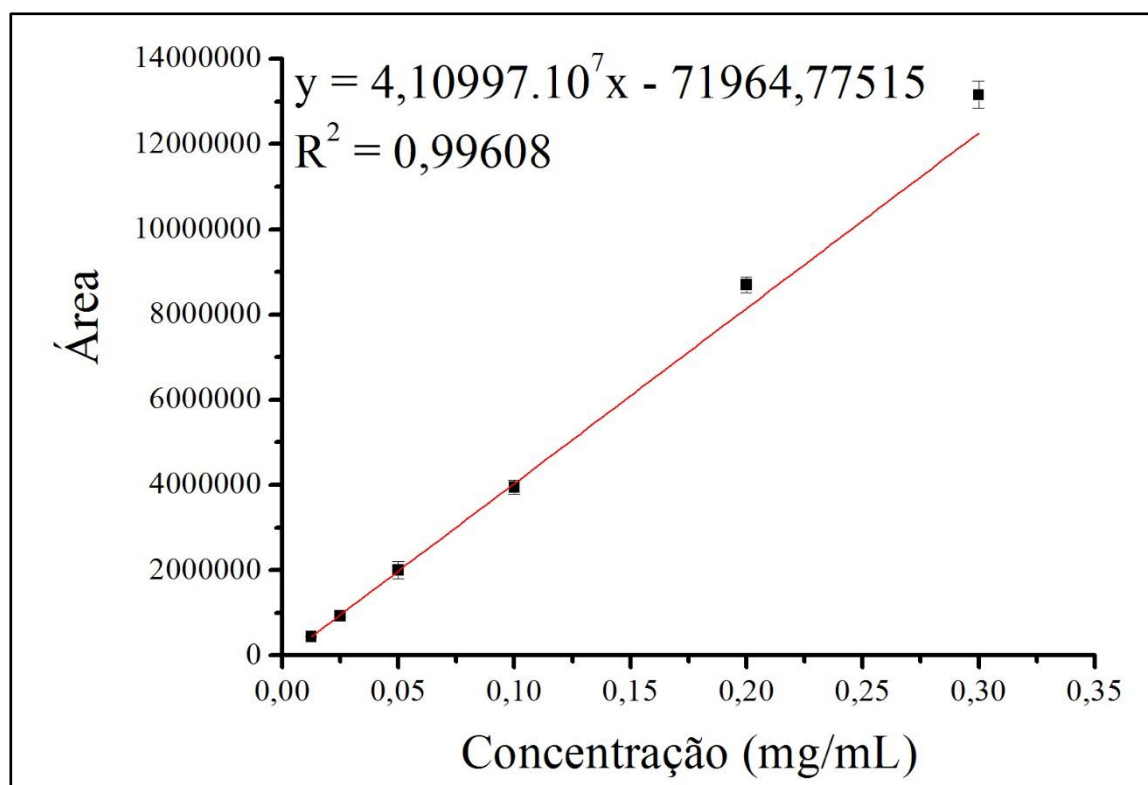


Tabela 7 - Dados das análises de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	t _R (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida* (mg/mL)
0,0125	30,5	443.944,0 ± 2.320,7	0,0122
0,0250	30,4	934.998,5 ± 6.960,1	0,0240
0,0500	30,7	2.001.231,5 ± 202.889,4	0,0489
0,1000	30,8	3.950.046,0 ± 173.655,5	0,0979
0,2000	30,8	8.696.064,0 ± 185.301,6	0,1958
0,3000	31,1	13.157.415,0 ± 318.871,2	0,2937

*Concentração calculada considerando pureza de 97,9 %.

A partir da equação da reta ($y = 4,10997 \cdot 10^7 x - 71.964,77515$), foi possível calcular a concentração de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona no extrato EtOH 70 % utilizando o valor da área obtido de 2.641.804 no t_R de 30,4 min, obtendo 0,66 % (m/m) de 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona total no extrato, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra.

A curva analítica da cordialina A (Figura 63), foi obtida através das concentrações *versus* os valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 8), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando a pureza cromatográfica (97,3%).

Figura 63 - Curva analítica da cordialina A em CLAE-DAD.

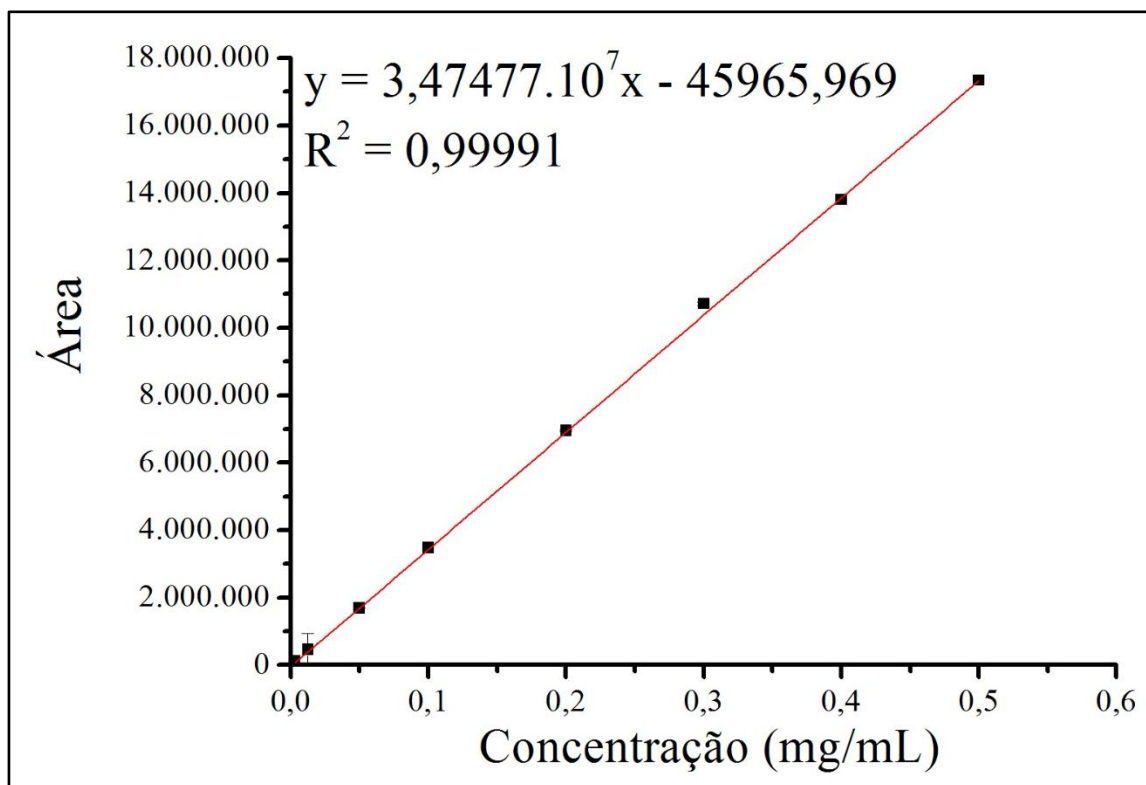


Tabela 8 - Dados das análises de cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

Concentração (mg/mL)	tr (min)	Média da área dos picos ± DPM	Concentração corrigida* (mg/mL)
0,0031	52,8	114.169,0 ± 25,5	0,0030
0,0125	52,9	469.531,0 ± 1.835,7	0,0122
0,0500	53,2	1.688.248,0 ± 1.313,8	0,0487
0,1000	53,1	3.482.707,0 ± 5.191,6	0,0973
0,2000	53,0	6.954.325,0 ± 20.173,8	0,1946
0,3000	53,2	10.717.604,0 ± 41.702,3	0,2919
0,4000	53,1	13.808.996,0 ± 9.176,8	0,3892
0,5000	53,0	17.339.277,5 ± 17.907,5	0,4865

*Concentração calculada considerando pureza de 97,3 %.

A partir da equação da reta ($y = 3,47477.10^7 x - 45.965,969$), foi possível calcular a concentração de cordialina A no extrato EtOH 70 % utilizando o valor da área obtido de

2.295.979 no t_R de 52,8 min, obtendo 0,67 % (m/m) de cordialina A total no extrato, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra.

A curva analítica do triterpeno análogo à cordialina A (Figura 64), foi obtida através das concentrações *versus* os valores das áreas dos picos nos cromatogramas (Tabela 9), sendo que as concentrações foram corrigidas considerando a pureza cromatográfica (96,0 %).

Figura 64 - Curva analítica do triterpeno análogo à cordialina A em CLAE-DAD.

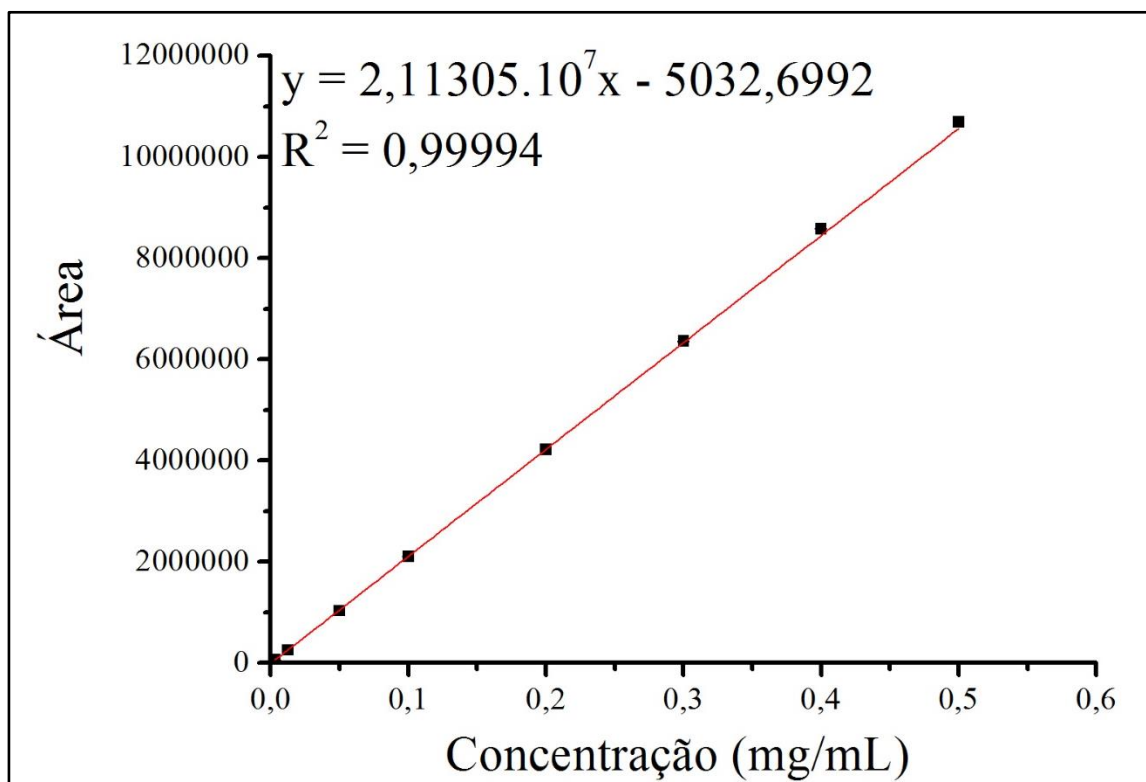


Tabela 9 - Dados das análises do triterpeno análogo à cordialina A em CLAE-DAD para construção da curva analítica.

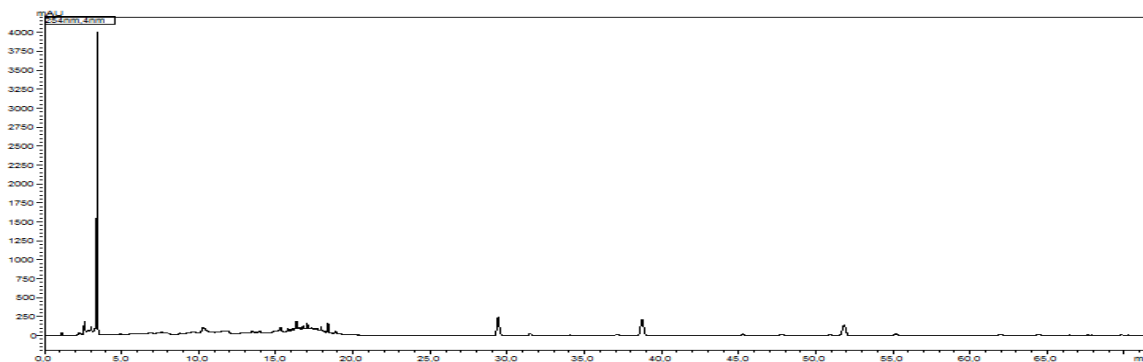
Concentração (mg/mL)	t_R (min)	Média da área dos picos \pm DPM	Concentração corrigida* (mg/mL)
0,0031	48,8	63.084,0 \pm 244,7	0,0030
0,0125	48,7	260.121,0 \pm 287,1	0,0120
0,0500	49,1	1.035.091,5 \pm 583,4	0,0480
0,1000	48,9	2.105.066,5 \pm 737,5	0,0960
0,2000	48,9	4.220.917,0 \pm 848,5	0,1920
0,3000	49,1	6.361.005,5 \pm 8.138,1	0,2880
0,4000	48,9	8.580.578,0 \pm 5.174,6	0,3840
0,5000	49,1	10.690.788,0 \pm 10.287,0	0,4800

*Concentração calculada considerando pureza de 96,0 %.

A partir da equação da reta ($y = 2,11305 \cdot 10^7 x - 5.032,6992$), foi possível calcular a concentração do triterpeno análogo à cordialina A no extrato EtOH 70 % utilizando o valor da área obtido de 238.607 no t_R de 48,8 min, obtendo 0,12 % (m/m) do triterpeno análogo à cordialina A total no extrato, considerando a massa inicial de 10,0 mg de amostra.

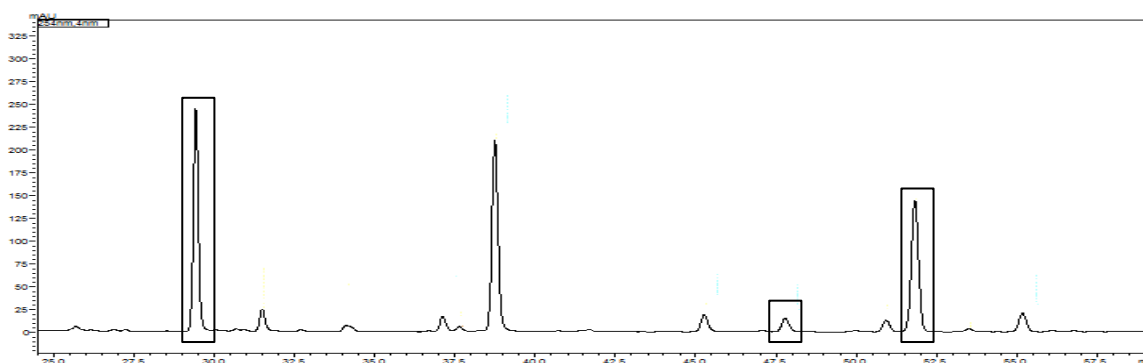
O cromatograma do extrato EtOH 70 % e os picos de interesse estão representados nas Figuras 65 e 66. Na Figura 66, para melhorar a visualização dos picos de interesse, a escala do cromatograma foi diminuída.

Figura 65 - Cromatograma do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* para a quantificação de substâncias.



Nota: Condições cromatográficas: coluna Thermo Scientific® C18 (4,6 x 250 mm; 5 μ m); fase móvel água (A) e acetonitrila (B) em modo gradiente: 0-10 min 6-20 % B, 10-13 min 20-35 % B, 13-60 min 35-68 % B, 60-62 min 68-100 % B, modo isocrático: 62-72 min 100 % B, vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector DAD no comprimento de onda de 254 nm.

Figura 66 - Picos de interesse para a quantificação de substâncias.



Nota: Os quadros inseridos evidenciam os picos de interesse nos t_R aproximados de 30, 49 e 53 min.

Os resultados da quantificação da 4',5-diidroxí-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A e do triterpeno análogo à cordialina A e os perfis cromatográficos obtidos (Figuras 59 e 65) sugerem a presença de substâncias majoritárias no extrato EtOH 70 % que não absorvem no UV/Vis. Cabe ressaltar que a análise dos dados obtidos por CLAE-DAD

mostrou que em 250 nm há o maior número de picos e os mesmos apresentam maiores valores de área.

Pode-se sugerir que a atividade antioxidante do extrato é atribuída parcialmente ao flavonoide 4',5-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, mesmo se apresentando em baixa concentração (0,66 %; m/m), uma vez que os flavonoides são as principais substâncias que apresentam propriedades antioxidantes em uma espécie vegetal. Vale ressaltar também que esta atividade pronunciada pode estar relacionada às substâncias que estão co-eluidando ($t_R = 23$ min) (Figura 59), pois são as majoritárias e apresentaram espectro no UV característico de flavonoides (Figura 60).

4.7 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO FATOR DE PROTEÇÃO SOLAR (FPS)

Atualmente, há um interesse crescente para o desenvolvimento de filtros baseados em produtos naturais, visto a atual tendência por cosméticos verdes. Substâncias de origem natural têm sido consideradas como potenciais recursos para a proteção solar ou para atuar sinergicamente com os filtros solares químicos e físicos, principalmente pela capacidade de absorção da radiação ultravioleta pelos cromóforos, associada à possível atividade antioxidante dos extratos vegetais (SANTOS, 2010; GUARATINI et al., 2009). Dentro deste contexto, fez-se importante a avaliação do FPS do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea* incorporado à formulação cosmética obtida de acordo com o item 3.8.

Os resultados estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10 - Valores de FPS de diferentes concentrações de extrato EtOH 70% incorporados à formulação cosmética com ou sem filtro solar orgânico.

Formulações	FPS \pm DPM
FB + extrato a 0,02 %	1,01 \pm 0,01 ^a
FB + extrato a 0,20 %	1,13 \pm 0,09 ^a
FB + extrato a 2,00 %	1,58 \pm 0,10 ^b
FB + etilhexil metoxicinamato 4,00 %	10,54 \pm 0,23 ^c
FB + extrato a 0,02 % + etilhexil metoxicinamato 4,00 %	11,05 \pm 0,23 ^d

Nota: Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$. FB: formulação base; FPS: fator de proteção solar.

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que o extrato EtOH 70 % não apresentou valor significativo de FPS em nenhuma das concentrações testadas. Como a concentração de 2,00 % de extrato desestabilizou a formulação, adquirindo uma aparência e cor

indesejáveis, foi escolhida a concentração de 0,02 % para avaliar um possível sinergismo com o filtro solar orgânico etilhexil metoxicinamato a 4,00 %, porém não houve aumento considerável do FPS, mesmo possuindo valores com diferença estatística significativa.

O extrato analisado apresentou esta característica insatisfatória, porém Oda et al. (2015) avaliaram o FPS em formulação cosmética de extrato etanólico 70 % de torta de sementes de *C. arabica* pelo mesmo método. Foram testadas três concentrações diferentes de extrato (0,3, 1,0, e 5,0; m/m) juntamente com um filtro solar sintético e foi observado um aumento considerável do FPS, mesmo utilizando o extrato em baixas concentrações.

5 CONCLUSÕES

Através dos diversos estudos e análises realizados nesta pesquisa em conjunto com relatos da literatura, a *C. verbenacea* se mostrou ser uma importante espécie vegetal que possui variados compostos bioativos, que apresentam, principalmente, ação antioxidante e anti-inflamatória.

Foi possível comprovar a partir das análises realizadas com os três extratos obtidos, que o solvente hidroetanólico se mostrou mais seletivo para compostos fenólicos e flavonoides e substâncias antioxidantes, que foram capazes de capturar, *in vitro*, espécies reativas como DPPH[•], ABTS^{•+}, sendo estes radicais modelos e O₂^{-•}, ROO[•], HOCl e H₂O₂, espécies reativas presentes no organismo, apresentando resultados promissores que se assemelharam ao comportamento de uma substância antioxidante padrão e que poderão ser utilizados, futuramente, em benefício da população. É possível sugerir que os compostos fenólicos e flavonoides podem ser os principais responsáveis pela atividade antioxidante pronunciada do extrato.

De maneira geral, as análises cromatográficas demonstraram maior complexidade química para o extrato EtOH 70 % e três substâncias foram quantificadas (4',5'-diidroxil-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A e um triterpeno análogo à cordialina A), porém apresentaram baixas concentrações, sendo que a substância pertencente à classe dos flavonoides pode estar relacionada parcialmente à atividade antioxidante do extrato.

A *C. verbenacea* é muito utilizada na medicina tradicional na forma de garrafadas por suas propriedades anti-inflamatórias, que são feitas por maceração com uma solução hidroetanólica. Como os processos inflamatórios geram as ERO e, conseqüentemente, desencadeiam o estresse oxidativo, é possível sugerir que a atividade antioxidante pronunciada do extrato EtOH 70 % desta espécie vegetal possui relação com a sua propriedade anti-

inflamatória. Ambos os processos inflamatório e oxidativo estão relacionados e uma maneira de avançar com este estudo, seria investigar a correlação entre a atividade antioxidante do extrato EtOH 70 % de folhas de *C. verbenacea* com a sua atividade anti-inflamatória.

Quanto à citotoxicidade do extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea*, as células HacaT apresentaram maior sensibilidade, enquanto que a linhagem HepG2 foi menos sensível, não apresentando morte celular em nenhuma das concentrações testadas e, portanto, pode ser sugerida a utilização deste extrato como um medicamento, por exemplo, com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias.

O extrato EtOH 70 % de *C. verbenacea*, na concentração de 0,20 % na formulação cosmética, não apresentou efeito fotoprotetor e não é capaz de atuar sinergicamente com o etilhexil metoxicinamato a 4,0 %, para potencializar sua atividade fotoprotetora, porém devido à presença de potenciais substâncias antioxidantes pode ser sugerida sua proteção contra o envelhecimento cutâneo.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; FAINE, L. A. Radicais livres e antioxidantes. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. (Eds.). **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ACHÉ. **Aché**, 2015. Apresentação do produto. Disponível em: <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-aerosol-388/> ou <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-creme-4/>. Acesso em: 14 dez 2015.

ALAM, M. N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 2, p. 143-152, 2013.

ALMEIDA, M. G. J. Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum*. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, 2013.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para a determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim Ceppa**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ARAÚJO, J. M. A. **Química dos alimentos: teoria e prática**. 4. ed. Minas Gerais: UFV. 2008.

ARUNACHALAM; K., PARIMELAZHAGAN, T. Evaluation of phenolic content, antioxidant activity, and nutritional composition of *Cordia alliodora* (Clarke) Gamble. **International Journal of Food Properties**, v. 17, p. 226-238, 2014.

ASSIS, R. P. **Efeito dos solutos urêmicos sobre espécies reativas de oxigênio em sistemas-modelo *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas e Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2012.

ASSIS, R. P. et al. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species *in vitro* model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrology**, v. 16, n. 50, p. 1-13, 2015.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

BABIOR, B. M. The respiratory burst of phagocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 73, p. 599- 601, 1984.

BAIERLE, M. et al. Relationship between inflammation and oxidative stress and cognitive decline in the institutionalized elderly. Hindawi Publishing Corporation, v. 2015, p. 1-12, 2015.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, I. C. E. et al. O gênero *Cordia* L.: Botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**, v. 20, n. 1, p. 07-14, 2002.

BAYEUX, M.C. et al. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1229-1232, 2002.

BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

BECKMAN, K. B.; AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BEGATIN, E. Mecanismos do envelhecimento cutâneo e o papel dos cosmeceuticos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 66, p. 5-11, 2009.

BERGENDI, L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, n. 18, p. 1865-1874, 1999.

BERGER, P. et al. Ozone and hydroxyl radicals induced oxidation of glycine. **Water Research**, v. 33, n. 2, p. 433-441, 1999.

BISWAS, S. K. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-9, 2016.

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*)**. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, 2015.

BORS, W.; BUETTNER, G. R. The vitamin C radical and its reactions. In: PACKER, L., FUCHS, J. (Ed.). **Vitamin C in Health and Disease**. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1997. cap 4, p. 75-94.

BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 796, p. 312-319, 1984.

BRADLEY, D. G.; MIN, D. B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Food Science and Nutricional**, v. 31, n. 3, p. 211-236, 1992.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Por que INCI?**. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Cosmeticos/Assuntos+de+Interesse/Nomenclatura+de+Ingredientes+INCI/Por+que+INCI+Cosmeticos>>. Acesso em: 28 dez 2015.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 2011. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_FitotFitotora_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRASIL. Ministério da saúde. MS elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-antiores-agencia-saude/3487-ms-elabora-relacao-de-plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BRITO, A. R. M. S. Farmacologia de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Médica.**, v. 68, p. 445-448, 2002.

BUDAVARI, S. et al. **The Merck Index (an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals)**. 14. ed. Whitehouse Station, NJ, USA: MERCK & CO.,INC, 2006.

CABANIS, A. et al. Effect of the protein kinase C inhibitor GF 109 203X on elastase release and respiratory burst of human neutrophils. **General Pharmacology**, v. 27, n. 8, p. 1409-1414, 1996.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 29, p. 222-230, 2000.

CALIXTO, J. B. Estudo farmacológico pré-clínico de plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Org.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CASTRO, A. C. C. M. **Avaliação do perfil químico de fenólicos, do potencial antioxidante e fotoprotetor da torta de semente de *Coffea arabica* L. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, C.; PEARSON, A. M.; GRAY, J. I. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds, **Food Chemistry**, v. 43, p. 177-183, 1992.

CHERUBINI, A. et al. Potential markers of oxidative stress in stroke. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 7, p. 841-852, 2005.

CHIARI, B. G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

CHIARI, B. G. et al. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research of Cosmetic Science**, v. 2, n. 2, p. 8-14, 2012.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to antiasthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CHIRINOS, R. et al. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, v. 55 n. 2, p-217-225, 2007.

- CODORNIU-HERNÁNDEZ, E.; KUSALIK, P. G. Mobility mechanism of hydroxyl radicals in aqueous solution via hydrogen transfer. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 532–538, 2012.
- CORRADINI, E. et al. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, n. 5, p. 469-495, 2011.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2000.
- COSTA, A. et al. Eficácia *in-vitro* e clínica do uso cosmético tópico de fitoestrógenos em pele fotoenvelhecida. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 2, p. 137-149, 2012.
- COSTA, M., XIMENES, V. F., FONSECA, L. M. Hypochlorous acid inhibition by acetoacetate: implications on neutrophil functions. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, p. 1183-1187, 2004.
- CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.
- DARMANYAN, A. P. et al. Quenching of singlet oxygen by oxygen- and sulfur-centered radicals: evidence for energy transfer to peroxy radicals in solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, p. 396-403, 1998.
- DE CARVALHO JR., P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.
- DEUSCHLE et al. Phytochemical evaluation and *in vitro* antioxidant and photo-protective capacity of *Calendula officinalis* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 693-701, 2015.
- DIAZ, J. et al. Reference intervals for four biochemistry analytes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 2215-2217, 1998.
- DIEAMANT, G. et al. Avaliação *in vitro* do perfil de segurança de cosmecêuticos contendo fatores de crescimento e seus análogos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2012.
- DOWHAN, W.; BOGDANOV, M.; MILEYKOVSKAYA, E. Functional roles of lipids in membranes. In: RIDGWAY, N. D.; MCLEOD, R. S., editores. **Biochemistry of Lipids. Lipoproteins and Membranes**. 6. ed. Elsevier Press: Estados Unidos da América, 2016, p. 5.
- DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, p. 459-469, 2010.
- DURACKOVÁ, Z. Oxidants, antioxidants and redox stress. In: DURACKOVÁ, Z.; KNASMÜLLER, S. **The Activity of Natural Compounds in Diseases Prevention and Therapy**. Bratislava: SAP, 2007, p. 11-59.

DURASAMY, A. et al. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2011.

EDDINE, L. S. et al. Free radical scavenging activity of leaf extract of *Rumex vesicarius* L. obtained by different methods. **Toxicological and Pharmacological Research**, v. 7, n. 4, 2015.

EUCH, S. K. E.; BOUJILAC, J.; BOUZOUITAA, N. Chemical composition, biological and cytotoxic activities of *Cistus salviifolius* flower buds and leaves extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1100-1105, 2015.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

EWING, G. W. **Métodos Instrumentais de Análise Química**. v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, 1972.

FALKEMBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alphahumulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228–236, 2007.

FERRARI, C. K. B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia**, v. 55, p. 581-590, 2000.

FERREIRA, A.L.; MATSUBARA, L.S. Free radicals: concepts, diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, I. C. F. R., BARROS, L., ABREU, R. M. V. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1543–1560, 2009.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996.

FICARRA, R.; FICARRA, P.; TOMMASNI, S. Leaf extracts of some *Cordia* species analgesic and anti-inflammatory activities as well as their chromatographic analysis. **Farmaco**, v. 50, p. 245-256, 1995.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239-247, 2000.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloids exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, p. 191–206, 2009.

- FOOK, J. M. S. L. L. et al. A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. **Life Sciences**, v. 76, n. 25, p. 2881-2891, 2005.
- GILES, G. I., TASKER, K. M., JACOB, C. Hypothesis: the role of reactive sulfur species in oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 1279-1283, 2001.
- GLASSER, S. P.; SELWYN, A. P.; GANZ, P. Atherosclerosis: risk factors and the vascular endothelium. **American Heart Journal**, v. 131, n. 2, p. 379-384, 1996.
- GODMAN, M. et al. Clinical trials of antioxidants as cancer prevention agents: past, present and future. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 1068-1084, 2011.
- GUARATINI, T. et al. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 717-721, 2009.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.
- HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 1-32, 1990.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M., 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 125-126, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. Nova York: Oxford, 2010.
- HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophils phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p. 3007- 3017, 1998.
- HANDA, S. S. et al. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste: United Nations Industrial Development Organization e International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO), 2008.
- HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HARMAND, D. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journals of Gerontology**, v. 11, p. 298-300, 1956.
- HARRIS, M. I. N. C. **Pele - Estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3. ed. São Paulo: Senac, 2009, p. 299-300.
- HARSHAA, S. N.; ANILAKUMAR, K. R.; MITHILA; M. V. Antioxidant properties of *Lactuca sativa* leaf extract involved in the protection of biomolecules. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 367-373, 2013.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 63, p. 1-10, 2008.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E.; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418-424, 2004.

HO, Y.; YU, H.; SU, N. Re-examination of chromogenic quantitative assays for determining flavonoid content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2674-2681, 2012.

HOYOS, J. M. A. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 36, n. 3, p. 270-284, 2012.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

JAHAN, N. et al. Studies on the antioxidant activity of ethanol extract and its fractions from *Pterygota alata* leaves. **Journal of Acute Medicine**, n. 4, p. 103-108, 2014.

JI-YONG, S. et al. Determination of total flavonoids content in fresh *Ginkgo biloba* leaf with different colors using near infrared spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 94, p. 271-276, 2012.

JOHNSTONE, M. T. et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. **Circulation**, v. 88, n. 6, p. 2510-6, 1993.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KAHL, R. Synthetic antioxidants: biochemical actions and interference with radiation, toxic compounds, chemical mutagens and chemical carcinogens. **Toxicology**, v. 33, p. 185-228, 1984.

KALE, S. et al. Formulation and in-vitro determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. seed oil sunscreen cream. **International Journal of PharmTech Research**, v. 2, n. 4, p. 2194-2197, 2010.

KALYANARAMAN, B.; SOHNLE, P. G. Generation of free radical intermediates from foreign compounds by neutrophil derived oxidants. **Journal of Clinical Investigation**, v. 75, p. 1618-1622, 1985.

KANCHEVA, V. D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chainbreaking activity: a comparative study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 1072-1089, 2009.

KAJARIA, D. K. et al. Evaluation of *in vitro* antioxidant capacity and reducing potential of polyherbal drug- *Bhāraṅgyādi*. **Ancient Science of Life**, v. 32, n. 1, p. 24-28, 2012.

KEANEY JR, J. F.; LOSCALZO, J. Diabetes, oxidative stress, and platelet activation. **Circulation**, v. 99, n. 2, p. 189-191, 1999.

KHALIL, N. M.; PEPATO, M. T.; BRUNETTI, I. L. Free radical scavenging profile and myeloperoxidase inhibition of extracts from antidiabetic plants: *Bauhinia forficata* and *Cissus sicyoides*. **Biological Research**, v. 41, p. 165-171, 2008.

KHLEBNIKOV, A. I. et al. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1749–1770, 2007.

KIM, B.J. et. al. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 19, p. 299-307, 1997.

KITZBERGER, C.S.G. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 631-638, 2007.

KOHEN R.; GATI, I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. **Toxicology**, v. 148, p. 149-157, 2000.

KOHEN, R. Skin antioxidants: Their role in aging and in oxidative stress - new approaches for their evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 181-192, 1993.

KOHEN, R.; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 24, n. 2, p. 103-123, 1997.

LAGE, M. A. P et al. A new microplate procedure for simultaneous assessment of lipophilic and hydrophilic antioxidants and pro-oxidants, using crocin and β -carotene bleaching methods in a single combined assay: Tea extracts as a case study. **Food Research International**, v. 53, p. 836-836, 2013.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extract prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**, v. 71, p. 214-501, 2005.

LINS, A. P. et al. Two flavonoids from *Cordia verbenacea*. **Revista Latino-Americana de Química**, v. 21, n. 82, 1990.

LIYANA-PATHIRANA, C.; SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolics compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, Washington, v. 93, p. 45-56, 2005.

LORDÊLLO, D. M. S. **Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas. Dissertação.** (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

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

LÜ, J. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, p. 840-860, 2010.

LÚCIO, M. et al. Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies *in vitro*. **Food Biophysics**, v. 4, p. 312–320, 2009.

LUSSIGNOLI, S. et al. A microplate based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 38-44, 1999.

MAFIOLETI, L. et al. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 576-582, 2013.

MAGALHÃES, J. **Cosmetologia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2000.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MARTINS, N. et al., Antioxidant potential of two Apiaceae plant extracts: A comparative study focused on the phenolic composition. **Industrial Crops and Products**, v. 79, p. 188-194, 2016.

MATIAS, E. F. F. et al. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campetris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.

MATIAS, E. F. F. et al. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Cordia verbenaceae* DC. **Indian Journal Of Medical Research**, v. 137, p. 178-182, 2013.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

MATTILA, H. et al. Reactive oxygen species: reactions and detection from photosynthetic tissues. **Photochemistry and Photobiology**, 2015.

MECCIA, G. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* from the Venezuelan Andes. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1119-1122, 2009.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC. obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 89-96, 2011.

MIN, D. B., BOFF, J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 1, p. 58-72, 2002.

MOI, R.C. **Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Universidade de São Paulo (USP). Escola de enfermagem de Ribeirão Preto, 2004.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases moleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 263-269, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668-676, 2005.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais de antioxidantes. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ODA, F. B. et al. Avaliação *in vitro* do fator de proteção solar em formulações contendo extrato de torta de *Coffea arabica* L. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, Supl. 1, 2015.

OKIN, D.; MEDZHITOV, R. Evolution of inflammatory diseases. **Current Biology**, v. 22, n. 17, p. 733-740, 2012.

OLIVEIRA, F. De; AKISUE, G. **Fundamentos de Farmacobotânica e de Morfologia Vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

OZSOY, N.; CANDOKEN, E.; AKEV, N. Implications for degenerative disorders antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 99-106, 2009.

PACKER, J. E.; SLATER, T. F.; WILSON, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, v. 278, p. 737-738, 1979.

PARISOTTO, E. B. **Avaliação da atividade antitumoral do extrato bruto e supercrítico de *Cordia verbenacea***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2011.

PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 101-107, 2012.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2006.

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

PERINI, J. A. et al. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 203, 2015.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINHO, L. et al. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from rosemary, peppertree, barbatimão and erva baleeira leaves and from pequi peel meal. **Ciência Rural**, v. 42, n.2, 2012.

PINNELL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 1, p. 1-19, 2003.

PIZZA, V. et al. Oxidative stress and aging: a clinical and biochemical study. **Pharmacology OnLine**, v. 2, p. 28-37, 2013.

POKORNÝ, J. Are natural antioxidants better - and safer - than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 629-642, 2007.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, p. 1142-1145, 2006.

PRABHU P, R. et al. Scavenging potential of reactive oxygen species by Tetra-hydrocurcumin. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 5, p. 114-118, 2011.

PRIETO, M. A; VÁZQUEZ, J. A. *In vitro* determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. **Food Research International**, v. 62, p. 1183-1196, 2014.

PUJOL, A. P. Nutrição Aplicada à Estética. In: **Fisiologia do envelhecimento cutâneo**. Rio de Janeiro: Rubio, 2011.

- RAHAL, A. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, 2014, Article ID 761264, 19 pages, 2014.
- RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.
- RAMOS, C. et al. *Cordia verbenacea*: planta contra inflamação. **Journal Phytomedica**, n. 1, 2005.
- RATNAM, D.V. et al. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, 2006.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.
- RODRIGUES, A. P. **Oxidação de compostos β -dicarbonílicos por peroxidase**. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.
- RODRIGUES, F. F. G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 2012.
- ROLDÃO, E.F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.
- RUBY, K. et al. *In-vitro* antioxidant and hemorrhoidal potential of hydroethanolic leaf extracts of *Bergenia ciliata*, *Bergenia ligulata* and *Bergenia stracheyi*. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 5, n. 5, p. 34-46, 2015.
- SALGANIK, R. I. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, n. 5 Suppl, 2001.
- SANDES, A.R.R.; DI BLASI, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 13, p. 28-32, 2000.
- SANTI, M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256-261, 2014.
- SANTOS, J. S. Antioxidantes de origem vegetal em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 22, p. 46-52, 2010.
- SANTOS, M. C. B. G. **Estratégias tecnológicas em transformação: um estudo da indústria farmacêutica brasileira**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2010.

- SANTOS, R. P. et al. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the Northeast of Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1027-1030, 2006.
- SCHNEIDER, A. P. **Nutrição estética**. São Paulo: Atheneu, 2009.
- SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153-166, 2007.
- SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento cutâneo à luz da Cosmetologia**: estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo: Tecnopress, 2003.
- SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, p. 338-344, 2005.
- SERTIÉ, J. A. et al. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, v. 56, p. 36-40, 1990.
- SHARIFIFAR, F.; NUDEH, G. D.; MIRTAJALDINI, M.. Major flavonoids with antioxidant activity from *Teucrium polium* L. **Food Chemistry**, v. 112, p. 885–888, 2009.
- SHARMA, O. P.; BHAT, K. B. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.
- SHARMA, V. et al. Preliminary phytochemical screening and in vitro antioxidant potential of hydro-ethanolic extract of *Euphorbia neriifolia* Linn. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3, n. 1, p. 124-132, 2011.
- SILVA, D. C. M. N. et al. Evaluation of the antiradicals, antioxidant and antibacterial activities of extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids, PROSCIBA**. Foz do Iguaçu, Brasil, 2007.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2010.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-178, 1999.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15. n.1, p. 71-8, 2002.

SPERTINI, O. et al. Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leucocyte adhesion. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 2565-2573, 1991.

SQUADRITO, G. L., PRYOR, W. A. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxy nitrite and carbon dioxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, p. 392-403. 1998.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.). **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. Londres: Academic Press, 1990, p. 71-133.

SUZUKI, T.; CHOW, C.; DOWNEY, G. P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, n. 6, p. 1348-1361, 2008.

TADDEI, S. et al. Hypertension causes premature aging of endothelial function in humans. **Hypertension**, v. 29, n. 3, p. 736-743, 1997.

TELESZKO, M. WOJDYLO, A. Comparison of phenolic compounds and antioxidant potential between selected edible fruits and their leaves. **Journal of Functional Foods**, n. 14, p. 736-746, 2015.

TICLI, F. K. et al. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxicology**, v. 46, p. 318-327, 2005.

TUBARO, F. et al. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radicals in Biology and Medicine**, v. 24, n. 7/8, p. 1228-1234, 1998.

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VELDE, V. V. et al. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

VÎRGOLICE, B. et al. Relation between inflammation and oxidative stress markers in diabetic foot patients. **Romanian Journal of Biophysics**, v. 18, n. 4, p. 273-282, 2008.

VONGSAK, B. et al. Maximizing total phenolics, total flavonoids contents and antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaf extract by the appropriate extraction method. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 566-571, 2013.

WEISS, S. J. Tissue destruction by neutrophils. **New England Journal of Medicine**, v. 320, p. 365-376, 1989.

WERBER, J. et al. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 8, p. 3307-3315, 2011.

WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; Assays for the Chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 502-512, 1994.

WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 20, n. 6, p. 1430-42, 2000.

WRIGHT, H. L. et al. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1618-1631, 2010.

ZGLICZYNSKI, T. J. M. et al. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 235, p. 419-424, 1971.

ZUURBIER, K. W. et al. Human Hemi-myeloperoxidase. Initial chlorinating activity at neutral pH, compound II and III formation, and stability towards hypochlorous acid and high temperature. **European Journal of Biochemistry**, v. 205, p. 737-742, 1992.