

Jéssica Pereira de Azevedo

**Análise cromatográfica e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora
do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual
Paulista para obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Coorientador: Juhan Augusto Scardelato Pereira

Araraquara

2016

Dedico este trabalho aos meus pais Marineide e Pedro e minha avó Lúcia, que sempre me apoiaram, me ajudaram e acreditaram em mim, mesmo nos momentos de dificuldade. Obrigada por estarem sempre presentes, obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

À minha família por todo o apoio.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pelos ensinamentos, paciência e dedicação durante todos esses anos em que estive no Laboratório de Farmacognosia.

Ao pós-doutorando e coorientador Juhan Augusto Scardelato Pereira por toda a ajuda e paciência.

A todos os graduandos e pós-graduandos do Laboratório de Farmacognosia que de alguma forma me ajudaram a realizar esse trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Farmacognosia Caio Perego por toda a ajuda para a execução dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas de graduação, à minha colega de casa e amiga Isabela e, principalmente, às minhas amigas de Santa Rita do Passa Quatro, Ana Victória e Roberta, pela amizade e pelo apoio.

Lista de ilustrações

Figura 1: Estruturas químicas dos compostos α -humuleno e (<i>E</i>)-cariofileno.....	11
Figura 2: <i>Cordia verbenacea</i> DC.	12
Figura 3: Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia	14
Figura 4: Representação de uma análise por CG.....	15
Figura 5: Aparelho tipo Clevenger modificado acoplado a balão com manta de aquecimento.....	18
Figura 6: Esquema do procedimento realizado para a determinação da atividade antioxidante	19
Figura 7: Gráfico da porcentagem de inibição (captura) do radical do DPPH• <i>versus</i> a concentração de óleo essencial (mg/mL).....	22
Figura 8: Gráfico da porcentagem de inibição (captura) do radical do DPPH• <i>versus</i> a concentração de ácido ascórbico (mg/mL).....	23
Figura 9: Cromatoplasmas do óleo essencial utilizando diferentes fases móveis.....	26
Figura 10: Cromatoplasma do óleo essencial utilizando hexano como fase móvel....	27
Figura 11: Cromatograma obtido por CG-EM do OE de <i>C. verbenacea</i>	28
Figura 12: Expansão do cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de <i>C. verbenacea</i>	28

Lista de tabelas

Tabela 1: Componentes utilizados para a preparação das formulações	20
Tabela 2: Fator de proteção solar das formulações A, B, C e D.....	24
Tabela 3: Proposta de identificação do OE a partir de análises por CG-EM.....	29

Lista de abreviaturas

OE: óleo essencial

DPPH•: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

CCD: cromatografia em camada delgada

CG: cromatografia gasosa

FPS: fator de proteção solar

Cl₅₀: concentração inibitória 50%

UV/Vis: ultra violeta - visível

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

Resumo

1. Introdução.....	10
1.1 <i>Cordia verbenacea</i> DC.	10
1.2 Envelhecimento cutâneo e antioxidantes.....	12
1.3 Cromatografia.....	13
2. Justificativa.....	16
3. Objetivos.....	16
3.1 Objetivos gerais.....	16
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. Material e métodos.....	17
4.1 Materiais.....	17
4.2 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial das folhas de <i>C.verbenacea</i>	17
4.3 Ensaio de atividade antioxidante utilizando radical 2,2-difenil-1-picril- hidrazila (DPPH•).....	18
4.4 Preparação das formulações.....	19
4.5 Avaliação do fator de proteção solar das formulações.....	21
4.6 Análise do OE por cromatografia em camada delgada.....	21

4.7 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	21
5. Resultados e Discussão.....	22
5.1 Ensaio de atividade antioxidante.....	22
5.2 Avaliação do fator de proteção solar.....	24
5.3 Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada.....	25
5.4 Cromatografia gasosa.....	27
6. Conclusão.....	30
7. Referências bibliográficas.....	31

RESUMO

Cordia verbenacea DC. é a principal planta representante da família Boraginaceae no Brasil. Trata-se de um arbusto encontrado em grande parte do litoral brasileiro, principalmente na região da Floresta Tropical Atlântica. Popularmente conhecida como erva-baleeira, tem ação anti-inflamatória, anti-úlceras e cicatrizante. A ação anti-inflamatória se deve aos componentes do óleo essencial, principalmente o α -humuleno e (*E*)-cariofileno. Além disso, o óleo essencial de *C. verbenacea* possui baixa toxicidade, o que torna seu uso seguro. Em um trabalho realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que os extratos etanólico, hidroetanólico 70% e aquoso de *C. verbenacea* apresentam potencial antioxidante. Neste trabalho foi realizada uma análise cromatográfica do óleo essencial de *C. verbenacea* e avaliação da ação antioxidante e fator de proteção solar (FPS) do mesmo. O óleo essencial foi extraído das folhas de *C. verbenacea* utilizando um Clevenger modificado e foi armazenado em congelador. Para avaliação da atividade antioxidante, foi utilizado o método de captura do radical DPPH• e ácido ascórbico como padrão, que foram analisados em espectrofotômetro. Já para a avaliação do FPS, foram desenvolvidas quatro formulações do tipo emulsão O/A a frio. Dessa forma, foi possível observar que o óleo essencial não possui componentes com atividade antioxidante significativa, nem que possam ser utilizados na proteção solar. As análises cromatográficas permitiram obter perfis químicos do óleo essencial, bem como identificar os compostos α -humuleno e (*E*)-cariofileno.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae)

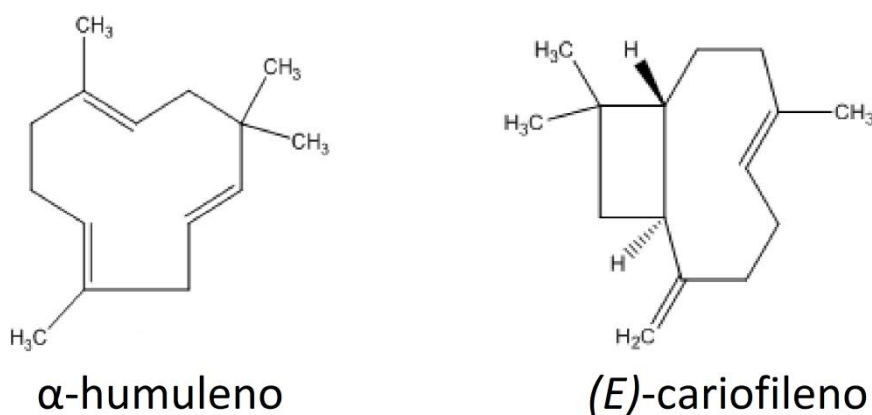
Principal representante da família Boraginaceae no Brasil, *Cordia verbenacea* DC. é um arbusto muito ramificado com cerca de dois metros de altura, encontrado em grande parte do litoral brasileiro, principalmente na região da Floresta Tropical Atlântica, compreendendo a faixa entre Santa Catarina, Paraná e São Paulo. O gênero *Cordia* pode ser encontrado na Austrália, Nova Caledônia, América Central e Guiana, que correspondem às regiões tropical e subtropical (GILBERT; FAVORETO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2012).

Cordia verbenacea é conhecida como erva-baleeira, camarinha, catinga-de-barão, maria-milagrosa, entre outras denominações (GILBERT; FAVORETO, 2012). Suas partes aéreas são utilizadas popularmente na forma de extratos etanólicos, decocção e infusão (PASSOS *et al.*, 2007) no tratamento de artrite, reumatismo, tendinite crônica, entre outros (RAMOS *et al.*, 2005), já que possuem ação anti-inflamatória, anti-reumática, analgésica e cicatrizante (FERNANDES *et al.*, 2007). A ação anti-inflamatória pode ser atribuída aos componentes de seu óleo essencial (RAMOS *et al.*, 2005), uma mistura complexa de substâncias voláteis e lipofílicas (SIMÕES *et al.*, 2004), a qual é composta basicamente por monoterpenos e sesquiterpenos. Entre seus constituintes principais pode-se citar o α -pineno, o aloaromadendreno, o (*E*)-cariofileno, o β -gurjuneno e o α -humuleno, sendo o último o principal responsável pela ação anti-inflamatória (ARAUJO, 2007). O efeito anti-inflamatório das folhas de *C. verbenacea* é obtido tanto pelo uso tópico, na forma de compressas e pomadas, quanto pelo uso oral, na forma de chá. De acordo com

Gilbert e Favoreto (2012), não foi observada toxicidade aguda significativa, o que sugere sua segurança de uso (GILBERT; FAVORETO, 2012).

O α -humuleno é um sesquiterpeno com forma molecular $C_{15}H_{24}$ e é a principal substância ativa da *C. verbenacea*, responsável pela sua atividade anti-inflamatória (FERREIRA, 2012). Já o (*E*)-cariofileno é encontrado em diversas famílias botânicas e possui, além da atividade anti-inflamatória, atividades antitumoral e antiespasmódica (CARVALHO *et al.*, 2013). Além disso, tanto α -humuleno quanto (*E*)-cariofileno, de acordo com a literatura, apresentam atividades antibacteriana, fungicida e inseticida (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Figura 1. Estruturas químicas dos compostos α -humuleno e (*E*)-cariofileno



O Laboratório Farmacêutico Aché[®] desenvolveu, em 2005, um medicamento à base do óleo essencial de *C. verbenacea*. O Acheflan[®] é indicado para tratar processos inflamatórios locais e tornou-se conhecido por ser o primeiro medicamento fitoterápico desenvolvido com tecnologia 100% nacional. Apresenta-se nas formas farmacêuticas de aerossol e creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial da erva-baleeira, padronizado em 2,3-2,9% de α -humuleno (COUTINHO *et al.*, 2009). Além disto, a espécie vegetal está incluída na lista de 71 plantas com

potencial terapêutico indicadas pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para estudos e no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (COUTINHO et al., 2009; BRASIL, 2011).



Figura 2. *Cordia verbenacea* DC. Fotografada por Juhan A. S. Pereira no CPQBA UNICAMP em Paulínia – SP.

1.2 Envelhecimento cutâneo e antioxidantes

O envelhecimento cutâneo envolve alterações gradativas da pele causadas pelo avanço da idade ou por fatores ambientais e é caracterizado pela diminuição da funcionalidade das células desse tecido. Os principais sinais de envelhecimento são o aparecimento de rugas, a perda de firmeza, da elasticidade, da densidade e tonicidade da pele e atrofia (BEGATIN, 2009). O envelhecimento cutâneo pode ser dividido em intrínseco ou cronológico e extrínseco ou fotoenvelhecimento (COSTA, 2012). O primeiro é causado por fatores genéticos e acompanha o processo ocorrido com outros órgãos, decorrente da degeneração natural do corpo. Já o fotoenvelhecimento é consequência das radiações ultravioletas A e B, que são responsáveis por mudanças moleculares e produção de radicais livres e espécies reativas, causando degradação do tecido cutâneo (SBCE, 2010).

O envelhecimento é uma consequência do chamado estresse oxidativo, que é o desequilíbrio do mecanismo de defesa antioxidante presente no organismo (SCOTTI *et al.*, 2007). Assim, com o aumento da expectativa de vida da população, vem aumentando a procura de antioxidantes, que são substâncias que retardam ou bloqueiam reações de oxidação causadas por oxidantes (SCOTTI *et al.*, 2007). Entre as substâncias antioxidantes podem-se citar a vitamina E, ácido ascórbico, selênio, entre outros (SOUSA *et al.*, 2007).

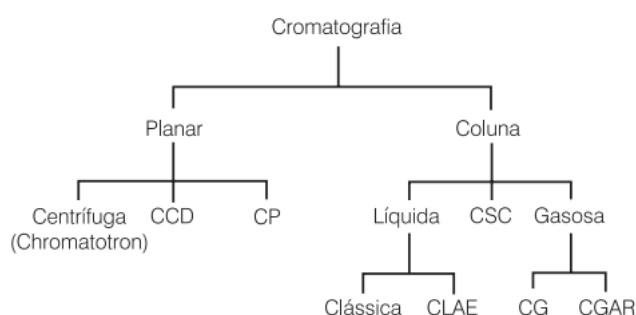
Recentemente, há um maior incentivo em pesquisas sobre tratamento, prevenção e controle do envelhecimento cutâneo, principalmente utilizando ativos vegetais, com o intuito de incorporá-los em formulações cosméticas (DIEAMANT *et al.*, 2012).

1.3 Cromatografia

Cromatografia é um método físico-químico de separação de substâncias pela distribuição diferencial dos componentes de uma mistura entre as fases estacionária e móvel (DEGANI *et al.*, 1998), com o objetivo de separar, identificar e quantificar espécies químicas (COLLINS *et al.*, 2006). O princípio dos métodos cromatográficos se dá pelas diferentes interações entre os componentes da mistura estudada e as duas fases imiscíveis que compõem a cromatografia: fase móvel e fase estacionária (DEGANI *et al.*, 1998). Essa diferença de afinidade entre os componentes da amostra e as fases móvel e estacionária resulta na separação dos componentes da mistura (COLLINS *et al.*, 2006).

A cromatografia pode ser dividida em: cromatografia planar, quando a fase estacionária fica disposta em uma superfície plana, e cromatografia em coluna, quando a fase estacionária é colocada em um tubo cilíndrico (COLLINS *et al.*, 2006).

Figura 3. Representação esquemática dos diferentes tipos de cromatografia (DEGANI *et al.*, 1998). CCD: cromatografia em camada delgada; CP: cromatografia em papel; CSC: cromatografia supercrítica; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; CGAR: cromatografia gasosa de alta resolução

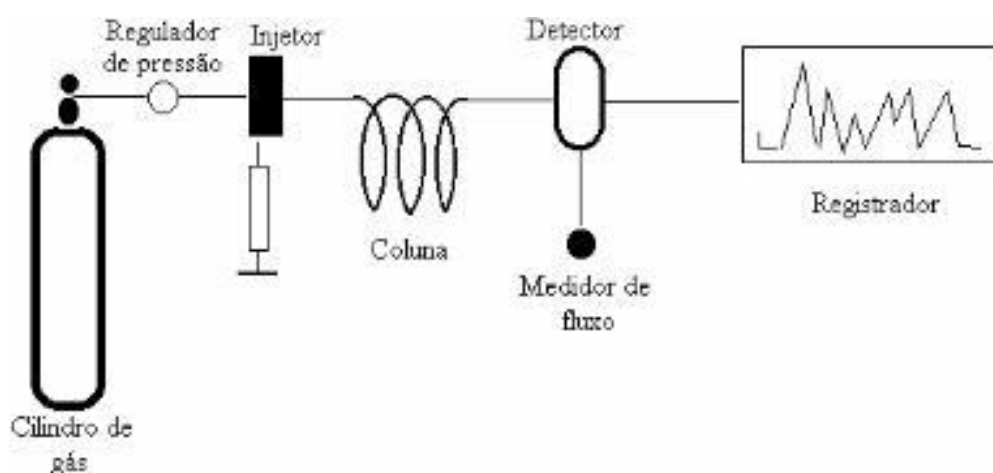


A cromatografia em camada delgada (CCD) é utilizada como um método de análise, seja para analisar uma determinada amostra ou para avaliar os resultados de uma separação (SIMÕES *et al.*, 2004). A separação dos componentes se dá através da migração diferencial destes sobre a fase estacionária (COLLINS *et al.*, 2006). É uma técnica de fácil execução e interpretação, rápida e de baixo custo (COLLINS *et al.*, 2006). A fase estacionária mais utilizada é a sílica gel, já que, graças aos grupos silanóis, ela possui alta polaridade. Já a fase móvel pode ser composta de um ou mais solventes que devem ter polaridade média a baixa quando se utiliza sílica gel. A identificação em CCD baseia-se na comparação do fator de retenção (R_f) e coloração da banda de um padrão com uma banda correspondente na amostra. O R_f consiste na razão entre a distância percorrida pela substância e a

distância percorrida pela fase móvel. Geralmente, é necessário utilizar um revelador para analisar o resultado pois, na sua maioria, os compostos orgânicos são incolores (DEGANI *et al.*, 1998).

A cromatografia gasosa (CG) é utilizada principalmente na separação de substâncias de uma mistura de compostos voláteis (SIMÕES *et al.*, 2004). A separação ocorre pela distribuição dos componentes entre a fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida, e a fase móvel, que é gasosa (COLLINS *et al.*, 2006). A amostra é injetada no interior de uma coluna contendo a fase estacionária e, de acordo com as propriedades da amostra (volatilidade e polaridade) e da fase estacionária, os componentes da amostra ficam retidos na fase estacionária e saem da coluna em tempos diferentes, possibilitando a detecção e a quantificação das diferentes substâncias que compõem a amostra (COLLINS, 2006).

Figura 4. Representação de uma análise por CG



2. JUSTIFICATIVA

O óleo essencial de *C. verbenacea* é muito estudado no ponto de vista de sua atividade anti-inflamatória. Porém, durante análise bibliográfica, foi possível notar a escassez de informações sobre sua atividade antioxidante e ação fotoprotetora. Além disso, foi possível encontrar alguns estudos sobre atividade antioxidante em óleos essenciais de outras espécies, como é o caso de *Caryophyllus aromaticus* L. (Scherer *et al.*, 2009) e espécies de *Crotons* (Moraes *et al.*, 2006). Em um trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa, pela aluna de pós-graduação Gabriela Brasil Romão, foi demonstrado que extratos etanólico, hidroetanólico 70% e aquoso de *C. verbenacea* apresentaram atividade antioxidante significativa.

Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. verbenacea* e sua ação fotoprotetora, ambos “*in vitro*”, com o intuito de incorporá-lo em uma formulação cosmética, já que seria extremamente vantajoso o desenvolvimento de uma formulação com ação anti-inflamatória, antioxidante e fotoprotetora, além de realizar uma breve análise cromatográfica do óleo essencial de *C. verbenacea*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise cromatográfica do óleo essencial extraído de folhas de *Cordia verbenacea* DC. e avaliar sua atividade antioxidante e a ação fotoprotetora de uma formulação fitocosmética contendo o óleo essencial.

3.2 Objetivos específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas de *C. verbenacea*;
- Avaliar a atividade antioxidante por método “*in vitro*”;
- Desenvolver uma formulação fitocosmética para avaliação do Fator de Proteção Solar (FPS);
- Avaliar o óleo essencial por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para caracterização fitoquímica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) e o ácido ascórbico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®; os solventes metanol, tolueno, acetato de etila, hexano e diclorometano foram obtidos da empresa Synth®.

Os seguintes equipamentos foram utilizados: balança analítica (Acculab®), estufa de circulação de ar, aparelho tipo Clevenger modificado (WASICKY, 1963), espectrofotômetro com cubetas Shimadzu® modelo 1800 e aparelho para determinação de FPS Optometrics® modelo SPF-290S.

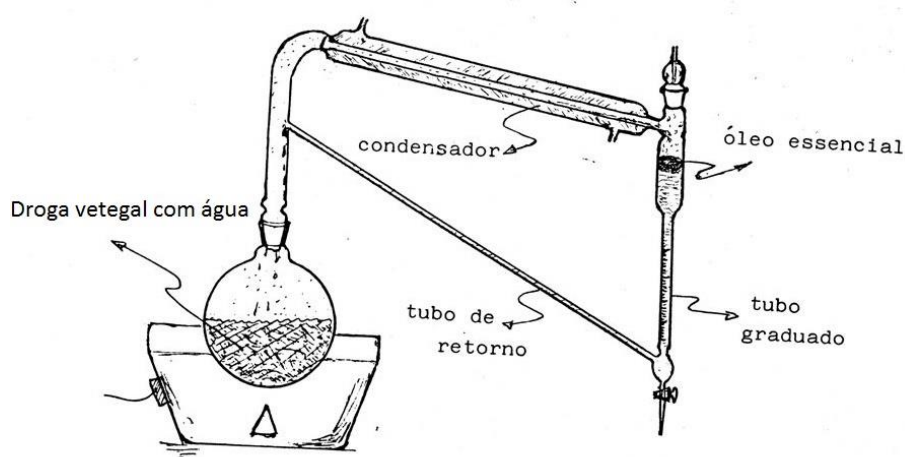
4.2 Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial (OE) das folhas de *C. verbenacea* DC (Boraginaceae)

As folhas da *C. verbenacea* foram coletadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), localizado em Paulínia-SP (coordenadas aproximadas de

22°47'15.91"S 47°06'42.87"O) entre os dias 15/01/2015 e 18/03/2015, entre as dez da manhã e o meio-dia. O material vegetal foi submetido à secagem em estufa com circulação de ar à 40° C por 72 h.

O OE foi obtido através de extração por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger modificado (WASICKY, 1963) acoplado a balão de 5 L. Foram feitas cinco extrações e em cada extração, utilizou-se cerca de 100 g de folhas de *C. verbenacea* e 2,5 L de água deionizada. Após o final da extração, o óleo foi retirado utilizando um conta-gotas e armazenado em congelador em frascos do tipo *vial*; as gotículas de água que foram retiradas juntamente com o OE do Clevenger formaram pequenos cristais de gelo e, desta forma, foi possível retirar a água.

Figura 5. Aparelho tipo Clevenger modificado acoplado a balão com manta de aquecimento (WASICKY, 1963).

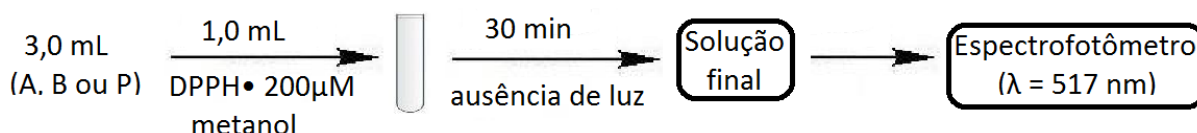


4.3 Ensaio de atividade antioxidante utilizando radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•)

O ensaio de atividade antioxidante com o OE foi feito seguindo o método descrito por Sharma e Bhat (2009), utilizando DPPH•. A solução de DPPH• foi

preparada em metanol na concentração de 200 μM . Primeiramente, foi adicionado 1 mL de solução de DPPH• em 3 mL de solução de amostras de OE em diferentes concentrações (Figura 6). O ensaio foi realizado em triplicata utilizando as seguintes concentrações de OE: 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0; 14,0 e 16,0 mg/mL. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz por 30 min e as leituras das absorbâncias foram feitas em 517 nm em espectrofotômetro UV/Vis de cubetas. Então, foram calculadas as médias das absorbâncias de cada concentração e a porcentagem de captura do radical DPPH•. Esse mesmo ensaio foi realizado com ácido ascórbico, que foi utilizado como substância antioxidante padrão. O ácido ascórbico foi solubilizado em água deionizada em diferentes concentrações (0,9; 1,8; 2,6; 3,5; 4,4 e 5,3 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 6. Esquema do procedimento realizado para a determinação da atividade antioxidante. A: amostra (óleo essencial), B: branco e P: padrão (ácido ascórbico)



4.4 Preparação das formulações

Para que houvesse uma avaliação adequada do fator de proteção solar, foram desenvolvidas quatro formulações do tipo emulsão O/A a frio para que não houvesse perda de substâncias voláteis. Essas formulações foram denominadas de A a D, sendo A uma base, B a base contendo metoxicinamato de octila, um filtro solar químico, C a base contendo OE de *C. verbenacea* e D consiste na base contendo o filtro solar e o OE. Os componentes utilizados e suas concentrações são descritas na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1. Componentes utilizados para a preparação das formulações.

Componentes	A	B	C	D
<i>Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil; Polyacrylic Acid; Xylityl Sesquicaprylate; Glyceryl Stearate; Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax; Sodium Hydroxide; Tocopherol</i>	4,5%	4,5%	4,5%	4,5%
<i>Isopropyl Palmitate</i>	1,3%	1,3%	1,3%	1,3%
<i>Octyl stearate</i>	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%
<i>Ethylhexyl Methoxycinnamate</i>	-	6,0%	-	6,0%
Óleo Essencial	-	-	1,0%	1,0%
<i>Glycerin</i>	3,0%	3,0%	3,0%	3,0%
<i>Phenoxyethanol; Methylparaben; Ethylparaben; Propylparaben; Butylparaben</i>	0,6%	0,6%	0,6%	0,6%
<i>Disodium EDTA</i>	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%
<i>Aqua qsp</i>	100%	100%	100%	100%

O preparo de todas as formulações foi semelhante: adicionou-se os componentes da fase oleosa em um béquer (*Helianthus Annuus (Sunflower) Seed Oil; Polyacrylic Acid; Xylityl Sesquicaprylate; Glyceryl Stearate; Euphorbia Cerifera (Candelilla) Wax; Sodium Hydroxide; Tocopherol, Isopropyl Palmitate; Octyl stearate, Ethylhexyl Methoxycinnamate* e o óleo essencial); em outro béquer, foram adicionados todos os componentes da fase aquosa (*Glycerin, Phenoxyethanol; Methylparaben; Ethylparaben; Propylparaben; Butylparaben, Disodium EDTA e Aqua*). Então, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa e a mistura foi agitada até apresentar consistência uniforme.

4.5 Avaliação do fator de proteção solar (FPS) da formulação

As quatro formulações foram avaliadas em aparelho do tipo Optometrics[®] SPF-290s, seguindo as determinações do fabricante. Cerca de 110 mg de formulação foram aplicados sobre uma fita Transpore[®]. Em seguida, a fita contendo a formulação foi submetida à incidência da radiação UV (290-400 nm) e foi feita a leitura das absorbâncias e o FPS foi determinado pelo *software* SPF.

4.6 Análise do OE por cromatografia em camada delgada (CCD)

A fase estacionária utilizada foi sílica-gel (0,25 mm). Com relação à fase móvel, inicialmente foram feitos vários testes para ajustar sua composição com a finalidade de obter melhor resolução entre as bandas e valores de R_f entre 0,2 e 0,8. As fases móveis avaliadas foram: tolueno: acetato de etila (97:3; 94:6; 90:10); hexano: acetato de etila (90:10; 80:20) e hexano: diclorometano (70:30). Já para a análise dos padrões foi utilizado hexano como fase móvel. O OE foi solubilizado em hexano na concentração de 10 mg/mL e os padrões α -humuleno e (*E*)-cariofileno na concentração de 5 mg/mL. A revelação foi feita com anisaldeído sulfúrico.

4.7 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

Foi realizada uma análise preliminar do óleo essencial por CG-EM para avaliar se a resolução obtida entre os pares de picos do cromatograma utilizando o método descrito por Adams (2007) seria adequada. Condições cromatográficas: temperatura do injetor: 240° C, razão de *split* 1/20, gás de arraste hélio, gradiente de temperatura: 60 a 246° C (3° C/ min), coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d.i.; 0,25 μ m filme interno).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de atividade antioxidante

O valor de CI_{50} indica a porcentagem de óleo essencial que é necessária para inibir 50 % dos radicais livres em solução. Após o preparo das soluções e leitura a 517 nm, foram obtidos os gráficos de inibição do radical DPPH• para o OE (Figura 7) e para o ácido ascórbico (Figura 8). A porcentagem de captura do radical DPPH• foi calculada pela Equação 1:

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

Onde:

% Inibição = porcentagem de inibição do DPPH•

A_{max} = absorbância da solução de DPPH• na ausência da amostra

A_{amostra} = absorbância da solução de DPPH• na presença da amostra

Figura 7. Gráfico da porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH•, *versus* a concentração de óleo essencial (mg/mL).

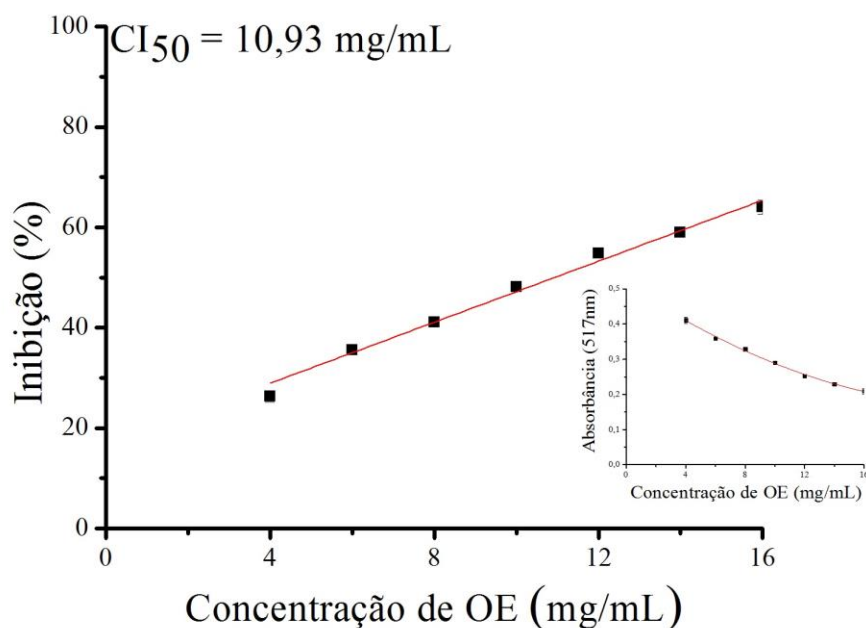
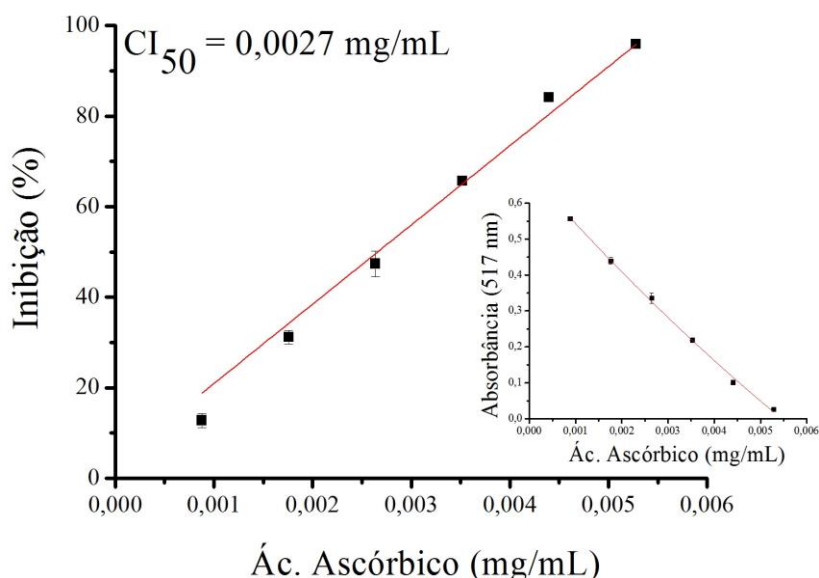


Figura 8. Gráfico da porcentagem de inibição (captura) do radical DPPH• versus a concentração de ácido ascórbico (mg/mL).



A partir dos resultados do ensaio para a determinação do potencial antioxidante do óleo essencial de *C. verbenacea* utilizando o radical DPPH• foi possível observar que o valor de CI₅₀ obtido pelo OE foi de 10,93 mg/mL, aproximadamente 4.000 vezes superior ao CI₅₀ do ácido ascórbico, que foi de 0,0027 mg/mL. Isto demonstra que os componentes do OE possuem uma baixa capacidade de inibição do radical DPPH•, indicando baixa atividade antioxidante por este mecanismo.

Morais *et al.* (2006) demonstrou em um estudo que o óleo essencial extraído de espécies de *Croton* encontradas no nordeste do Brasil apresentaram atividade antioxidante significativa. Além disso, um estudo realizado por Scherer *et al.* (2009) também descreveram a excelente atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial extraído de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) utilizando o método do DPPH., obtendo CI₅₀ próximo de 7,8 µg/mL.

Um estudo realizado pela aluna de pós-graduação do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Gabriela Brasil Romão, mostrou que extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso obtidos a partir de folhas de *C. verbenacea* possuem significativa atividade antioxidante, principalmente o extrato hidroetanólico e, para isso, foram utilizados diferentes métodos “*in vitro*”, como: DPPH•, ABTS⁺, ânion radicalar superóxido (O₂^{-•}), descoramento da crocina, espécie reativa HOCl/OCl⁻ e espécie reativa H₂O₂. Em todos os métodos avaliados, o extrato hidroetanólico 70% obteve atividade antioxidante com significativa, sendo, em alguns casos, semelhantes aos valores obtidos pelo ácido ascórbico, padrão utilizado no experimento. Pelo método do radical DPPH•, o CI₅₀ obtido pelos extratos etanólico, hidroetanólico 70% e aquoso foram, respectivamente, 35,83 µg/mL, 13,44 µg/mL e 47,73 µg/mL, indicando atividade antioxidante significativa (ROMÃO, 2016).

5.2 Avaliação do fator de proteção solar

Os valores de FPS das quatro formulações A a D estão representados na Tabela 2.

Tabela 2. Fator de proteção solar das formulações A, B, C e D.

FORMULAÇÕES	FPS ± DESVIO PADRÃO
A (base)	1,04 ± 0,02
B (base + filtro solar)	11,28 ± 1,21
C (base + óleo essencial)	1,135 ± 0,04
D (base + filtro solar + óleo essencial)	10,58 ± 1,26

Analisando os resultados obtidos na avaliação da atividade fotoprotetora das formulações (Tabela 2), o valor de FPS obtido para a formulação C, que consistia na base adicionada de OE, é semelhante ao FPS da formulação A (base). Isto indica que o OE de *C. verbenacea* não apresenta componentes responsáveis pela proteção solar. Os valores de FPS das formulações B (base contendo filtro solar) e D (base contendo filtro solar e OE) também foram semelhantes, indicando que o OE não foi capaz de atuar sinergicamente com o filtro solar e, dessa forma, aumentar sua potência.

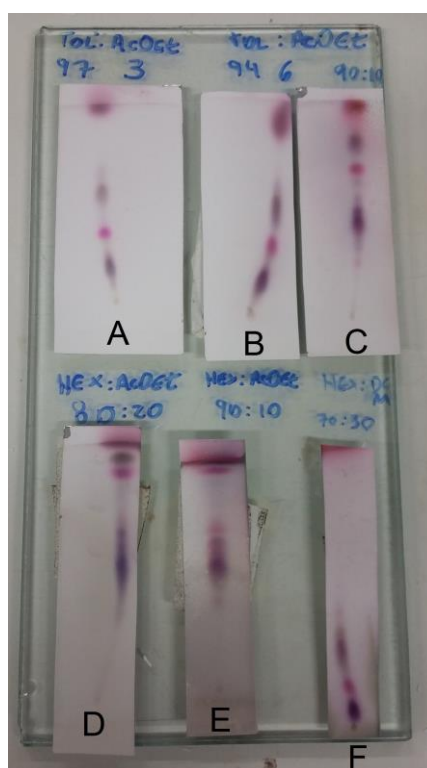
5.3 Análise qualitativa por cromatografia em camada delgada

Para a realização da análise qualitativa por CCD, primeiramente foi necessário encontrar a condição mais adequada. Foram utilizadas diversas fases móveis, como mostra a Figura 9, na qual podemos observar os perfis cromatográficos do OE em diferentes condições.

Figura 9. Cromatoplasmas do óleo essencial de *Cordia verbenacea* utilizando diferentes fases móveis. Condições cromatográficas:

Fase estacionária: sílica-gel

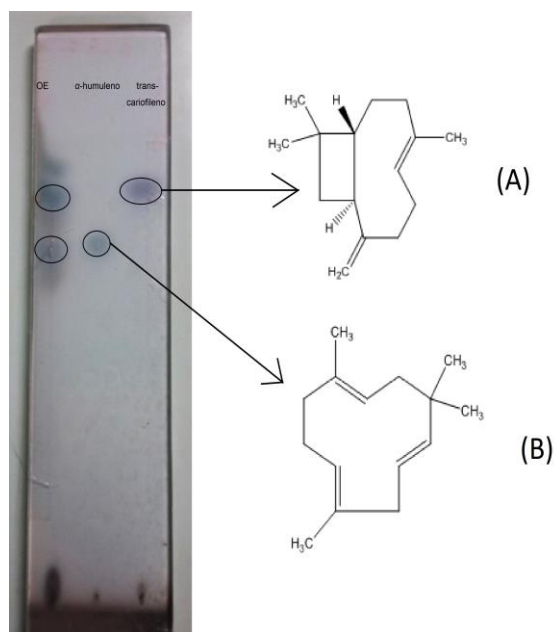
Fase móvel: A: tolueno: acetato de etila (97:3); B: tolueno: acetato de etila (94:6); C: tolueno: acetato de etila (90:10); D: hexano: acetato de etila (80:20); E: hexano: acetato de etila (90:10); F: hexano: diclorometano (70:30).



A condição de fase móvel que proporcionou melhor resolução entre as manchas foi tolueno: acetato de etila 90:10, observando-se 8 bandas. Nesta condição os padrões utilizados apresentaram valor de R_f próximo a 1,0. Utilizando hexano como fase móvel, foi possível reduzir a eluição das substâncias e foi obtida a melhor resolução para o α -humuleno e (*E*)-cariofileno (Figura 9), sendo seus valores de R_f e das bandas correspondentes no OE de 0,64 e 0,74, respectivamente. Porém, nesta última condição não foi possível visualizar as outras bandas.

Figura 10. Cromatoplaça (sílica gel) do OE utilizando hexano como fase móvel.

Padrões: A: (*E*)-cariofileno e B: α -humuleno.



A análise do OE por cromatografia em camada delgada mostrou resultados satisfatórios quando determinou-se as condições de fase móvel adequadas: a) tolueno: acetato de etila 90:10 para avaliação de um perfil cromatográfico mais amplo; b) hexano para identificação de α -humuleno e (*E*)-cariofileno, marcadores ativos, responsáveis pela atividade anti-inflamatória que o OE apresenta (FERNANDES *et al.*, 2007).

5.4 Cromatografia Gasosa

As Figuras 11 e 12 mostram o cromatograma obtido a partir da análise do OE por CG-EM e sua expansão, respectivamente. Já a Tabela 3 corresponde à proposta de identificação dos componentes do OE.

Figura 11. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de *C. verbenacea*. Condições de análise: 60 a 246° C - 3° C/ min; temperatura do injetor: 240° C; *split*: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).

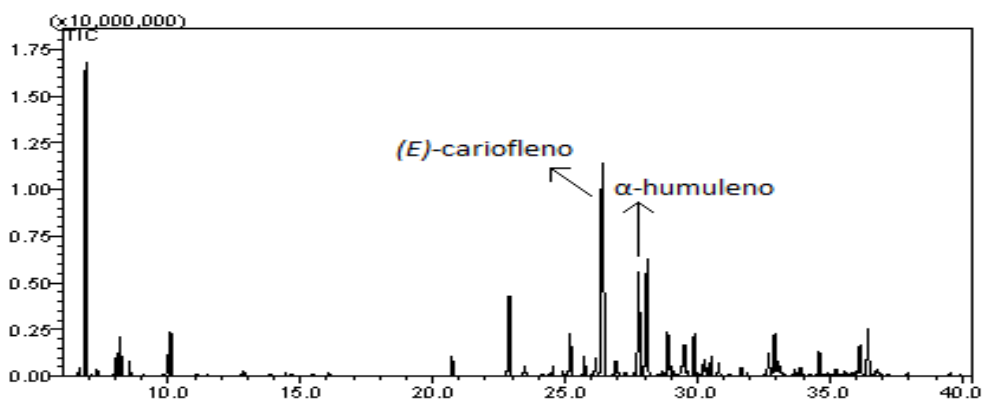


Figura 12. Expansão do cromatograma obtido por CG-EM do óleo essencial de *C. verbenacea*. Condições de análise: gás de arraste hélio; 60 a 246° C (3° C/min); temperatura do injetor: 240° C; *split*: 1/20; coluna Rtx-5MS (30m x 0,25 mm d.i.; 0,25 µm filme interno).

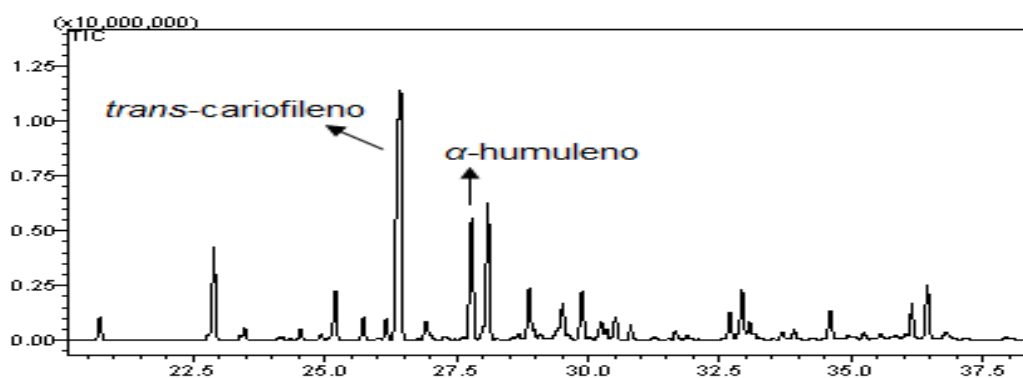


Tabela 3. Proposta de identificação de componentes do OE a partir de análises por CG-EM

Pico	CG		Proposta de identificação
	tR (min)	Área (%)	
1	6,91	14,64	α -pineno
2	8,07	0,66	sabineno
3	8,21	1,20	β -pineno
4	10,00	0,97	Biciclo[3.1.1]hept-2-eno
5	10,11	1,47	cineol
6	22,91	3,27	Biciclo[4.1.0]hept-2-eno
7	25,22	1,93	ciclohexano
8	26,46	15,09	(<i>E</i>)-cariofileno
9	27,81	4,74	α -humuleno
10	28,12	5,75	aloaromadendreno
11	28,90	1,93	1,6-ciclododecadieno
12	29,54	1,40	longifoleno
13	29,91	1,81	<i>cis</i> - α -bisaboleno
14	32,71	0,96	espatulenol
15	32,94	2,00	ácido 10-12-Pentacosadiinoico
16	34,62	0,96	β -voltirenenol
17	36,17	1,39	<i>trans</i> -bergamotol
18	36,47	1,99	α -santalol

Os três picos majoritários observados correspondem ao α -pineno, α -humuleno e (*E*)-cariofileno, sendo os dois últimos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do OE e identificados com o uso de padrões. O número de substâncias observadas foi maior do que o obtido no perfil por CCD, já que a técnica de CG-EM tem maior sensibilidade e poder de resolução.

O método empregado demonstrou resolução adequada entre os picos observados no cromatograma para a identificação (índice de retenção e similaridade de espectros de massas) e quantificação (normalização das áreas) dos componentes.

6. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *C. verbenacea* apresentou baixa atividade antioxidante no ensaio utilizando o radical DPPH•. Além disso, não foi encontrada ação fotoprotetora significativa do OE incorporado em formulação cosmética a 1 % (m/m) e não foi capaz de atuar sinergicamente com o filtro solar comercial a 6,0 %, para potencializar seu efeito.

As condições de CCD avaliadas permitiram obter um perfil químico do OE e, também, identificar os marcadores α -humuleno e *trans*-cariofileno. A análise por CG-EM, além de fornecer um perfil químico do OE, possibilitou identificar estes mesmos sesquiterpenos, sendo ambos componentes majoritários do OE e responsáveis por sua atividade anti-inflamatória.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Indication of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Illinois: Allured Publishing Corporation, 4th edition, 2007.

ALMEIDA, L.F.R.; DELACHIAVE, M.E.A.; MARQUES, M.O.M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. - Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.1, p.35-8,2005.

ARAUJO, J.S. **Desenvolvimento vegetal, produção e composição química do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) em função do fornecimento de N, P, K e B e da aplicação de ácido jasmônico**. Campinas, 2007. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000417283>>. Acesso em: 23 ago 2016.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

CARVALHO, H.O.; LACERDA, G.S.L.; BEZERRA, R.M.; SANCHES, A.A.; SILVA, S.G.G.; BARROS, C.S.; FAVACHO, H.A.S.; MEDEIROS, B.J.L.; DUARTE, J.L.; CARVALHO, J.C.T. **Quantificação de trans-Cariofileno em óleos-resinas de *Copaifera officinalis* e *C. duckei* por CG-FID**. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/7/3265-16884.html>>. Acesso em: 19 dez 2016.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: UNICAMP, 2006.

COSTA, A. Eficácia in-vitro e clínica do uso cosmético tópico de fitoestrógenos em pele fotoenvelhecida. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 2, 2012.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. **Flavonoides**: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Na Escola**, n.7, p.21-25, 1998.

DIEAMANT, G.; COSTA, A.; BECHELLI, L.; TIBÉRIO, J.; PEREIRA, C. Avaliação *in vitro* do perfil de segurança de cosmeceúticos contendo fatores de crescimento e seus análogos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 4, n. 3, p. 229-236, 2012.

FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, p. 228–236, 2007.

FERREIRA, E.B. Avaliação da composição química e atividades biológicas de sete espécies de plantas cultivadas no nordeste do Brasil. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará - Centro de Ciências**. Fortaleza, 2012.

GILBERT, B.; FAVORETO, R. Monografia: *Cordia verbenacea* DC – Boraginaceae. **Revista Fitos**, v. 7, n. 01, 2012.

MORAIS, S.M.; CATUNDA-JR, F.E.A.; SILVA, A.R.A.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 907-910, 2006.

PASSOS, G.F.; FERNANDES, E.S.; CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2007.

RAMOS, C.; BARROS, D.; GREGÓRIO, G.; TINÊO, M.; BLUMM, V.F. *Cordia verbenacea*: planta contra inflamação. **Jornal Phytomédica**, n. 1, p. 1-3, 2005.

RODRIGUES, F.F.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; RODRIGUES, F.F.G.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.X.; CABRAL, M.E.S.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p.161-165, 2012.

ROMÃO, G.B. Estudo *in vitro* de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica. **Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Farmacêutica**. Araraquara, 2016.

SB CD (Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica). **Envelhecimento cutâneo**. Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.sbcd.org.br/pagina/1717>>. Acesso em: 23 ago 2016.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. 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.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n.4, 2009.

SHARMA, O. P.; BHAT, K. B. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v. 30, n 2, p.351-355, 2007.

WASICKY, R. Uma modificação do aparelho de Clevenger para extração de óleos essenciais. **Revista da Faculdade Farmácia e Bioquímica**, v. 1, n.1, p. 77-81, 1963.

Araraquara, 20 de dezembro de 2016.

Jéssica Pereira de Azevedo

De acordo:

Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia