

**Universidade Estadual Paulista - UNESP
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

***Cordia verbenacea* DC.: estudo químico-biológico relacionado ao
seu uso tradicional**

Isabela Jacob Moro

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara – SP
2022

**Universidade Estadual Paulista - UNESP
Campus de Araraquara
Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

***Cordia verbenacea* DC.: estudo químico-biológico relacionado ao
seu uso tradicional**

Isabela Jacob Moro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em **CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**, área de
concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de
Fármacos e Medicamentos, para a obtenção do
título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara – SP
2022

M867c Moro, Isabela Jacob.
Cordia verbenacea DC: estudo químico-biológico relacionado ao seu uso tradicional / Isabela Jacob Moro. – Araraquara: [S.n.], 2022.
129 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.

1. Antioxidante. 2. Anti-inflamatório. 3. *Varronia curassavica*. 4. *Cordia verbenacea*. 5. Flavonas. 6. Triterpenos. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Cordia verbenacea DC.: estudo químico-biológico relacionado ao seu uso tradicional

AUTORA: ISABELA JACOB MORO

ORIENTADOR: ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDRÉ GONZAGA DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP - Araraquara

Profa. Dra. SILVANA MARIA ZUCOLOTTI LANGASSNER (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. DANIEL RINALDO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Ciências - UNESP - Bauru

Prof. Dr. CRISTIANO SOLEO DE FUNARI (Participação Virtual)
Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. LUIS VITOR SILVA DO SACRAMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 29 de março de 2022

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de todos.

À minha família, a base de tudo.

À UNESP (Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara), minha casa desde a graduação.

Ao meu orientador, que desempenha suas funções com dedicação e ânimo, pela oportunidade, ensinamentos e compreensão.

Aos meus amigos de Laboratório (André, Bianca, Caio, Stéfany, Bárbara, Winner, Flávio, Fernando, Giovana, Janaína), por tornarem as coisas mais leves e agradáveis.

Aos professores (Prof. Dra. Ana Marisa Fusco de Almeida, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti) e alunos dos Laboratórios de Proteômica (Junya e Nathália) e Bioquímica Clínica (Renata) pela parceria e treinamento.

Ao grupo GreenBiotech Network, que detém o nobre desejo produzir dados científicos e, simultaneamente, transformar a química envolvida em algo menos agressivo ao meio ambiente e às pessoas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que apoiou este trabalho.

RESUMO

Cordia verbenacea DC. é uma espécie nativa do Brasil, popularmente utilizada na forma de "garrafadas" para o tratamento contra infecções, úlceras, dores e reumatismos. A erva baleeira consta no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e integra a Relação de Plantas Medicinais de Interesse do SUS. Estudos preliminares de nosso grupo de pesquisa levaram ao isolamento e identificação de substâncias da espécie e a verificação da atividade antioxidante de extratos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo averiguar a atividade antioxidante dos metabólitos secundários, e, também, a atividade anti-inflamatória de extratos. Além disso, buscou o desenvolvimento de métodos analíticos que atendessem aos Princípios da Química verde. Apesar do disseminado uso da planta, há pouca informação a respeito de sua toxicidade. Sendo assim, o trabalho também buscou avaliar a embriotoxicidade através do estudo com modelo animal alternativo (zebrafish), abarcando, mais uma vez, os princípios da Química Verde. Do ponto de vista do potencial antioxidante, é sabido que o processo de produção de radicais livres é fisiológico tendo importantes funções metabólicas. No entanto, o estresse oxidativo ocasionado quando a produção das espécies reativas de oxigênio exacerba a capacidade antioxidante do organismo, pode comprometer as biomoléculas e influenciar negativamente a homeostase dos sistemas. Por sua vez, a inflamação é uma resposta fisiológica normal do organismo frente a infecções ou lesões teciduais. Porém, o processo inflamatório pode se relacionar com o estresse oxidativo quando da ativação intensa de células do sistema imune, tal como os neutrófilos. Neste estudo, o extrato etanólico ofereceu uma resposta menos antioxidante na grande maioria dos ensaios realizados, tendo superado a atividade do extrato hidroetanólico apenas no ensaio com ácido hipocloroso. Com relação às flavonas, apenas a substância 1 atingiu valores de CE_{50} nos ensaios antioxidantes, porém, a mistura das substâncias 1 e 2 (PPt) obteve atividade superior nas avaliações antioxidantes. Os triterpenos não apresentaram atividade antioxidante nas concentrações avaliadas. Na avaliação anti-inflamatória, a cordialina A ofereceu melhor resposta que a flavona (substância 2), principalmente em COX1, e não atingiu os valores de C_{150} em sPLA2. Contudo, os valores de inibição da atividade. Do ponto de vista da Química Verde, foi desenvolvido um método por UPLC-UV e um método OLE (*online extraction*)-UPLC-UV, para análise direta da droga vegetal. Esses métodos desenvolvidos por UPLC-UV e OLE-UPLC-UV foram avaliados através da métrica *Agree* como mais verdes do que o método HPLC-UV para análise do extrato hidroetanólico, O método UPLC-UV foi validado e foi determinado o teor de ácido rosmarínico no extrato hidroetanólico, sendo equivalente a 6,1% (m/m). O métodos desenvolvidos tinham como destaque o uso de etanol, a redução do tempo de análise e a ausência de preparo de amostra com o uso do OLE. A escassez de dados sobre a toxicidade estimulou a pesquisa por parte deste trabalho e foi observado que ambos extratos levaram a morte e malformações de embriões, sugerindo um cuidado no manejo de estantes e crianças, apesar do ensaio não descarta a necessidade de avaliação de outras concentrações e em outros modelos de estudo.

Palavras-chave: antioxidante, anti-inflamatório, *Varronia curassavica*, *Cordia verbenacea*, flavonas, triterpenos.

ABSTRACT

Free radical production is a physiological process that has metabolic functions. However, oxidative stress, caused when the production of reactive oxygen species exacerbates the body's antioxidant capacity, can compromise biomolecules and influence systemic homeostasis negatively. In turn, inflammation is a normal physiological response of the body to infections or tissue damage. However, the inflammatory process can be related to oxidative stress when the intense activation of immune system cells occurs, such as neutrophils. This research involves the study of *Varronia curassavica* Jacq., a native species of Brazil known as erva-baleeira. The objectives of the study are to evaluate the activities of its secondary metabolites regarding the anti-inflammatory and antioxidant issue, its toxicity, as well as to proceed with the identification of secondary metabolites, including the use of Green Chemistry principles like developing analysis employing the UHPLC-UV and OLE-UHPLC-UV (online extraction-liquid chromatography) system for direct analysis of the plant material. From a fraction of the ethanol extract of *V. curassavica* (fraction 3.2), chromatographic procedures were carried out which resulted in the isolation of 4 purified substances. The ethanol extract obtained lower antioxidant potential in the majority of performed tests. In addition to its greater antioxidant potential, the hydroethanolic extract has lower embryotoxicity in trials with zebrafish. In the evaluation of the anti-inflammatory activity, cordialin A had a better result than substance 1 in the inhibition of COX1, COX2 and sPLA2 activity. The developed UHPLC-UV and OLE-UHPLC-UV methods were considered greener than the described HPLC-UV method for the hydroethanolic extract, through the use of Agree tool, highlighting the use of ethanol, the lowest analysis time and the absence of sample pretreatment in the case of the OLE system.

Key-words: antioxidant, anti-inflammatory, *Varronia curassavica*, *Cordia verenaceae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Correlação entre metabolismo primário e metabolismo secundário. Os intermediários representantes das principais vias dos metabólitos secundários estão em círculos tracejados.	18
Figura 2 Espécimes de <i>Cordia verbenacea</i> DC. (campo experimental do CPQBA-Unicamp, Paulínia-SP). Fonte: Autor.	20
Figura 3 Em detalhe, ramo florido de <i>Cordia verbenacea</i> DC. (Fonte: PEREIRA 2017).	20
Figura 4 Estruturas químicas dos principais representantes de cada classe de metabólitos secundários presentes da <i>C. verbenacea</i>	22
Figura 5 Reação de redução do DPPH [•] na presença de um antioxidante.	26
Figura 6 Formação do radical hidroperoxila por protonação (1), e formação de peróxido de hidrogênio e de oxigênio por reação de enzima superóxido dismutase (SOD) a partir do ânion radicalar superóxido (2).	27
Figura 7 Reação de formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio e do ânion radicalar superóxido (1) e formação do radical hidroxila a partir da reação do peróxido de hidrogênio com meta de transição, Fe ²⁺ (2).	27
Figura 8 Formação de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio pela oxidação de íons cloro na presença de mieloperoxidase (MPO).	28
Figura 9 Fenótipos de malformação em zebrafish. (A) Embrião coagulado. (B) Embrião com 48hpf com edema de saco vitelínico (*) e formação distinta de somitos. (C) Embrião com 96hpf sem a presença de somitos (→), com escoliose e edema de pericárdio (*). (D) Ausência do botão do olho (*) e não descolamento da cauda (→) no embrião com 96hpf. Fonte: OCDE, 2013.	31
Figura 10 Membrana de nylon na parte inferior do holder e coluna de guarda vazia; B) coluna de guarda sobre o holder, preenchida com material vegetal e sílica C18 e membrana de nylon na parte superior; C) fechamento do holder. Fonte: arquivo pessoal.	38
Figura 11 A) injetor sem acoplamento do holder; B) holder em substituição ao loop acoplado ao injetor. Fonte: arquivo pessoal.	39
Figura 12 Cromatogramas em HPLC-UV (gradiente exploratório) da fração 3.2 e EEt. Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ _{máx} = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL (Fonte: PEREIRA 2017).	48
Figura 13 Cromatoplaça de 3.2CC. Fase estacionária: sílica gel. Fase móvel: Hex/AcOEt/EtOH 5:4,5:0,5 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.	49
Figura 14 Cromatoplaça de 3.2CC com as frações já agrupadas. Fase estacionária: sílica gel. Fase móvel: Hex/AcOEt/EtOH 5:4,5:0,5 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.	49
Figura 15 Cromatogramas em HPLC-DAD/UV-Vis das frações 1, 3 e 8, respectivamente, obtidas por 3.2CC. Modo isocrático: MeOH/H ₂ O 80:20, 20 min; coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL, cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] PDA.	51

Figura 16 Cromatogramas em HPLC- DAD/UV-Vis das frações 2 e 8, respectivamente, obtidas por 3.2CC. Modo isocrático: MeOH/H ₂ O 80:20, 20 min; coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL, cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] PDA.....	52
Figura 17 Cromatogramas em HPLC-UV das frações 2 (A) e 8 (B), obtidas por 3.2EFS2. Modo isocrático: MeOH/H ₂ O 85:15 (A) e 85:15 (B); coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 0,4 mL/min, volume de injeção de 20µL, cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] UV/Vis.	52
Figura 18 Cromatogramas em HPLC-UV de 8p1 (A), 8p2 (B) e 8p3 (C), obtidos por cromatografia preparativa a partir da fração 8. Modo isocrático: MeOH/H ₂ O 80:20 (A); coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20µL, cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] UV/Vis.	53
Figura 19 Cromatograma em HPLC-UV do precipitado em Hex/AcOEt 6:4 da fração 3.2 Condições de análise: 0-10': 6 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace [®] C18 (250x4.6mm; 5µm); Injeção de 20 µL; λ-254 nm; vazão de 1,0 mL/min. Preparo de amostra em: ACN (0,1% dietilamina), cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] UV/Vis.....	54
Figura 20 Cromatograma em HPLC-UV da porção insolúvel da fração 3.2. Modo isocrático: ACN/H ₂ O 71:29; coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 0,4 mL/min, volume de injeção de 20 uL. Cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] UV/Vis.	55
Figura 21 Cromatograma em HPLC-UV da porção insolúvel da fração 3.2. Modo isocrático: ACN/H ₂ O 71:29; coluna semi-preparativa Agilent Eclipse XDB C18 (250x 21,20 mm; 7 µm), λ= 254 nm, vazão de 8 mL/min, volume de injeção de 1 mL. Cromatógrafo Perkin Elmer [®] Flexar [®] UV/Vis.	56
Figura 22 Estrutura química do triterpeno cordialina A (substancia 3).	58
Figura 23 Estrutura química do triterpeno (Z)-cordialina A (substancia 4).	60
Figura 24 Estruturas químicas de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) e 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona (B), substancia 1.	62
Figura 25 Estrutura química da artemetina (5-hidróxi-3,3',4',6,7-pentametoxiflavona), substancia 2.	64
Figura 26 Curva analítica obtida com a glicose para a determinação de açúcares redutores, utilizando DNS.	64
Figura 27 Curva analítica do ácido gálico para determinação dos fenólicos totais dos extratos de C.verbenacea.	66
Figura 28 Cromatogramas em HPLC-UV. Método OLE-HPLC (A; material vegetal seco e moído) e método convencional de análise de amostra (B; EEt). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 15 min; coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL (10 mg/mL) (B); 1 mg de planta seca e moída (A).	67
Figura 29 Cromatogramas em HPLC- DAD/UV-Vis (gradiente exploratório) de EEt (a) e EEtOH (b). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ _{máx} = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 uL (Fonte: ROMÃO 2016).	68
Figura 30 Cromatogramas em HPLC UV. Sobreposição das análises por OLE-HPLC (planta seca e moída; linha vermelha) e método convencional (EEt; linha preta). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por	

15 min; coluna Ace [®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL (10 mg/mL) (B); 1 mg de planta seca e moída (A).....	68
Figura 31 Método desenvolvido por Faibicher (2020): coluna C18, fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 35-42% B (0-20 min); 42-60% B (20-30 min); 60-70 % B (30-40 min); 70-100% B (40-70 min). Fonte: Faibicher, 2021.	69
Figura 32 Método 1(A) e Método 2(B) em UPLC-UV. <i>Método 1:</i> 25-32% B (0-3 min), 32-60% B (3-5,5 min), 60-90% B (5,5-10 min), 90-100% (10-12 min), 100% B (12-15 min). <i>Método 2:</i> 35-40% B (0-3 min), 40-45% B (3-6min), 45-50% B (6-9 min), 50-55% (9-12 min), 55-60% (12-15 min), 100% B (15-22min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V _{inj} =10µL, 35°C.	70
Figura 33 Método 3 (A) e Método 4 (B) em UPLC-UV. <i>Método 3:</i> 14-31% B (0-8 min), 31-80% B (8-20 min), 80-100% B (20-21 min), 100% (21-25 min). <i>Método 4:</i> 14-27% B (0-8 min), 27-80% B (8-22 min), 80-100% B (22-23 min), 100% (23-25 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V _{inj} =10µL, 35°C, UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis.	71
Figura 34 Método 5 (A), Método 6 (B), Método 7 (C) e Método 8 (D) em UPLC-UV. <i>Método 5:</i> 14-23% B (0-8 min), 22-80% B (8-23 min), 80-100% B (23-24 min), 100% (24-26 min). <i>Método 6:</i> 14-20% B (0-8 min), 20-80% B (8-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min). <i>Método 7:</i> 14-20% B (0-8 min), 20-80% B (8-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min). <i>Método 8:</i> 14-17% B (0-8 min), 17-80% B (8-23 min), 80-100% B (23-24 min), 100% (24-27 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V _{inj} =10µL, 35°C. UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis..	72
Figura 35 Método 9: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V _{inj} =10µL, 35°C. UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis.	73
Figura 36 Método 10: 17-32% B (0-12 min), 32% B (12-18 min), 32-80% B (18-28 min), 80-100% B (28-29 min), 100% (29-32 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V _{inj} =10µL, 35°C. UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis.	74
Figura 37 Método 11 (A) e método 12 (B). <i>Método 11:</i> 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, V _{inj} =10µL, 45°C. <i>Método 12:</i> 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, V _{inj} =5µL, 45°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis.	75
Figura 38 Método 13 (A) e Método 14(B). <i>Método 13:</i> 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,400 mL/min, V _{inj} =10µL, 50°C. <i>Método 14:</i> 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,400 mL/min, V _{inj} =5µL, 50°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity [®] Waters UV/Vis.	76
Figura 39 Scores obtidos através da métrica Agree. (A): método convencional em HPLC. (B) Método convencional em UPLC. (C) Método OLE-UPLC.....	79
Figura 40 Curva analítica do ácido rosmarínico.	80
Figura 41 Análise gráfica dos resíduos dos padrões de ácido rosmarínico.....	82
Figura 42 Espectro de absorção no UV no início (A), meio (B) e fim (C) do pico cromatográfico referente ao EEtOH (1) e do ácido rosmarínico (2).	84
Figura 43 Cromatogramas de EEtOH (A) e do ácido rosmarínico resultantes da análise para a obtenção do espectro no UV. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80%	

B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, $V_{inj}=5\mu\text{L}$, 45°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. UPLC Shimadzu® PDA Nexera.	84
Figura 44 OLE-UPLC-UV. Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.	86
Figura 45 Injeção de EEtOH (0,5 mg/mL) no método desenvolvido para o sistema OLE. $V_{inj}=5\mu\text{L}$. Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.	87
Figura 46 Método OLE-UPLC-UV. A: primeira extração. B: Padrão de cordialina A ($V_{inj}=5\mu\text{L}$) após extração exaustiva por OLE. Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.	88
Figura 47 Método OLE-UPLC-UV. Sobreposição das análises do EEtOH (azul), material vegetal seco e moído (vermelho) e padrão cordialina A (preto). Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters	89
Figura 48 Curva de sobrevivência de embriões de zebrafish em 0, 24, 48 e 72hpf sujeitos à exposição ao EEt. Média em 2 ensaios independentes. hpf=horas pós fecundação. n=20 embriões. Hpf: horas pós fecundação.	90
Figura 49 Curva de sobrevivência de embriões de zebrafish em 0, 24, 48 e 72hpf sujeitos à exposição ao EEtOH. Média em 2 ensaios independentes. hpf=horas pós fecundação. n=20 embriões. Hpf: horas pós fecundação.	91
Figura 50 Controles de meio embrionário e de veículo (etanol) de ensaio de toxicidade em zebrafish em 24hpf, 48hpf e 72hpf. Os somitos são apontados pelas setas. Hpf: horas pós fecundação.	92
Figura 51 Embrião de zebrafish tratado com EEt (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentando malformação em 24hpf (A) e coagulação em 48hpf (B).	92
Figura 52 Embrião de zebrafish tratado com EEt (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentando malformação em 48hpf. Hpf: horas pós fecundação.	93
Figura 53 Embrião de zebrafish após 24hpf tratado com EEtOH (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentando edema pericardial (*) e atraso no desenvolvimento em A e malformação de saco vitelino em B. Hpf: horas pós fecundação.	93
Figura 54 Embrião de zebrafish após 72hpf tratado com EEtOH (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentando edema pericardial (*), malformação de cauda e acentuada curvatura espinhal. Hpf: horas pós fecundação.	94
Figura 55 Embrião de zebrafish após 48hpf tratado com EEtOH (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentando edema pericardial (*), edema de saco vitelino (**), ausência de somitos e de pigmentação. Hpf: horas pós fecundação.	94
Figura 56 Embrião de zebrafish após 24hpf tratado com EEtOH (200 $\mu\text{g/mL}$) apresentando variadas malformações (A a C) e morte (D e E). Hpf: horas pós fecundação.	95
Figura 57 Embrião de zebrafish 48hpf tratado com EEtOH (200 $\mu\text{g/mL}$) apresentando variadas malformações e morte. Hpf: horas pós fecundação.	95
Figura 58 Captura do radical DPPH• pela quercetina ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=517\text{ nm}$. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	96

Figura 59 Captura do radical DPPH• pelo EEt (µg/mL) em etanol. λ=517 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	97
Figura 60 Captura do radical DPPH• pelo EEtOH (µg/mL) em etanol. λ=517 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	97
Figura 61 Captura do radical DPPH• pelo PPt (µg/mL) em etanol. λ=517 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	98
Figura 62 Captura do radical DPPH• pela substancia 1 (µg/mL) em etanol. λ=517 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.....	99
Figura 63 Inibição (captura) do O ₂ • ⁻ pela quercetina (µg/mL) em etanol. λ=560 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	100
Figura 64 Inibição (captura) do O ₂ • ⁻ pelo EEtOH (µg/mL) em etanol. λ=560nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	101
Figura 65 Inibição (captura) do O ₂ • ⁻ pelo PPt (µg/mL) em etanol. λ=560 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	102
Figura 66 Inibição (captura) do O ₂ • ⁻ pela substância 1 (µg/mL) em etanol. λ=560 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.....	102
Figura 67 Inibição (captura) de HOCl/OCl ⁻ pela quercetina (µg/mL) em etanol. λ=655 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.....	103
Figura 68 Inibição (captura) de HOCl/OCl ⁻ pelo PPt (µg/mL) em etanol. λ=655 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	103
Figura 69 Inibição (captura) de HOCl/OCl ⁻ pela substância 1 (µg/mL) em etanol. λ=655nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.....	104
Figura 70 Inibição (captura) de HOCl/OCl ⁻ pelo EEt (µg/mL) em etanol. λ=655 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.	104
Figura 71 Inibição (captura) de HOCl/OCl ⁻ pelo EEtOH (µg/mL) em etanol. λ=655 nm. CE ₅₀ : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Relação de fases móveis para análise de frações obtidas em 3.2CCteste.	36
Tabela 2 Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento de método em UPLC-UV	40
Tabela 3 Massa(mg) das frações coletadas em 3.2CC	49
Tabela 4 Dados espectrométricos de RMN obtidos para a cordialina A (substancia 3) em 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 .	56
Tabela 5 Dados espectrométricos de RMN obtidos para a (Z)-cordialina A (substancia 4) em 300 MHz para ^1H , em CDCl_3 .	59
Tabela 6 Dados espectrométricos de RMN obtidos para 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona (sustância 1) em 300 MHz para ^1H e em 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 .	61
Tabela 7 Dados espectrométricos de RMN obtidos para artemetina (substancia 2) em 300 MHz para ^1H e para ^{13}C , em CDCl_3 .	63
Tabela 8 Leituras, em triplicata, das absorbâncias a 540 nm dos extratos de <i>C. verbenacea</i> no ensaio de determinação de açúcares redutores.	65
Tabela 9 Dados de precisão e exatidão do ácido rosmarínico para o método analítico.	82
Tabela 10 Valores de CE_{50} para as diferentes amostras em diferentes ensaios de atividade antioxidante (DPPH, $\text{O}_2^{\bullet-}$ e HOCl/OCl^-), e do controle positivo (quercetina). Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$.	105
Tabela 11 Porcentagem de inibição das amostras e controles positivos sobre as enzimas COX e sobre sPLA ₂ , e respectivos CI_{50} .	106

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt: acetato de etila
MeOH: metanol
AINE: anti-inflamatório não-esteroidal
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C18: sílica octadecilsilano
CC: cromatografia em coluna
CCD: cromatografia em camada delgada
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
UPLC: cromatografia líquida de ultra eficiência
DAD: detector de arranjo de diodos
UV: detector ultravioleta/visível
HPLCprep: (cromatografia líquida de alta eficiência preparativa)
COX: ciclo-oxigenase
COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2
CQA: Controle de qualidade alto
d: duplete
dd: duplo duplete
DMSO: dimetilsulfóxido
EEt: extrato etanólico
EEtOH: extrato hidroetanólico 70%
ERO: espécie reativa de oxigênio
ERN: espécie reativa de nitrogênio
HPF: horas pós fecundação
OLE-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a sistema de extração sob alta pressão (*online extraction*).
PLA2: fosfolipase A2
PGE2: prostaglandina E2
RMN: ressonância magnética nuclear
PDA: ou DAD, detector de arranjo de diodos.
s: simpleto

SUMÁRIO

1 Introdução	16
1.1 Espécies vegetais e importância de seus usos no restabelecimento da saúde ..	17
1.2 Metabolismo secundário.....	17
1.3 <i>Cordia verbenacea</i> DC.....	19
1.4 Atividade antioxidante e produtos naturais.....	25
1.4.1 Ensaio <i>in vitro</i> com espécie radicalar e espécies reativas de oxigênio (ERO)	26
1.4.1.1 Radical DPPH	26
1.4.1.2 Ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	26
1.4.1.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO^{\cdot}$)	27
1.4.1.4 Ácido hipocloroso (HOCl)	27
1.5 Atividade anti-inflamatória e produtos naturais.....	28
1.6 Ensaio com animais alternativos: embriões de zebrafish	29
1.7 Abordagens em Química Verde: <i>online extraction coupled to liquid chromatography analysis</i> (OLE-HPLC, OLE-UPLC) e uso de solventes verdes	31
2 Objetivos.....	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 Materiais e métodos.....	33
3.1 Obtenção e preparo do material vegetal	33
3.2 Análises cromatográficas	34
3.3 Fracionamento de EEt.....	34
3.3.1 Fracionamento de 3.2 em menor escala (3.2CCteste) e análise por CCD ...	35
3.3.2 Fracionamento de 3.2 em maior escala (3.2CC) e análise por HPLC-UV	36
3.4 HPLC semi-preparativo das frações de 3.2CC.....	37
3.5 Precipitação na fração 3.2EFS e HPLC semi-preparativo.....	37
3.6 OLE-HPLC	38
3.7 Desenvolvimento de método em UPLC-UV (método convencional e OLE)	39
3.7.1 Validação do método em UPLC-UV	42
4 Determinação estrutural dos metabólitos secundários	43
4.1 Ressonância Magnética Nuclear	43
5 Determinação de açúcares redutores com DNS.....	43
6 Determinação de compostos fenólicos totais.....	44
7 Ensaio de embriotoxicidade em zebrafish	44
8 Atividade antioxidante.....	44

8.1 Ensaio com DPPH.....	44
8.2 Ânion radicalar superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	45
8.3 HOCl/OCI ⁻	46
9 Atividade anti-inflamatória.....	46
9.1 Inibição da atividade de cicloxigenase 1 e cicloxigenase 2 através de ensaio <i>in vitro</i>	46
9.2 Inibição da atividade da fosfolipase A2 do grupo V recombinante humana (sPLA ₂) através de ensaio <i>in vitro</i>	47
10 Resultados e discussão	47
10.1 Seleção da fração de EEt utilizada para a obtenção das substâncias purificadas.....	47
10.1.1 Cromatografia em coluna	48
10.1.2 HPLC semi-preparativa	52
10.1.3 Isolamento de substância por precipitação	54
10.1.3.1 HPLC semi-preparativo com o precipitado	55
10.4 Determinação estrutural	56
10.4.1 Substâncias 3 e 4.....	56
10.4.2 Substancia 1 e substancia 2	60
10.5 Determinação do teor de açúcares redutores em EEtOH e EEt.....	64
10.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	65
10.7 OLE-HPLC	66
10.8 Desenvolvimento de método em UPLC-UV	69
10.8.1 Comparação dos métodos cromatográficos verdes desenvolvidos com o método convencional de análise de folhas de erva-baleeira, utilizando a métrica Agree (<i>Analytical Greeness Metric</i>).....	76
10.8.2 Validação do método em UPLC-UV.....	79
10.8.2.1 Linearidade.....	79
10.8.2.2 Exatidão e Precisão.....	82
10.8.2.3 Sensibilidade	83
10.8.2.4 Seletividade	83
10.8.2.5 Quantificação do ácido rosmarínico	84
10.9 Desenvolvimento de método em OLE-UPLC-UV	85
11 Embriotoxicidade em zebrafish	90
12 Ensaio antioxidantes	96
12.1 Ensaio com o DPPH•	96
12.2 Ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	99

12.3 HOCl/OCl ⁻	103
13 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti-inflamatória	106
14 Conclusões	107
Referências.....	109
Apêndices.....	116

1 Introdução

A justificativa para a propositura deste trabalho foi embasada na literatura e em recentes estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia da FCF-Unesp envolvendo os extratos de folhas de *C. verbenacea* etanólico (EEt) e hidroetanólico 70% (EEtOH), sendo que EEtOH apresentou ação antioxidante e teores de compostos fenólicos e flavonoides superiores aos extratos etanólico e o aquoso (ROMÃO, 2016). O EEtOH foi capaz de capturar, *in vitro*, os radicais DPPH[•] e ABTS⁺, e inibir a ação oxidante de outras espécies reativas presentes no organismo como O^{2-•}, ROO[•], HOCl e H₂O₂. O O₂ é essencial a vida e uma pequena quantidade dele pode ser convertida em ERO. As ERO tem importantes funções de regulação metabólica e nas defesas contra infecções. No entanto, condições em que a produção de ERO excede a capacidade do organismo de se proteger podem gerar danos e comprometer a homeostase das biomoléculas. Desta forma, a inflamação pode se relacionar ao estresse oxidativo, uma vez que as células do sistema imune podem produzir ERO em excesso como resposta frente a uma doença inflamatória (BAYNES; DOMINICZAK, 2010).

Os resultados obtidos por Romão (2016) sugeriram os flavonoides e compostos fenólicos como responsáveis pela pronunciada atividade antioxidante. Com relação às análises químicas, foram identificadas e quantificadas nos extratos 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, cordialina A e (Z)-cordialina A. Porém, tais substâncias apresentaram baixo teor (m/m) neste extrato (0,66%, 0,67% e 0,12%, respectivamente), sugerindo que há outras substâncias responsáveis por tal atividade. Estes resultados e o uso popular da erva-baleeira ilustram a necessidade de aprofundamento do estudo fitoquímico da espécie associado as suas atividades anti-inflamatória e antioxidante.

Em complementação aos métodos instrumentais de análise química, os ensaios *in vitro* propiciam a triagem das atividades biológicas que substâncias ou derivados vegetais possam apresentar, embasados no uso tradicional ou mesmo em relatos de literatura. A partir daí, mecanismos de ação podem ser investigados e medicamentos desenvolvidos (YUNES; CECHINEL FILHO, 2014). Portanto, em linhas gerais, o presente trabalho propôs o isolamento, a purificação e identificação dos componentes majoritários do extrato EEtOH, a avaliação das atividades

antioxidante e anti-inflamatória dos componentes isolados e, também, a análise cromatográfica por OLE-HPLC e OLE-UPLC e a verificação do potencial embriotóxico através de ensaios em embriões de zebrafish. Neste trabalho foram atendidos princípios da química verde no desenvolvimento de métodos cromatográficos. O resumo gráfico das etapas do trabalho está no Apêndice 1.

1.1 Espécies vegetais e importância de seus usos no restabelecimento da saúde

A diversidade dos metabólitos secundários produzidos pelas espécies vegetais acompanha um largo portfólio de estruturas químicas geralmente complexas que são alvos de estudo e fontes para o desenvolvimento de novos tratamentos de afecções e também para a manutenção do bem-estar físico como um todo (EFFERTH et al., 2011). Desta forma, as substâncias de origem vegetal e seus derivados sintéticos integram grande parcela dos medicamentos disponíveis na terapêutica, além de serem abundantemente utilizados pela população, que também faz o uso tradicional das plantas medicinais na forma de chás ou garrafadas, por exemplo (NEWMAN; CRAGG, 2020; LIMA et al., 2008). Esta realidade evidencia a importância do estudo para avaliação do potencial terapêutico, segurança e composição química das espécies vegetais utilizadas com fins medicinais.

1.2 Metabolismo secundário

O metabolismo secundário, diferentemente daquele dito primário cujas funções são produção energética e biossíntese de substâncias, diz respeito a micromoléculas produzidas em menor escala, com especificidade e funções adaptativas. O metabolismo secundário é construído a partir do metabolismo primário, tendo o fornecimento de energia e metabólitos intermediários para o seu desenvolvimento a partir dos processos de glicólise, ciclo de Krebs e ciclo das pentoses-fosfato, conforme exposto na Figura 1. Isto é bem embasado quando analisada a complexidade estrutural das moléculas e uma biossíntese programada por muitos pares de bases de DNA, despendendo alta taxa metabólica para perdurar frente à seleção natural (WILLIAMS et al., 1989).

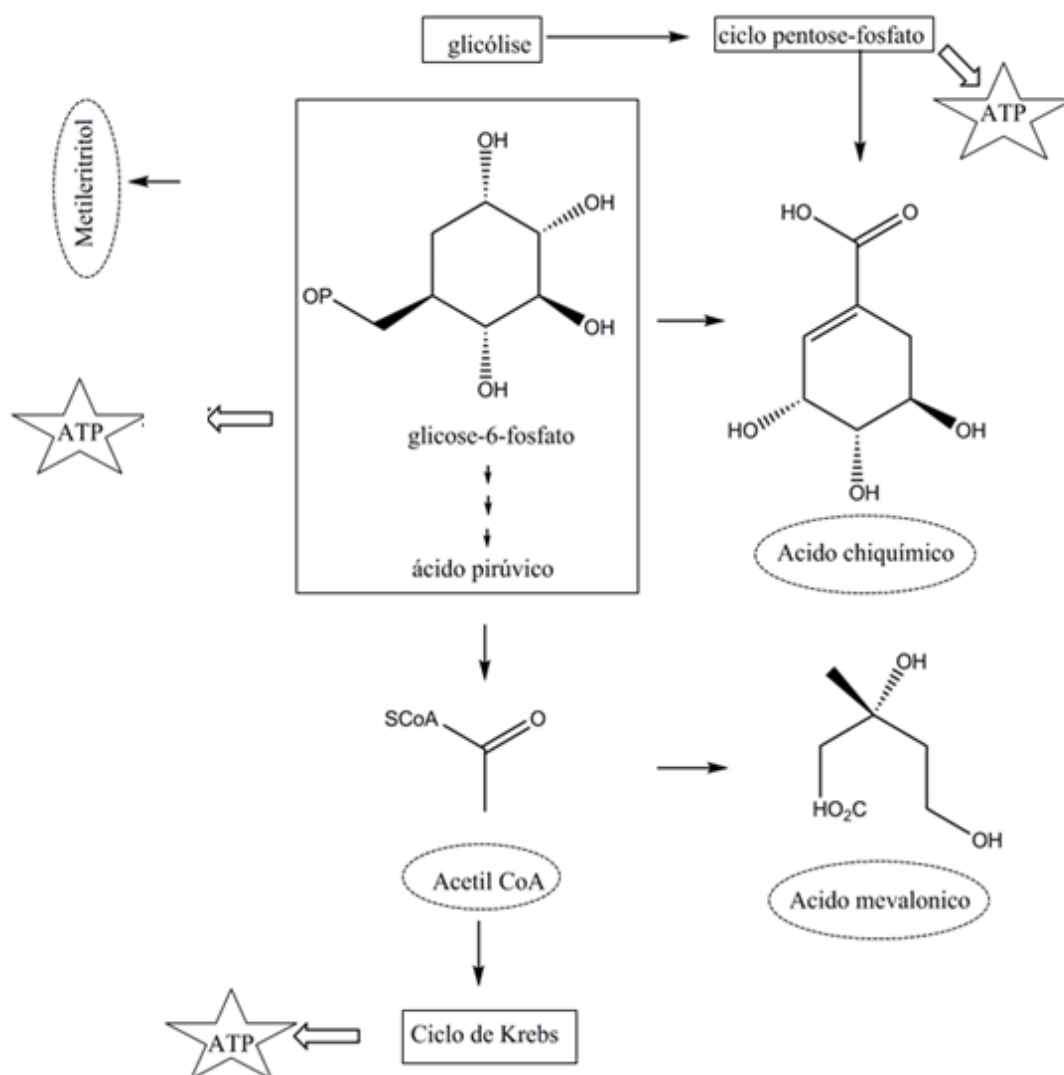


Figura 1 Correlação entre metabolismo primário e metabolismo secundário. Os intermediários representantes das principais vias dos metabólitos secundários estão em círculos tracejados.

Suas principais vias de produção são as vias do ácido chiquímico, ácido mevalônico, metileritritol (ou deoxixilulose) e do acetato. A via do chiquimato e a via do acetato se relacionam à grande classe dos alcaloides, taninos e flavonoides (compostos fenólicos). A via do mevalonato e da deoxixilulose se relacionam aos terpenos. Metabólitos secundários podem ser produzidos por mais de um órgão da planta, podem ser translocados e geralmente são armazenados em vacúolos quando hidrofílicos, ou em estruturas secretoras (tricomos secretores, cavidades e canais secretores) ou associados a outros componentes mais hidrofóbicos (ex. membranas fosfolipídicas) quando possuem característica mais lipofílica. Sua

produção sofre influência das exigências do ambiente e, portanto, os perfis químicos das plantas podem variar de acordo com o ciclo circadiano ou sazonal, idade, necessidades relacionadas a sobrevivência e perpetuação da espécie (fatores ambientais), características genéticas e nas diferentes partes do vegetal. Ao final, serão utilizados ou apenas degradados (GOBBO-NETO et al., 2007; SIMÕES et al., 2017).

1.3 *Cordia verbenacea* DC.

Popularmente conhecida como erva-baleeira, caatinga-de-barão, maria-preta e maria-milagrosa, *Cordia verbenacea* DC., cujas sinonímias são *Varronia curassavica* (Jacq) e *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult são amplamente empregadas, é nativa do Brasil e pertencente à família *Boraginaceae* (Figura 2). A espécie consta no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, com sugestão do uso da infusão da folha seca (3 g) em água (q.s.p 150 mL) para uso extemporâneo na forma de compressas na região afetada, ou na forma de gel, a partir do extrato hidroetanólico 70% (10 mL) em gel base (q.s.p 100 g), ambas preparações como auxílio no alívio de sintomas inflamatórios localizados (BRASIL, 2021). Ainda a respeito do Formulário, dentre as advertências está o uso não recomendado das preparações da espécie em gestantes e lactantes, o que reforça a questão da avaliação da embriotoxicidade que será abarcada neste trabalho, em decorrência da falta de dados sobre segurança nesses casos. A *C. verbenacea* também integra a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, uma lista criada a partir do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que elenca espécies com potencial para gerar produtos de interesse ao SUS, e é norteadada pela melhoria da atenção à saúde, uso sustentável da biodiversidade, geração de renda, desenvolvimento tecnológico e por outros princípios (BRASIL 2006). Trata-se de um arbusto perene de no máximo 3 m, com folhas simples, alternas, coriáceas e aromáticas, pequenas flores de corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpioides e vistosas (Figura 3).



Figura 2 Espécimes de *Cordia verbenacea* DC. (campo experimental do CPQBA-Unicamp, Paulínia-SP). Fonte: Autor.



Figura 3 Em detalhe, ramo florido de *Cordia verbenacea* DC. (Fonte: PEREIRA 2017).

Seu óleo essencial (OE), extratos hidroetanólico e etanólico de partes aéreas tem sido relatados na literatura recente por suas atividades antioxidante, antiulcerogênica e anti-inflamatória (MEDEIROS et al., 2007; ROLDAO et al., 2008; SANTI et al., 2014).

Estudos fitoquímicos realizados com a espécie já identificaram triterpenos cordialina A e B, (*Z*)-cordialina A (*cis*-cordialina A), as isoflavonas 7,4'- diidroxi-5'-carboximetóxi isoflavona e 7,4'-diidroxi-5'-metil isoflavona, 4',5'-diidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona, 5,6'-diidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona (LINS et al., 1980¹), além da artemetina (flavonol) e do ácido rosmarínico (derivado do ácido cinâmico) que apresentam ação anti-inflamatória (VELDE et al., 1982; BAYEUX et al., 2002; SERTIE et al., 1990; MATOS et al., 2015; PEREIRA 2017; Martim et al., 2021). O OE contém monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o α -pineno seu principal constituinte, além da presença de (*E*)-cariofileno, aloaromadendreno e α -humuleno (Figura 4). O medicamento fitoterápico Acheflan[®], indicado como anti-inflamatório tópico, contém o OE das folhas de *C. verbenacea* como insumo farmacêutico ativo e como marcador ativo o α -humuleno (LAMEIRA et al., 2009; DE CARVALHO JR. et al., 2004; LINS et al., 1980; ROLDÃO, 2008; SERTIE et al., 1990; VELDE et al., 1982; ACHE, 2015).

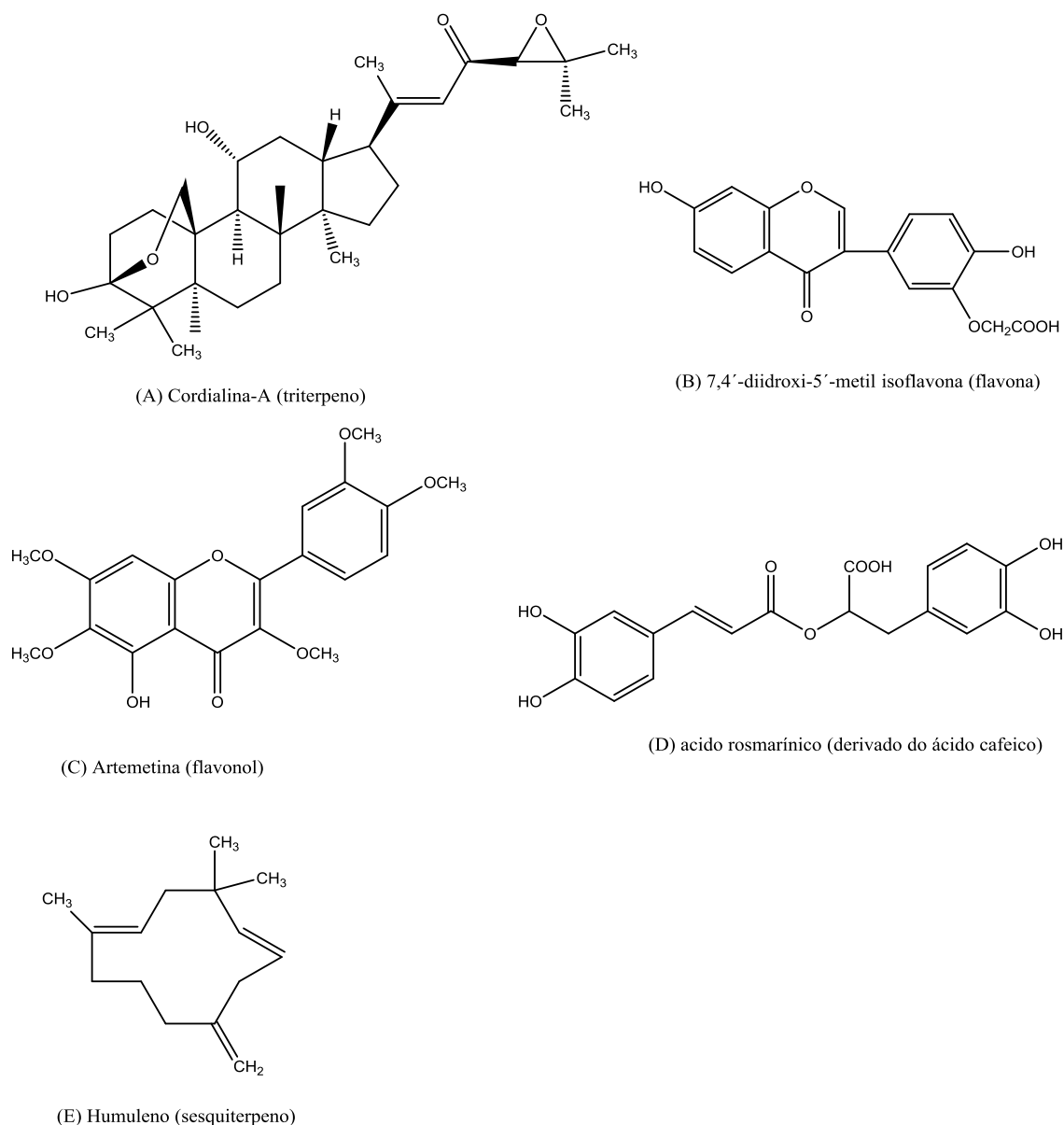


Figura 4 Estruturas químicas dos principais representantes de cada classe de metabólitos secundários presentes da *C. verbenacea*.

Em 1991, Sertié e demais autores (SERTIÉ et al., 1991) demonstraram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico 70% das folhas em diferentes modelos experimentais (edema induzido por nistatina e dermatite induzida por óleo de cróton), e efeito protetor da mucosa gástrica. Em estudo realizado por Sertié et al. (2005), a administração tópica do extrato etanólico 70% inibiu o edema em ratos Wistar Hanover induzido por nistatina proporcionalmente às doses utilizadas. Ribeiro e demais autores (2011) concluíram que a administração sistêmica (por via oral) do OE ou do extrato etanólico de hastes e folhas secas são opções para tratamento de doenças inflamatórias, especialmente as que apresentam um perfil crônico, tendo

apresentado diminuição da perda óssea na periodontite induzida por ligadura em ratos. As observações sobre as atividades anti-inflamatórias dos extratos e do OE podem ser consequência da presença de metabólitos secundários tais como flavonoides, ácido rosmarínico e sesquiterpenos. Apesar da baixa polaridade dos sesquiterpenos ativos do OE, os mesmos podem ser extraídos com etanol e estarem presentes em extratos de partes aéreas de *C. verbenacea*.

Ademais, um ponto a ser retomado nesta introdução diz respeito à presença de ácido rosmarínico e de artemetina em extratos de *C. verbenacea*. O ácido rosmarínico é comumente relatado na família Boraginaceae. As principais atividades biológicas relatadas e relacionadas com a substância são antioxidante, anti-inflamatória e antibacteriana (PETERSEN; SIMMONDS, 2003). De acordo com Lee e colaboradores (2006), o seu efeito anti-inflamatório está provavelmente relacionado a redução na expressão de genes promotores de NF- κ B. Com relação à presença do ácido rosmarínico, em tinturas de *C. verbenacea*, observou-se a presença deste composto e sua maior quantidade em períodos de chuva, tendo diminuído em 12,05% a quantidade em maio (2 mm de precipitação) com relação a março que teve 20 mm de precipitação (MATOS et al., 2015). Não obstante, o ácido rosmarínico obtido a partir de extrato metanólico de *C. verbenacea* foi avaliado em ensaios de edema de pata induzidos por veneno de *Bothrops jararacussu*, que possui uma mistura complexa que inclui a presença de fosfolipase A2 (TICLI et al., 2005). O extrato metanólico das folhas foi mais eficiente na redução do edema comparado ao ácido rosmarínico, sugerindo que outros compostos ativos podem ter somado atividades no extrato metanólico. Ainda neste estudo, os dados obtidos sugeriram que o ácido rosmarínico interagiu mais especificamente com fosfolipases básicas através de prováveis interações eletrostáticas. Tanto o extrato metanólico quanto a fração rica em ácido rosmarínico reduziram os efeitos inflamatórios nos animais.

No tocante a artemetina, outra substância cuja presença foi verificada em *C. verbenacea*, Sertié et al. (1990) indicaram ser a pentametoxiflavona em foco o marcador da atividade anti-inflamatória de *C. verbenacea* em modelos de estudo em ratos (granuloma induzido por corpo estranho e edema induzido por carragenina), que demonstraram a redução do edema de pata além de reduzir a permeabilidade vascular causada pela indução intracutânea de histamina tal como outros agentes não esteroidais disponíveis, à exemplo do ácido acetilsalicílico. Ainda neste estudo,

a artemetina se mostrou pouco tóxica de maneira geral, sendo que ratos tratados com 44 e 100,6 mg.kg⁻¹, por via oral não demonstraram alterações significativas no consumo de água, alimentos e no peso corporal, além de não indicarem alterações macroscópicas em rins, fígado, baço e estômago. Conquanto, pesquisa dirigida por Bayeux et al. (2002) não atribuiu à artemetina a redução da atividade inflamatória observada com o extrato diclorometano das folhas e caules de *C. curassavica*, sugerindo não ser esta a principal substância relacionada a atividade e contradizendo o proposto no estudo anteriormente citado (SERTIÉ et al., 1990). De tal modo, os achados da literatura com relação à artemetina, presente em nossa espécie de estudo, despontam a sugerir uma busca mais refinada a cerca de tal composto em extratos e suas atividades.

O fato do extrato etanólico de folhas de *C. verbenacea* apresentar tanto atividade anti-inflamatória quanto antiulcerogênica (ROLDÃO et al., 2008) destaca *V. curassavica* e seus metabólitos secundários (ex. artemetina e ácido rosmarínico) como interessantes opções para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, pois uma das principais restrições para o uso contínuo dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) é justamente o aparecimento de úlceras pépticas (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2011; RANG et al, 2011).

Apesar da reiterada menção na literatura da atividades anti-inflamatória da erva-baleeira, ainda pouco se relatou sobre a atividade antioxidante e sua composição química com relação aos metabólitos secundários não voláteis de extratos. Além disso, seu uso popular na forma de extratos hidroetanólico e etanólico sugere a realização de estudos fitoquímicos para identificação destes componentes, incluindo o isolamento e/ou a determinação estrutural de substâncias com o uso de técnicas hífenadas (ex. HPLC-DAD, HPLC-EM, HPLC-RMN). Tais metabólitos secundários isolados podem ter suas ações biológicas avaliadas, conforme também proposto em nosso trabalho. Do ponto de vista citotóxico, o extrato etanólico 70% não agiu interferindo a formação óssea de ratos e sua prole, nem a maturidade sexual ou a fertilidade (SERTIÉ et al., 2003).

As partes aéreas ou folhas da espécie são popularmente utilizadas na forma de “garrafadas” para tratamentos contra infecções, úlceras gástricas, dores e reumatismo (DE CARVALHO JR. et al., 2004; PASSOS et al., 2006), bem como em

Farmácias Vivas como a de Jurucê-SP, que reforça a importância acerca do estudo de extratos etanólicos e hidroetanólicos (PEREIRA et al., 2014).

1.4 Atividade antioxidante e produtos naturais

Nos últimos anos, a busca por produtos naturais com atividade antioxidante tem sido pertinaz, dado que o desequilíbrio entre as espécies reativas e os antioxidantes contribuem para a excessiva geração de espécies reativas, levando ao estresse oxidativo. O excesso de reações com substratos biológicos pode desencadear danos às biomoléculas, a exemplo do material genético, cujo estresse oxidativo pode colaborar no desencadeamento da oncogênese, ou a oxidação de lipídeos que pode instigar o processo de aterosclerose e, consequentemente seus problemas secundários tais quais trombose ou infarto do miocárdio (RANG-DALE et al., 2011; BAYNES et al., 2015).

O oxigênio está envolvido na fosforilação oxidativa, reações de hidroxilação e oxigenação, sendo que, uma fração residual se converte em espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO compreendem, entre outros, os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peroxila ($ROO^{\cdot}$) e hidroxila ($HO^{\cdot}$), e derivados não radicalares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete ($^1O_2$) e ácido hipocloroso ($HOCl$). ERO podem ser substratos para enzimas atuarem na regulação do metabolismo e nas defesas contra agentes infecciosos. As espécies reativas de nitrogênio (ERN), por exemplo o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), também possuem suas funções na regulação metabólica e renovação de biomoléculas (BAYNES; DOMINICZAK, 2015). No entanto, ERO e ERN podem causar danos quando em quantidades excessivas e que superem a capacidade das defesas antioxidantes de protegerem os tecidos, levando ao estresse oxidativo, que é típico de processos inflamatórios em que as células do sistema imunológico produzem as espécies em resposta a doenças e elas podem causar danos em proteínas, lipídios e DNA. Além disto, espécies reativas estão envolvidas em patologias como Alzheimer, Parkinson e câncer (DURACKOVA, 2010; MATTILA et al., 2015).

Existem fontes exógenas naturais de antioxidantes e que incluem compostos fenólicos como flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos, além de carotenoides e vitaminas, dentre outros. Um clássico exemplo é a quercetina (flavonol), que influencia vias de transdução de sinal relacionadas a atividade antioxidante, enzimas

e produção de espécies reativas de oxigênio, além de apresentar ação antirradicalar (XU et al., 2019).

1.4.1 Ensaios *in vitro* com espécie radicalar e espécies reativas de oxigênio (ERO)

1.4.1.1 Radical DPPH

O DPPH[•] ou radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila é um radical livre detentor de estabilidade em decorrência de seu efeito ressonante (duplas alternadas nos anéis benzênicos). Sua captura em ensaios antioxidantes gera a redução em sua estrutura (Figura 5), sendo o elétron desemparelhado do nitrogênio atrelado a um elétron cedido por um antioxidante, modificando a coloração púrpura, típica do DPPH não reduzido, para amarela, proporcionalmente ao grau de redução observado; tal mudança pode então ser avaliada fotometricamente (MOLYNEUX, 2004; SHARMA et al., 2009).

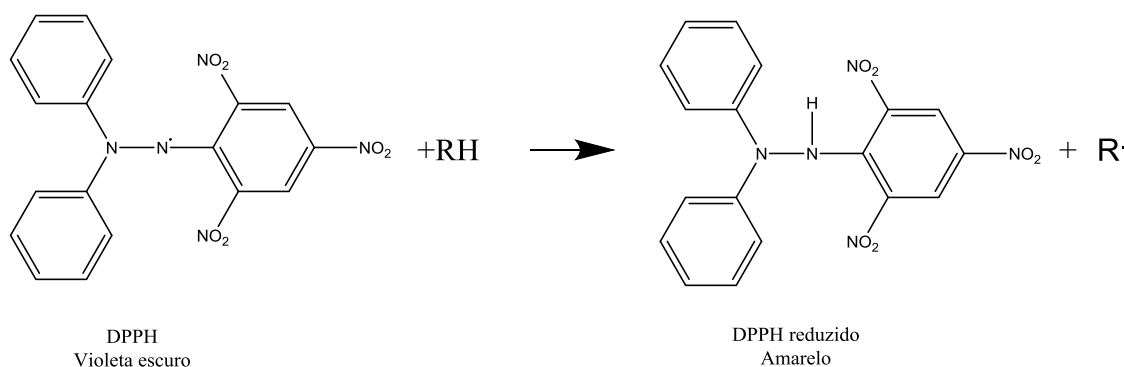


Figura 5 Reação de redução do DPPH[•] na presença de um antioxidante.

1.4.1.2 Ânion radicalar superóxido (O₂^{•-})

O ânion radicalar superóxido é bastante reativo e participa de diversas atividades biológicas. A partir de sua redução pode ser formado o radical hidroperoxila, ainda mais reativo (figura 6, reação 1), em pH 7,0, a partir de reação de protonação. Ambos radicais interagem com moléculas biológicas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, provocando danos. O radical livre formado é causa de danos teciduais, porém é importante para os fagócitos uma vez que é produzido durante a ativação desses na defesa do organismo. Biologicamente estes mecanismos são controlados pelas defesas antioxidantes naturais (MATTILA et al.,

2015). Como exemplo deste mecanismo, pode ser citada a indução de enzimas superóxido dismutase, que reduzem a concentração de ânion radicalar superóxido catalisando a formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio (Figura 6, reação 2).

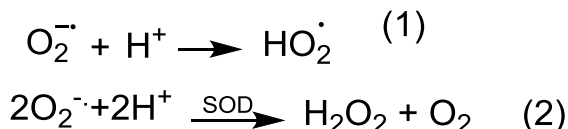


Figura 6 Formação do radical hidroperoxila por protonação (1), e formação de peróxido de hidrogênio e de oxigênio por reação de enzima superóxido dismutase (SOD) a partir do ânion radicalar superóxido (2).

1.4.1.3 Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (HO·)

O peróxido de hidrogênio se trata de uma espécie química mais estável do que as anteriores, e suas funções incluem a sinalização celular contra patógenos. Apesar de sua baixa reatividade, pode ser convertido a ERO mais danosas, tais como o radical hidroxila. Por definição, não se trata de um radical livre, mas atravessa membranas celulares e favorece a formação do radical hidroxila, que é danoso aos tecidos (BARREIROS et al., 2006). O radical hidroxila tem um intenso potencial danoso ao sistema biológico uma vez que seu elétron desemparelhado pode aceitar facilmente outro da região eletrônica vizinha (MATTILA et al, 2015). Este radical se forma a partir de reações entre H₂O₂ e O₂^{·-} (figura 7, reação 1), ou entre H₂O₂ e metais de transição (figura 7, reação 2), como ilustrado abaixo:

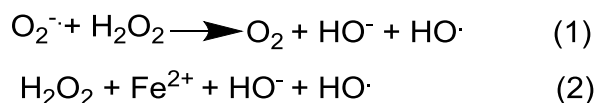


Figura 7 Reação de formação do radical hidroxila a partir do peróxido de hidrogênio e do ânion radicalar superóxido (1) e formação do radical hidroxila a partir da reação do peróxido de hidrogênio com metal de transição, Fe²⁺ (2).

1.4.1.4 Ácido hipocloroso (HOCl)

O HOCl é formado no processo inflamatório a partir de neutrófilos que se infiltram nos tecidos, se ativam e formam os fagossomos. Por sua vez, na presença de H₂O₂, o HOCl é produzido nos neutrófilos quando íons Cl⁻ são oxidados pela hemoproteína presente em neutrófilos e monócitos chamada mieloperoxidase (MPO), conforme a figura (figura 8) abaixo:

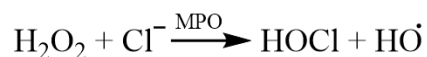


Figura 8 Formação de ácido hipocloroso a partir de peróxido de hidrogênio pela oxidação de íons cloro na presença de mieloperoxidase (MPO).

1.5 Atividade anti-inflamatória e produtos naturais

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 que mantenha a homeostase dos tecidos sob diversas condições nocivas, tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de células e liberação de mediadores citotóxicos, inflamatórios e quimiotáticos (RANG-DALE et al., 2011; BAYNES et al., 2015).

A inflamação é caracterizada como um processo desencadeado nas injúrias teciduais e na resposta às infecções, seja no intuito de erradicar microrganismos, agentes irritantes ou, ainda, facilitar a reparação tecidual. Possui como sinais clássicos rubor, calor, edema, dor e perda de função, decorrentes da liberação de mediadores químicos. Mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas desencadeiam a fase aguda, que é caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e infiltração celular, o que leva ao inchaço devido ao extravasamento de fluidos. Células fagocitárias, à exemplo dos neutrófilos, são atraídas quimicamente para o foco inflamatório por prostaglandina E2, leucotrienos, citocinas, componentes do sistema complemento, e outras moléculas liberadas por células de defesa envolvidas no processo inflamatório. Além disso, os microrganismos contra quem o sistema imunológico se defende, também liberam moléculas quimioatraentes (RANG-DALE et al., 2011; BAYNES et al., 2015).

O processo de infiltração celular e reações bioquímicas envolvidas levam a produção de radicais livres, correlacionando o processo inflamatório à atividade oxidante, sendo, portanto, inoportuno que ocorra de forma descontrolada, uma vez que pode gerar resultados danosos ao tecido inflamado. Neutrófilos quando ativados em áreas de inflamação sofrem alterações que resultam na formação de ERO. Quando em excesso, estas alterações podem se relacionar com o aparecimento de processos degenerativos das inflamações crônicas e diversas patologias (SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; WRIGHT et al., 2010).

Há vários medicamentos anti-inflamatórios inibidores das enzimas ciclooxigenase 1 e/ou 2 disponíveis no mercado para o tratamento de dores agudas ou crônicas, tendo atividades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, e existem, ainda, os anti-inflamatórios esteroidais, comuns no tratamento de doenças reumáticas, com riscos de uso a longo prazo que incluem retenção hídrica, osteoporose e outros, enquanto que o uso indiscriminado de AINEs podem levar a problemas renais, gastrointestinais, hepáticos e outros mais (SILVA et al., 2019).

As espécies vegetais possuem a capacidade de síntese de uma grande variedade de metabólitos secundários, incluindo aqueles com habilidade para agirem como anti-inflamatórios. *Curcuma longa* L., por exemplo, regula o processo inflamatório em várias vias, incluindo a redução da ativação de citocinas pró-inflamatórias, interferência em vias importantes de sinalização e inibição da liberação de prostaglandinas através do bloqueio da via de ácido araquidônico (TASNEEM et al., 2019). Uma grande classe de notório destaque no que diz respeito a atividade em pauta é a dos flavonoides, como os flavonóis kaempferol, rutina, quercertina, flavanois como a hesperidina, flavonas como a luteolina e muitos outros descritos por atuarem modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, interferindo na via do ácido araquidônico, modulação da óxido nítrico sintase, dentre outros (COUTINHO et al., 2009).

1.6 Ensaios com animais alternativos: embriões de zebrafish

Ensaios com animais alternativos permitem uma triagem a respeito da toxicidade e de suas consequências de maneira mais preditiva que ensaios convencionais de contaminantes (NOYES et al, 2016). Os ensaios com zebrafish abarcam princípios da química verde e dela fazem parte, seja pela praticidade, uso reduzido de reagentes e tempo de resposta, além da aplicabilidade em segurança química, podendo ser utilizado para caracterizar os efeitos biológicos de substâncias que podem agir negativamente na busca pela química sustentável (NOYES et al, 2016). Zebrafish (*Danio rerio*), popularmente também conhecido por paulistinha, é um peixe de água doce originário da Ásia e pertence à família dos Cyprinidae. Os ensaios com seus embriões são importantes ferramentas disponíveis para os estudos de prospecção de fármacos e produtos naturais bioativos através, por exemplo, da observação do efeito tóxico e do mecanismo de ação, além de estudos

de impactos ambientais de moléculas ou estudos em genética química (MAES et al., 2012).

O desenvolvimento do embrião de zebrafish até a formação da larva jovem se dá, em média, em 72h. Após a fecundação, em menos de 1h o zigoto sofre clivagem e, até a quinta hora já passou pelo estágio de blástula seguindo para a etapa de gástrula. Na décima hora, no período de segmentação, pode ser notada a presença de somitos, que são importantes para a formação do corpo e organização do sistema nervoso periférico. Também ocorre o desenvolvimento de neurômeros e o aparecimento da cauda. Após a organogênese, em 24h se tem a formação do saco vitelino, responsável pela nutrição do embrião, e o aparecimento de pigmentação e circulação. Em 48h, a rápida morfogênese é concluída e ocorre a eclosão do ovo. Em 72h, a bexiga natatória infla e a larva começa a ter comportamentos ativos de prevenção e sobrevivência (KIMMEL et al., 1995).

Diante da tendência científica em reduzir o número de animais mamíferos sacrificados em experimentos, o zebrafish surge como um modelo animal alternativo que permite a observação de parâmetros de toxicidade pela transparência no estágio embrionário e larval e fornecem resultados consideráveis por envolver processos de absorção, metabolização e excreção. Além disso, a experimentação com embriões de zebrafish possui menos restrições éticas, menor custo de manutenção e mais rapidez para aquisição de resultados quando comparamos com a utilização de modelos mamíferos (BHUSNURE et al., 2015). Além disso, cerca de 70% dos genes humanos tem ao menos um ortólogo do zebrafish, ou seja, possuem ancestral comum apesar de serem de espécies diferentes, e possuem a mesma função (HOWE et al 2013). De acordo com a OCDE (2013), fenótipos de malformação e toxicidade podem ser analisados em até 96h pós fertilização (hpf). A coagulação do embrião (Figura 9A) representa sua total inviabilidade, apresentando inclusões escuras na célula. Além disso, fenótipos de malformação podem ser observados, como por exemplo a malformação de saco vitelínico (Figura 9B), curvatura de coluna e edema de pericárdio (Figura 9C), ausência de botão do olho e não descolamento da cauda (Figura 9D).

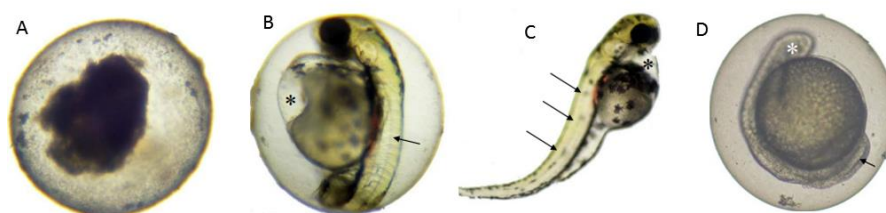


Figura 9 Fenótipos de malformação em zebrafish. (A) Embrião coagulado. (B) Embrião com 48hpf com edema de saco vitelínico (*) e formação distinta de somitos. (C) Embrião com 96hpf sem a presença de somitos (→), com escoliose e edema de pericárdio (*). (D) Ausência do botão do olho (*) e não descolamento da cauda (→) no embrião com 96hpf. Fonte: OCDE, 2013.

1.7 Abordagens em Química Verde: *online extraction coupled to liquid chromatography analysis* (OLE-HPLC, OLE-UPLC) e uso de solventes verdes

O OLE-HPLC/OLE-UPLC se trata de um sistema de extração sob alta pressão de matriz sólida acoplada em série. Neste sistema, matrizes sólidas, à exemplo das partes das plantas, tecidos de animais, solos e outras, podem ser analisadas pela inserção direta da amostra no sistema, dispensando as etapas de pré-tratamento e incluindo o processo de extração com os solventes do método cromatográfico a ser empregado na análise (FERREIRA et al., 2016). Dentre outras vantagens do sistema otimizado estão inclusas apenas o uso de peças, tais quais bombas e válvulas, próprias dos equipamentos HPLC e UPLC, *holders* e cartuchos vazios de colunas de guarda, sílica e filtros de membrana (FERREIRA et al., 2016). O sistema traz consigo a celeridade do processo científico e vai ao encontro da tendência mundial em Química Verde por dispensar etapas como obtenção de extrato, secagem, moagem de material vegetal e pré-tratamento de amostras (diluição, extração em fase sólida, secagem, solubilização e filtração) para injeção em HPLC (FERREIRA et al, 2016). É uma ferramenta que economiza solventes e valoriza a prevenção do desperdício, o uso da química com pouca ou nenhuma toxicidade aos seres vivos e ao meio ambiente e evita o uso de solventes e outros auxiliares tóxicos sempre que possível (ABDUSSALAM-MOHAMMED et al, 2020).

A química verde tem como base 12 princípios: prevenção de modo a evitar a produção de resíduos, economia de átomos através de metodologias adequadas, síntese de produtos menos perigosos, ou seja, atóxicos ou com baixa toxicidade para os seres vivos e o meio ambiente, desenho de produtos seguros, solventes e auxiliares mais seguros, eficiência energética, uso de fontes renováveis de matéria

prima, evitar a formação de derivados, catálise, desenho para a degradação dos produtos químicos, análise em tempo real para a prevenção da poluição e a química segura para a prevenção de acidentes (LENARDÃO et al., 2003).

A possibilidade de substituição de solventes convencionais por solventes verdes para análise cromatográfica, a adaptação de métodos mais curtos para validação e quantificação e desnecessidade da etapa de preparo de amostras com solventes para análises químicas impulsionam a abordagem em química verde. O conceito de química verde envolve a percepção dos riscos relacionados ao uso de produtos químicos, com vistas a gerenciar o perigo e a exposição ao mesmo. Diante desta vertente, existe uma tendência de buscar solventes viáveis do ponto de vista ambiental, da saúde e da segurança nos processos. O etanol, por exemplo, é considerado um solvente verde, sendo biodegradável, menos tóxico para peixes, e sem grandes impactos para sua produção, ao contrário do que ocorre com o 1-propanol, bastante impactante na sua produção petroquímica (TOBISZEWSKI et al., 2017). O etanol é um solvente com propriedades similares a acetonitrila e ao metanol para análises cromatográficas, além de apresentar menor custo de descarte que os anteriores e menor partição com o ar, ou seja, menor toxicidade. As desvantagens são com relação ao limite de detecção do UV (210 nm) superior a metanol e acetonitrila e que podem gerar ruídos maiores na linha de base, mas que não interferem caso o analito tenha grupos com boa absorção no UV. Outra possível desvantagem é com relação a viscosidade, sendo necessários ajustes no sistema cromatográfico, como aumento da temperatura de análise ou redução da vazão, para que se mantenha uma pressão aceitável no sistema, utilização de sistemas ternários de solventes, ou o uso de sistemas com alta pressão, como o UPLC (PLOTKA et al., 2013; YABRÉ et al., 2018).

Os álcoois 1-propanol, etanol, 1-butanol e *tert*-butil álcool ocupam os primeiros lugares no *ranking* de risco ao meio ambiente definido no trabalho de Tobiszewski et al. (2017), tendo os menores impactos e atendendo a princípios da química verde. Em contrapartida, metanol e acetonitrila, comumente utilizados em análises químicas cromatográficas, ocupam, respectivamente, as posições 33 e 31 do *ranking* composto por 78 solventes.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Realizar um estudo fitoquímico e verificar a embriotoxicidade de extratos, avaliar a atividade antioxidante e a atividade anti-inflamatória de metabólitos secundários.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar, purificar e identificar metabólitos secundários de EEt das folhas de *C. verbenacea* para posterior avaliação biológica ou quantificação;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* (DPPH[•], O₂^{•-} e HOCl) dos extratos e de metabólitos secundários;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* de metabólitos secundários;
- Avaliar a embriotoxicidade dos extratos empregando modelo animal alternativo com zebrafish.
- Desenvolver e validar métodos em cromatografia líquida que atendam a princípios da Química Verde.

3 Materiais e métodos

3.1 Obtenção e preparo do material vegetal

O material vegetal e EEt foram obtidos por PEREIRA (2017), do Lab. de Farmacognosia (FCF-UNESP; Fapesp 13/242989). EEtOH foi obtido por Romão (2016), a partir da mesma coleta. As folhas foram coletadas no CPQBA-UNICAMP (Paulínia-SP), coordenadas geográficas - 22° 47' 52" S, -47° 6' 49" W secas em estufa (3 dias, 40° C) e moídas em moinhos de facas. Os extratos hidroetanólico 70% (EEtOH) e etanólico (EEt) foram obtidos por remaceração em 3 etapas (com troca do líquido extrator) por 7 dias (1:15, m/v) e, após processo de secagem, mantido sob refrigeração em frasco vedado. Este trabalho está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente sob o número A55E317/2018 (Unesp, 48.031.918/0001-24).

3.2 Análises cromatográficas

Para as análises em HPLC, os extratos, frações e substâncias purificadas foram submetidos a um pré-tratamento. As análises foram desenvolvidas por cromatografia líquida em modo reverso, utilizando colunas C18, inicialmente em condições de gradiente exploratório: 5-100% de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; vazão de 1,0 mL/min; detector do tipo DAD/UV-Vis ou UV; V_{inj} : 20 μ L (modo analítico) ou 1 mL (modo preparativo). Quando necessário, aditivo foram adicionados à fase móvel (ex. ácido acético 1 %). A partir do resultado destas análises, foram desenvolvidos métodos em modo isocrático ou gradiente. O pré-tratamento de amostras consistiu em 10 mg de amostra dissolvidos em 1 mL de metanol/H₂O 95:5 (v/v) e, posteriormente, submetida a uma EFS em cartucho SampliQ[®] (C18; 45 μ m; 500 mg; 6 mL) previamente ativado com metanol e condicionado com metanol/H₂O 95:5 (v/v). Após a aplicação da amostra no cartucho, efetuou-se eluição com 4 mL de metanol/H₂O 95:5 (v/v). O eluato foi seco em capela e em dessecador com sílica gel, sob pressão reduzida, e solubilizado de acordo com a fase móvel a ser empregada na análise por HPLC. Em seguida, a solução foi filtrada em membrana PVDF (0,22 μ m; PerkinElmer[®] PVDF Syring Filters) diretamente para *vial* de 2 mL. O pré-tratamento para a injeção em UPLC foi realizado com etanol ao invés de metanol, nas mesmas condições acima citadas.

Nas análises por CCD, as placas utilizadas para o procedimento analítico foram confeccionadas em placa de vidro de 20x20 cm com camada de sílica gel G (Merck[®]) de 0,25 mm de espessura, para análises qualitativas, tendo sido utilizadas também placas de sílica gel em suporte de alumínio adquiridas comercialmente (20x20 cm, 15-40 μ m, Fluka[™] Analytical). Previamente às análises, as placas de sílica gel foram submetidas a aquecimento em estufa a 110°C por 1 h para a retirada de umidade que pudesse desativar grupamentos silanóis da sílica.

Foram utilizados cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] UV/Vis, cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] PDA, UPLC Acquity[®] Waters UV/Vis e UPLC Shimadzu[®] PDA Nexera.

3.3 Fracionamento de EEt

Para as técnicas de cromatografia em coluna (CC) e extração em fase sólida (EFS) o empacotamento, com sílica, das colunas de vidro utilizadas para os

processos de EFS e CC foi feito a seco. O volume morto foi medido experimentalmente através do acondicionamento da sílica e medição do volume do primeiro eluente a ser utilizado no procedimento.

A fim de evitar desperdícios e estabelecer condições de separação adequadas, estas foram otimizadas em pequena escala para verificar o quão apropriado estava o método, verificando os resultados obtidos e então, se necessário, aprimorando as condições para, em seguida, reproduzir em maior escala.

Inicialmente, o EEt seco foi submetido a uma extração em fase sólida (EFS). O procedimento foi realizado por PEREIRA (2017), da seguinte forma: 30 g de extrato seco foram misturados com a fase estacionária (1:1, m/m) e aplicados em coluna de vidro (h=12 cm, d=10 cm) contendo sílica gel (0,060-0,200 mm). A eluição (V_{eluente} : 1800 mL) foi realizada sob vácuo como segue ordenado a seguir: 1. hexano/acetato de etila 8:2 (frações: EFS 1.1 e 1.2); 2. hexano/acetato de etila 6:4 (frações: EFS 2.1 e 2.2); 3. Acetato de etila (frações: EFS 3.1 e 3.2); 4. acetato de etila/metanol 90:10 (frações: EFS 4.1 e 4.2); 5. Metanol (frações: EFS 5.1 e 5.2).

3.3.1 Fracionamento de 3.2 em menor escala (3.2CCteste) e análise por CCD

Inicialmente, a fração 3.2EFS foi escolhida para o fracionamento em menor escala (3.2CCteste). Para isto, 50 mg foram parcialmente dissolvidos no eluente 1 (hexano/acetato de etila 6:4), tendo se formado um precipitado amarelo, que foi colocado, juntamente com a parte solúvel, em coluna de vidro (d_{col} =1 cm) contendo sílica gel (0,040-0,063 mm; h= 20 cm). A eluição foi realizada sob pressão (V_{eluente} : 50 mL) da seguinte maneira: 1.Hexano/acetato de etila 6:4 (frações 1 a 8); 2. hexano/acetato de etila/etanol 5,9:4,05:0,05 (frações 9 a 16); 3. hexano/acetato de etila/etanol 5,6:4,15:0,25 (frações 17 a 25); 4. hexano/acetato de etila/etanol 5,0:4,7:0,30 (frações 26 a 34); acetato de etila (frações 35 a 42); 5. etanol/H₂O 9,5:0,5 (fração 43). A escolha pelo etanol em lugar do metanol partiu do interesse em começar a introduzir critérios que atendessem aos princípios da Química Verde neste trabalho.

As amostras obtidas no fracionamento de 3.2CCteste foram solubilizadas em etanol (3 mg/mL, $V_{\text{apl.}}$: 0,2 mL) e submetidas à análise com diferentes fases móveis

(Tabela 1), tendo como reveladores anisaldeído sulfúrico ou ácido sulfúrico 10% em etanol (110° C; 10 min).

Tabela 1 Relação de fases móveis para análise de frações obtidas em 3.2CCteste.

Fração	Fase móvel – hexano/acetato de etila/etanol
1 a 14	5,9:3,9:0,2
15 a 25	5,0:4,8:0,2
26 a 30	5,0:4,7:0,3 + 1% ácido acético
27 a 39	5,0:4,7:0,3 + 1% ácido acético
41 a 46	5,0:4,7:0,3 + 1% ácido acético

As cromatoplasmas de 20x20 cm continham uma camada de sílica gel G (Merck®) de 0,25 mm de espessura, e foram previamente submetidas a aquecimento em estufa a 110°C por 1 h para a retirada de umidade que pudesse desativar seus grupamentos silanóis.

3.3.2 Fracionamento de 3.2 em maior escala (3.2CC) e análise por HPLC-UV

Baseado nos resultados obtidos com 3.2CCteste (3.3.1), as condições para o fracionamento de 3.2EFS em maior escala foram otimizadas (3.2CC). Em uma coluna de vidro ($d_{col}=2,5$ cm) contendo sílica gel (0,040-0,063 mm, $h=20$ cm) foram aplicados 1.250 mg da fração 3.2 dissolvidos no eluente 1 (hexano/acetato de etila 6:4), e separados da parte precipitada, no intuito de realizar uma separação prévia da fração. A eluição foi realizada sob pressão reduzida ($V_{eluente}$: 1.300 mL) da seguinte maneira: 1. hexano/acetato de etila 6:4 (frações 1 a 7); 2. hexano/acetato de etila /etanol 5,9:4,05:0,05 (frações 8 a 16); 3. hexano/acetato de etila /etanol 5,0:4,7:0,30 (frações 17 a 25); acetato de etila (frações 26 a 34); 5. etanol (fração 35).

As amostras foram solubilizadas em etanol (3 mg/mL, V_{apl} : 0,2 mL) e submetidas à análise com hexano/acetato de etila /etanol 5:4,5:0,5 tendo como revelador anisaldeído sulfúrico e ácido sulfúrico (110° C; 10 min). Para estas análises, foram utilizadas placas de sílica gel 60G (20 cm x 20 cm x 0,25 mm), ativadas a 110°C por 1 h.

Uma vez analisados os perfis das frações após o uso do revelador, elas foram agrupadas de acordo com a semelhança do perfil observado, sendo ele a coloração das manchas e o fator de retenção (R_f).

As frações 2 e 8 obtidas no 3.2CC foram submetidas a análise por HPLC-UV (1mg/mL, metanol/H₂O 80:20), em modo isocrático (metanol/H₂O 80:20, 20 min; coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 e 365 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL.

3.4 HPLC semi-preparativo das frações de 3.2CC

As frações 2 e 8 obtidas em 3.2CC foram definidas para injeção em HPLC semi-preparativo (10 mg/mL, metanol/H₂O 80:20). A condição de fase móvel para HPLC semi-preparativo foi escalonada a partir de informações obtidas por HPLC-UV utilizando uma coluna analítica Ace[®] C18 (250x4,6 mm; 5 µm; Injeção de 20 µL; λ=254 nm; vazão de 0,4 mL/min), em modo isocrático (metanol/H₂O 80:20, 30 min, fração 8; metanol/H₂O 85:15, 20 min, fração 2), V_{inj}: 20uL, tendo em vista as características da coluna, fase estacionária e fase móvel, sendo a vazão preparativa calculada segundo a relação abaixo:

$$F_p = \left(\frac{F_{an} \times d_p^2}{d_{an}^2} \right)$$

Onde:

F_p=vazão no modo semi-preparativo; F_{an}=vazão no modo analítico; d_p=diâmetro interno da coluna semi-preparativa; d_{an}=diâmetro interno da coluna analítica

A purificação foi realizada em cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] UV/Vis, acoplado a uma coluna semi-preparativa Agilent Eclipse XDB C-18 (250 mm x 21,20 mm; 7 µm), com vazão de 8,0 mL/min e detecção em 254 nm, na condição metanol/H₂O 85:15 por 15 min, para a fração 2, e metanol/H₂O 80:20 por 30 min para a fração 8; volume de injeção: 1 mL (10 injeções por amostra).

3.5 Precipitação na fração 3.2EFS e HPLC semi-preparativo

A fração 3.2 se mostrou parcialmente solúvel em hexano/acetato de etila 6:4 no momento de sua solubilização para o fracionamento em menor escala, dando origem a um precipitado de cor amarela.

O precipitado foi recolhido para análise em HPLC-UV. Para isto, 10 mg foram utilizados e intentados á solubilização em 1 mL de: metanol, metanol/H₂O 80:20, metanol/H₂O 80:20 (0,5 e 1% dietilamina), metanol/H₂O 80:20 (0,5 e 1% ácido acético), acetonitrila, acetonitrila/H₂O 80:20 (0,1% dietilamina). Por fim, a amostra

pode ser solubilizada em acetonitrila (0,1% dietilamina) para injeção em HPLC semi-preparativo.

A purificação foi realizada em cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis, acoplado a uma coluna semi-preparativa Agilent Eclipse XDB C-18 (250 x 21,20 mm; 7 µm), com vazão de 8,0 mL/min e detecção em 254 nm, na condição acetonitrila/H₂O 71:29 por 18 min; volume de injeção: 1 mL (12 injeções).

3.6 OLE-HPLC

Para a execução e montagem do sistema OLE-HPLC, foi utilizada coluna Ace® C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm), *holder* e coluna de guarda Phenomenex®, sílica C18 (Supelco® DSC) e planta seca e moída com granulometria padronizada em tamis 4. A coluna de guarda foi preenchida com 1,0 mg do material vegetal e seu volume completado com a sílica C18. Uma membrana de nylon (Phenomenex®) foi colocada na parte inferior da coluna de guarda e, após seu preenchimento, na parte superior (Figura 10).

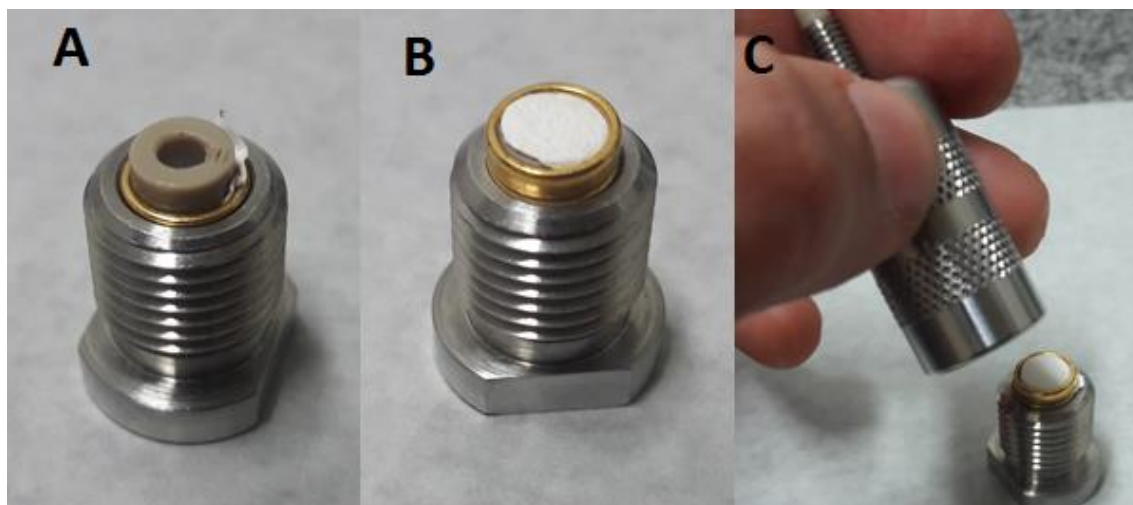


Figura 10 Membrana de nylon na parte inferior do *holder* e coluna de guarda vazia; B) coluna de guarda sobre o *holder*, preenchida com material vegetal e sílica C18 e membrana de nylon na parte superior; C) fechamento do *holder*. Fonte: arquivo pessoal.

O *holder* foi fechado e acoplado ao injetor sendo colocado diretamente na porta 4 e na porta 1, de modo que, ao ser acionada a posição *inject*, ocorresse a extração sólido-líquido, extração em fase sólida, filtração e análise concomitantemente (FERREIRA et al., 2016), conforme figura 11.

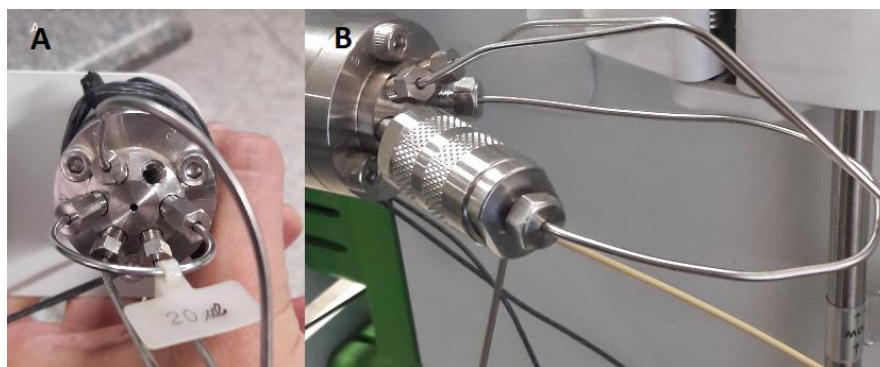


Figura 11 A) injetor sem acoplamento do *holder*; B) *holder* em substituição ao *loop* acoplado ao injetor. Fonte: arquivo pessoal.

O método de análise utilizado foi um gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 15 min; coluna Ace[®] C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m), λ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, e o volume de injeção de EEt (10 mg/mL) para comparação dos sistemas foi de 20 μ L.

Para o sistema OLE-UPLC, foi utilizado 0,5 mg de material vegetal seco e o holder foi acoplado diretamente a uma coluna Acquity UPLC[®]HSS T3 (2,1 x 100mm; 1,8 μ m). O método de análise utilizado foi composto por etanol e água acidificada, e seu desenvolvimento foi de acordo com o item 3.7.

3.7 Desenvolvimento de método em UPLC-UV (método convencional e OLE)

Com vistas ao uso de princípios da Química Verde, foi desenvolvido um método de análise para a erva-baleeira utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (UPLC -*Ultra High Performance Liquid Chromatography*). A UPLC utiliza os mesmos princípios de separação da HPLC, tais como a alta pressão e partículas de fase estacionária de pequeno diâmetro, porém, as partículas das colunas de UPLC possuem até 2 μ m, e a pressão gerada e suportada pelos equipamentos podem chegar, por exemplo, a 15000 *psi* (MALDANER et al, 2012), levando a análises mais eficientes e rápidas, contribuindo com a economia de energia e solvente, indo ao encontro da Química Verde. Para este trabalho, foi utilizado um UPLC Acquity[®] Waters, equipado com bomba quaternária, injetor automático, forno de coluna e detector no UV/Vis de comprimento de onda variável.

Para o desenvolvimento do método, foi considerado aquele desenvolvido em HPLC-UV por Faibicher (2021), cujas condições são: coluna ACE[®] C18 (250 x 4,6

mm, 5 μ m); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B), em modo gradiente: 35-42% B (0-20 min); 42-60% B (20-30 min); 60-70 % B (30-40 min); 70-100% B (40-70 min); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda em 254 nm.

Por ocasião da substituição do equipamento de HPLC por UPLC, de imediato houve a substituição da coluna analítica utilizada em HPLC por uma Acquity UPLC[®] HSS T3 C18 (2,1 x 100mm; 1,8 μ m). O modificador ou solvente orgânico de escolha foi o etanol (B), pois era desejável um método em Química Verde, variando-se os tempos de gradiente, vazão, temperatura do forno de coluna e força de eluição (ϵ). A água acidificada (A) foi mantida como um aditivo de fase móvel, para evitar a ionização dos componentes do extrato da erva-baleeira e o alargamento dos picos, tendo sido verificado o resultado com ácido acético e com ácido fórmico. Inicialmente, as condições foram definidas no método convencional, sem a presença do sistema OLE. As condições para as variáveis estudadas estão na tabela abaixo (Tabela 2). A condição inicial (método 1), foi determinado a partir do software HPLC Calculator v3.1 (GUILLARME et al, 2007; GUILLARME et al, 2008), tendo sido inseridas as condições iniciais do método de Faibicher (2021), em metanol. A partir da observação da resposta cromatográfica, houve a substituição por etanol e ajustes foram realizados no intuito de chegar à uma condição ideal.

Tabela 2 Condições cromatográficas avaliadas no desenvolvimento de método em UPLC-UV.

Método	Gradiente	Vazão mL/min	V _{inj} μ L	Temp. °C	Aditivo de fase aquosa
1	25-32% B (0-3 min), 32-60% B (3-5,5 min), 60-90% B (5,5-10 min), 90-100% (10-12 min), 100% B (12-15 min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
2	~~35-40%~~ B (0-3 min), ~~40-45%~~ B (3- ~~6~~ min), ~~45-50%~~ B (~~6-9~~ min), ~~50-55%~~ (9-12 min), ~~55-60%~~ (12-15 min), 100% B (~~15-22~~ min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
3	14- ~~31~~ % B (0-8 min), ~~31~~ -80% B (8- ~~20~~ min), 80-100% B (20-21 min), 100% (~~21-25~~ min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
4	14- ~~27~~ % B (0-8 min), ~~27~~ -80% B (8- ~~22~~ min), 80-100% B (22-23 min), 100% (~~23-25~~ min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
5	14- ~~23~~ % B (0-8 min), ~~22~~ -80% B (8- ~~23~~ min),	0,300	10	35	Ácido

	80-100% B (23-24 min), 100% (24-26 min).				acético 2%
6	14- 20 % B (0-8 min), 20 -80% B (8- 24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
7	14-20% B (0-8 min), 20-80% B (8-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min).	0,300	10	35	Ácido fórmico 0,1%
8	14- 17 % B (0-8 min), 17 -80% B (8- 23 min), 80-100% B (23-24 min), 100% (24-27 min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
9	17-33 % B (0-12 min), 33 -80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
10	17- 32 % B (0-12 min), 32 % B (12-18 min), 32-80 % B (18-28 min), 80-100% B (28-29 min), 100% (29-32 min).	0,300	10	35	Ácido acético 2%
11	17- 33 % B (0-12 min), 33-80 % B (12-24 min), 80-100 % B (24-25 min), 100% (25-28 min).	0,350	10	45	Ácido acético 2%
12	17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min).	0,350	5	45	Ácido acético 2%
13	17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min).	0,400	10	50	Ácido acético 2%
14	17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min).	0,400	5	50	Ácido acético 2%

Observação: destacadas em negrito e sublinhado as condições alteradas com relação ao método da linha anterior da tabela 2.

Além disso, foi desenvolvido um método para análise em OLE-UPLC, tendo sido utilizado como matriz 0,5 mg de planta seca e moída (droga vegetal). O método de escolha foi o 14, com modificações relativas ao tempo de gradiente, uma vez que os picos apresentados no cromatograma com o sistema OLE possuíam mais intensidade e se sobrepunham nas condições exatas do método 14. Portanto, para a análise por OLE-UPLC, as condições foram as seguintes: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min), vazão=0,400 mL/min, 50°C. Para a montagem do sistema OLE, foi acoplada à coluna o mesmo *holder* utilizado na análise por HPLC.

Os métodos em HPLC convencional, UPLC convencional e OLE-UPLC foram comparados do ponto de vista da Química Verde através da calculadora Agree (PENA-PAREIRA et al., 2020), que está disponível em <https://mostwiedzy.pl/AGREE>.

Esta métrica-*Agree*-permite que o operador atribua pesos a cada um dos 12 critérios avaliados de acordo com o seu princípio de maior interesse. Para o trabalho atual, por se desejar uma visão ampla sobre os métodos a fim de compara-los, os pesos foram mantidos em 2, para todos os critérios.

3.7.1 Validação do método em UPLC-UV

A validação parcial, que avaliou linearidade, precisão, exatidão, sensibilidade e seletividade, se deu com base nas normas estabelecidas pela ANVISA, através da Resolução RDC ANVISA n. 166/2017 (BRASIL, 2017), e considerou alguns parâmetros, sendo, portanto, considerada parcial. O padrão escolhido para a validação foi o ácido rosmarínico (Sigma Aldrich®), presente entre os componentes majoritários no extrato hidroetanólico (dados do grupo de pesquisa não publicados), e cedido pelo laboratório de Bioquímica Clínica (FCFAR/UNESP), sob responsabilidade do professor Dr. Iguatemy Brunetti. Os perfis cromatográficos foram tratados matematicamente, considerando as integrais da área do pico de interesse, para a montagem da curva analítica e quantificação do padrão no extrato hidroetanólico 70%. Os parâmetros avaliados foram:

- Seletividade: parâmetro que verifica a capacidade do método em identificar ou quantificar o composto de interesse dos demais, que podem ser impurezas, componentes de matriz ou produtos de degradação. O espectro no UV do pico do ácido rosmarínico foi analisado para verificar a pureza cromatográfica. Para este parâmetro, foi utilizado com UPLC-DAD para a obtenção do espectro no UV.

- Linearidade: através da linearidade, é demonstrada a capacidade do método de oferecer respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração do analito. Para este parâmetro, deve ser traçada uma curva analítica. Para a elaboração dessa, foi considerado um intervalo de concentrações entre 0,500 e 0,044 mg/mL de ácido rosmarínico.

- Precisão: avalia a proximidade e a concordância entre as replicatas. Através do desvio padrão das replicatas é possível ser determinado coeficiente de variação (CV%).

- Exatidão: verifica a proximidade entre os valores encontrados. Foi avaliada como o erro padrão relativo das replicatas.

- Sensibilidade: determinada a partir do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ), ou seja, menor quantidade a ser detectada do analito na amostra e menor quantidade do analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão. Pode ser determinada por razão sinal-ruído, ou, al qual nesse trabalho, matematicamente através de parâmetros da curva de calibração (intercepto com o eixo x e coeficiente angular).

4 Determinação estrutural dos metabólitos secundários

4.1 Ressonância Magnética Nuclear

Para análise estrutural de metabólitos secundários purificados, os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de ^1H foram obtidos a 300 MHz para ^1H em um espectrômetro Bruker® Fourier 300 (7,0 T). Utilizou-se CDCl_3 como solvente e TMS como referência interna. As amostras foram analisadas na concentração de 10 mg/mL.

5 Determinação de açúcares redutores com DNS

Monossacarídeos como a glicose ou a frutose e alguns dissacarídeos como a maltose são chamados açúcares redutores pela presença de grupos carbonílicos ou cetônicos livres que podem ser oxidados, em meio básico, diferentemente dos açúcares não redutores que precisam sofrer hidrólise para que oxidem, à exemplo da sacarose (frutose+glicose). Foi realizado o teste para determinação de açúcares redutores com DNS (3-5'-dinitroalíclico) segundo a metodologia de Miller (1959), a fim de verificar a presença deles e, em caso positivo, verificar a possibilidade de interferirem nos ensaios antioxidantes.

Para a elaboração da curva analítica foi utilizada glicose (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 mg/mL) e um volume fixo de DNS em cada tubo de ensaio (0,5 mL). Os tubos foram colocados em banho fervente por 5 min, resfriados em gelo e o volume completado com água. As absorbâncias foram medidas em 540 nm. Para a glicose, os extratos e o branco (DNS e ausência de glicose) as leituras foram realizadas em triplicata. Os extratos foram analisados na concentração de 1,0 mg/mL.

6 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos 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 colaboradores (1999). As absorbâncias das amostras foram medidas em 760 nm em espectrofotômetro UV/Vis de cubetas. Ambos extratos foram solubilizados em etanol e para a análise tinham a concentração de 25,0 µg/mL. 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.

7 Ensaio de embriotoxicidade em zebrafish

Os peixes machos e fêmeas foram mantidos em aquário com temperatura controlada ($28 \pm 0,5^\circ \text{C}$) com ciclo de 14 h de luz e 10 h de escuro. Os embriões foram coletados e postos em meio embrionário (NaCl 10 mM, KCl 0,34 mM, 0,66 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,66 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) suplementado com 0,00003% de azul de metileno, e transferidos para placas de 96 poços, contendo 2 embriões cada poço a ser utilizado. As análises dos extratos foram realizadas nas concentrações de 50,0, 100,0 e 200 µg/mL. As placas foram incubadas a 28°C e os fenótipos de malformação observados após 24, 48 e 72 horas pós fecundação (OCDE, 2013). Foram realizados dois ensaios independentes (SINGULANI et al., 2018).

8 Atividade antioxidante

8.1 Ensaio com DPPH

O ensaio foi realizado segundo descrito por Sharma e Bhat (2009) e com alterações, tendo-se utilizado 30 µL de solução de DPPH[•] em etanol (620 µM), e o volume tendo sido completado para 300 µL com amostras e controles em placas de 96 poços. A absorbância decorrente do reagente, das cores dos extratos, mistura e substâncias foi descontada dos valores obtidos nos ensaios (branco). Foram utilizadas diferentes concentrações de EEt (15,0, 25,0, 35,0, 50,0, 55,0 µg/mL),

EEtOH (5,0, 10,0, 18,0 25,0 e 35,0 µg/mL), Ppt, (11,0, 15,0, 20,0, 25,0, 35,0 e 40,0 µg/mL), substância 1 e substância 2 (11,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0 e 45,0 µg/mL), substância 3 e substância 4 (70,0, 110,0, 150,0, 180,0, 200,0, 300,0 µg/mL), solubilizados em etanol, tendo sido este utilizado como branco da reação, e sua absorbância descontada das leituras das amostras. A amostra Ppt era composta por substância 1 + substância 2. Como controle positivo foi utilizada quercetina (1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 4,5 µg/mL) por se tratar de um flavonoide com antioxidante descrita na literatura.

A leitura das absorbâncias foi feita em 517 nm em leitor de placas. As leituras foram realizadas em triplicata e foram computadas as médias das absorbâncias de cada concentração, sendo a porcentagem de captura do radical DPPH calculada tendo por base o controle (MOLYNEUX, 2004).

8.2 Ânion radicalar superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

Este ânion é formado pela reação entre o metassulfato de fenazina (PMS) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e 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. O experimento foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3; 25 mmol/L), contendo PMS (372 µmol/L), NBT (600 µmol/L), NADH (1.560 µmol/L) e diferentes concentrações dos extratos (100,0, 150,0, 200,0, 250,0 e 300,0 µg/mL) e da quercetina (controle positivo; 10,0, 20,0, 30,0, 50,0, 70,0, 85,0,0 e 100,0 µg/mL). Para os extratos foram utilizados: 25,0, 100,0, 150,0, 250,0, 280,0 e 300,0 µg/mL; Ppt: 25,0, 100,0, 150,0, 250 e 300 µg/mL; substância 1 e substância 2: 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0 e 350 µg/mL.

Foi utilizado tampão pirofosfato de sódio (pH 8,3) e como branco da reação foram utilizados o tampão, PMS, NBT e água, completando o volume de 300 µL. 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). Moléculas que agem como antioxidantes interagem com o radical e inibem a produção de formazana, que tem coloração púrpura (ALVES et al., 2010)

8.3 HOCl/OCI-

Por este ensaio a capacidade antioxidante se relaciona a habilidade do analito em capturar o HOCl de tal forma que ele impeça a oxidação do TMB, fenômeno que gera um cromóforo azul com absorbância máxima em 655 nm. 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 absorbância obtido e de sua absorvidade 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. As concentrações utilizadas para os extratos foram 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$, para PPT 0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 4,5 $\mu\text{g/mL}$, para substância 1 e substância 2 foram 0,5, 1,0, 3,0, 5,0, e 7,0 $\mu\text{g/mL}$, e, para o padrão quercetina foram utilizadas concentrações equivalentes a 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 $\mu\text{g/mL}$, solubilizados em etanol. O ensaio foi realizado em microplaca com 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 as concentrações equivalentes aos 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 absorbância foram realizadas em triplicata em 652 nm e a partir da média de cada concentração, foi calcula a porcentagem de captura do HOCl.

9 Atividade anti-inflamatória

9.1 Inibição da atividade de cicloxigenase 1 e cicloxigenase 2 através de ensaio *in vitro*

Para esta análise, foi utilizado o *Kit Cox (ovine) Inhibitor Screening Assay* (Cayman Chemical® - item nº 560101), de acordo com protocolo do fabricante (CAYMAN 2017a). O princípio deste ensaio é medir a PGF2 α por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando um anticorpo de ampla ligação a prostaglandinas. A base do ensaio é a competição pelo anticorpo entre prostaglandina com uma quantidade limitada de prostaglandina conjugada com

acetilcolinesterase. A quantidade de prostaglandina conjugada que se liga ao anticorpo é inversamente proporcional a concentração de prostaglandina no poço da placa. As amostras avaliadas foram substância 1 e substância 3, nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL tendo sido preparada uma solução estoque de 10 mg/mL, em DMSO. Como controle positivo, foi utilizado o diclofenaco (296,14 g/mol). Foram realizados 2 experimentos independentes, e com as amostras em triplicata. Foram utilizados 10 µL das amostras e do veículo, e diluídos em Tris-HCl 0,1M (pH8,0), e incubados a 37°C com a enzima, por 15 min, antes da adição do ácido araquidônico (AA). A adição do AA 10mM deu início a reação, que durou 2 min e se deu a 37°C, sendo encerrada com a adição de HCl 1N e cloreto de estanho. O reagente de Ellman's foi adicionado sendo substrato para a acetilcolinesterase. Uma alíquota do sobrenadante foi recolhida e o prostanóide quantificado em espectrofotômetro (412 nm).

9.2 Inibição da atividade da fosfolipase A2 do grupo V recombinante humana (sPLA₂) através de ensaio *in vitro*

Para este ensaio, foi utilizado o *Kit sPLA₂ (type V) Inhibitor Screening Assay* (Cayman Chemical® - item nº 10004883), de acordo com o fabricante (CAYMAN 2017b). As amostras avaliadas foram substância 1 e substância 3, nas concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL e 10,µg/mL, dissolvidas em DMSO (10 mg/mL). O controle positivo utilizado foi fosfatidilcolina tio éster. Foram utilizados 10 µL das amostras e do veículo, e incubados com Tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo 10 µL da enzima. A reação tem início com a adição de diheptanoiltiofosfatidilcolina 1,66 mM, e incubação a 25°C por 15 min. A seguir, a reação é parada pela adição de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB). PLA2 reage quebrando ligações do diheptanoiltiofosfatidilcolina, formando produtos que reagem com o DNTB e dão origem ao ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, detectado a 412 nm. Como controle positivo foi utilizado a tioeteramida fosfatidilcolina.

10 Resultados e discussão

10.1 Seleção da fração de EEt utilizada para a obtenção das substâncias purificadas.

A fração selecionada para o começo do atual estudo foi a 3.2, obtida por Pereira (2017) a partir do fracionamento do EEt, através de EFS (vide Materiais e Métodos, item 3.3) por apresentar perfil em HPLC-UV semelhante ao do extrato e conter os metabólitos secundários majoritários do extrato (figura 12).

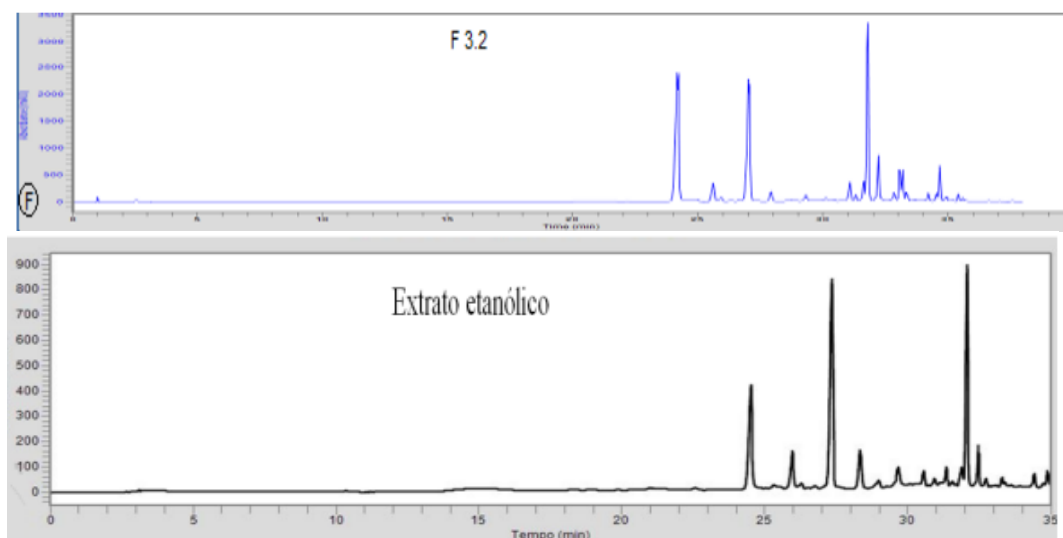


Figura 12 Cromatogramas em HPLC-UV (gradiente exploratório) da fração 3.2 e EEt. Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna Thermo Scientific® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L (Fonte: PEREIRA 2017).

10.1.1 Cromatografia em coluna

A figura abaixo (figura 13) traz as cromatoplasmas do fracionamento de 3.2EFS. Ao total, 45 frações foram recolhidas (rendimento: 56,7%). O maior rendimento foi atingido com a fração 43 (12,4%) e o menor com a fração 37 (1,4%). As frações foram agrupadas de acordo com suas semelhanças químicas observadas por CCD (cor e R_f). Entre as frações 6 e 14 nota-se a presença de manchas amarelas, provavelmente flavonoides, e a partir de então é observada a presença de manchas púrpuras, possivelmente indicando a presença de terpenos, após uso do revelador anisaldeído sulfúrico. Os colchetes agrupam as amostras coletadas com cada eluente.

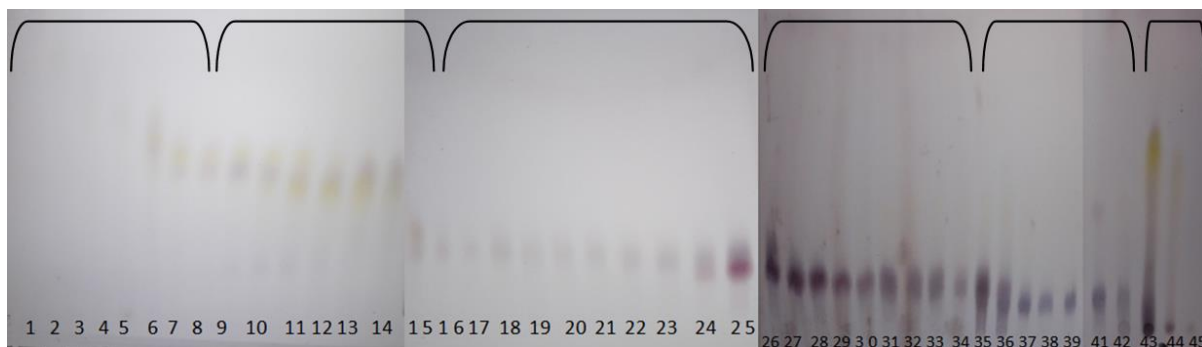


Figura 13 Cromatoplaça de 3.2CC. Fase estacionária: sílica gel. Fase móvel: Hex/AcOEt/EtOH 5:4,5:0,5 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

Do fracionamento 3.2CC foram obtidas 36 frações, agrupadas em 12 segundo a semelhança do perfil químico obtido por CCD (cor das manchas na placa e R_f , figura 14).

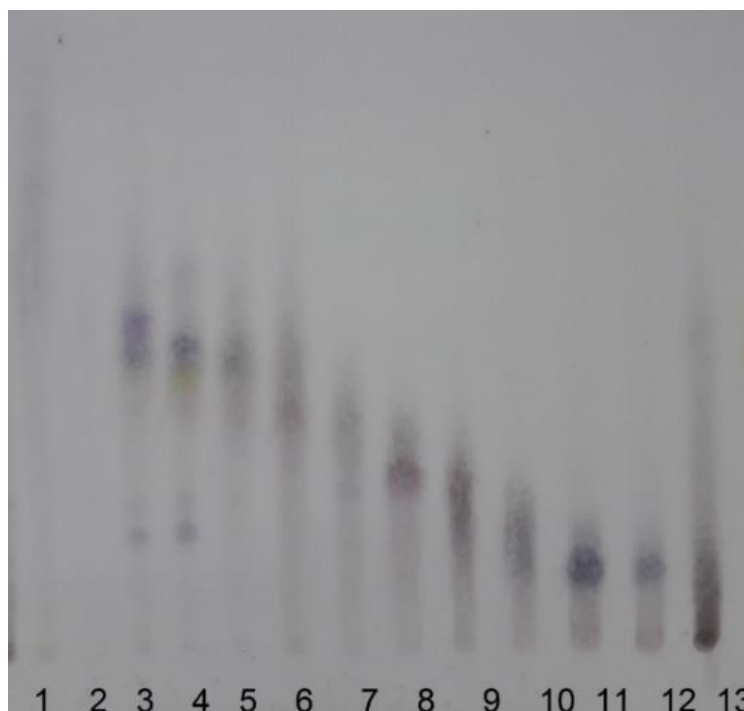


Figura 14 Cromatoplaça de 3.2CC com as frações já agrupadas. Fase estacionária: sílica gel. Fase móvel: Hex/AcOEt/EtOH 5:4,5:0,5 (v/v). Revelador: anisaldeído sulfúrico.

O rendimento do processo foi 62,4% e as massas das frações reunidas, bem como o modo como foram agrupadas, encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 Massa(mg) das frações coletadas em 3.2CC

Frações agrupadas	Número da amostra	Massa (mg)
----------------------	----------------------	---------------

1 a 5	1	78,0
6 a 8	2	190,2
9 e 10	3	5,2
11 a 13	4	32,1
14 e 15	5	78,3
16 a 20	6	88,9
21 a 25	7	55,8
26	8	89,0
27 e 28	9	49,1
29 a 31	10	30,7
32 e 33	11	15,6
34 a 36	12	67,2

As frações reunidas 1, 2, 3, 6 e 8, obtidas de 3.2CC, foram analisadas por HPLC-DAD (figura 15, figura 16). Os perfis químicos de 2 e 8 (figura 16) deram ensejo a realização de HPLC preparativo, devido também aos valores de massa disponíveis.

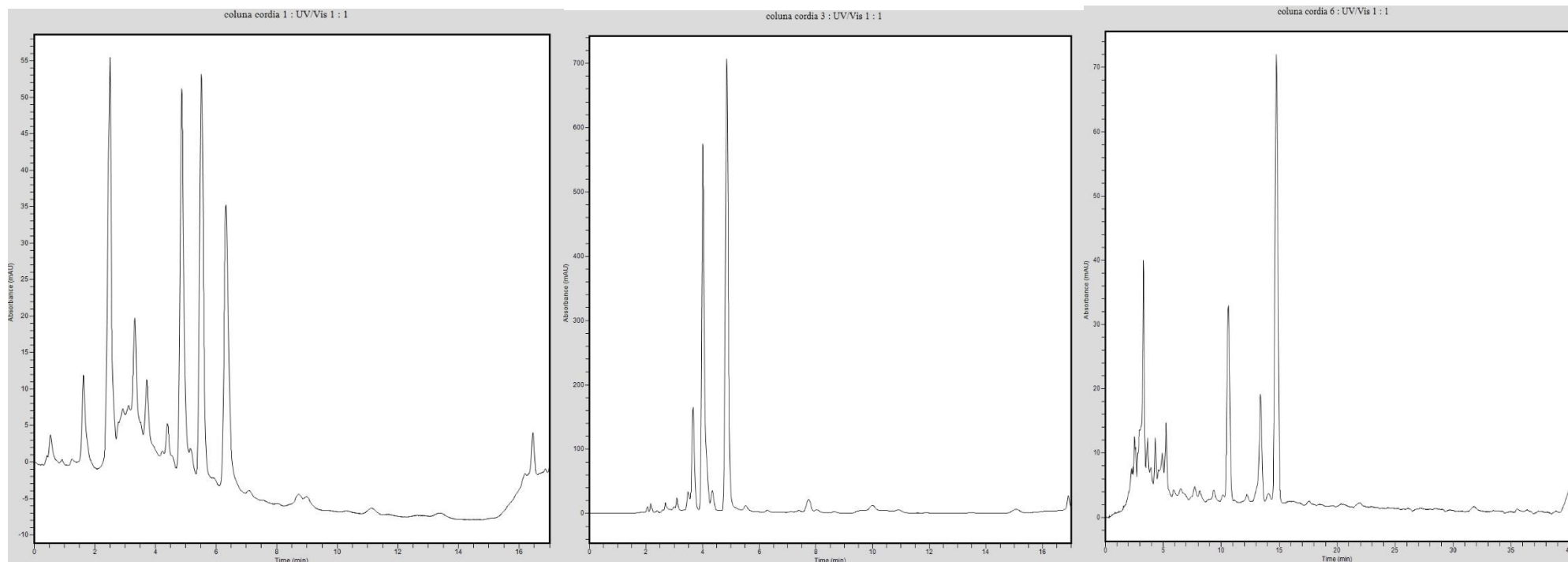


Figura 15 Cromatogramas em HPLC-DAD/UV-Vis das frações 1, 3 e 8, respectivamente, obtidas por 3.2CC. Modo isocrático: MeOH/H₂O 80:20, 20 min; coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20µL, cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] PDA.

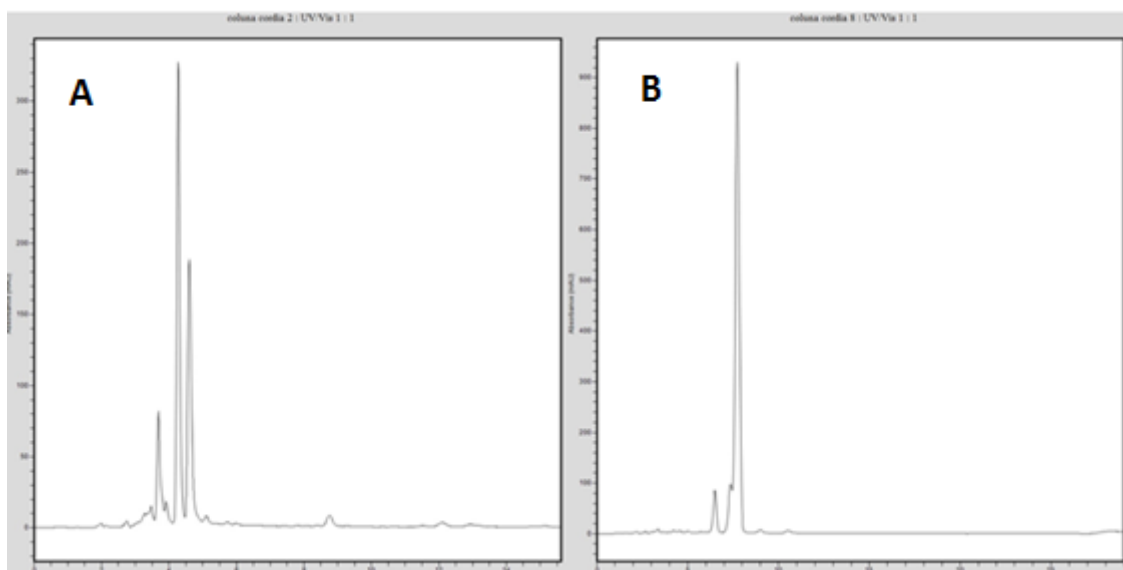


Figura 16 Cromatogramas em HPLC- DAD/UV-Vis das frações 2 e 8, respectivamente, obtidas por 3.2CC. Modo isocrático: MeOH/H₂O 80:20, 20 min; coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ= 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20uL, cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] PDA.

10.1.2 HPLC semi-preparativa

Através de otimização da resolução por HPLC-UV analítica foram definidas as condições de HPLC semi-preparativo para as frações 2 e 8 (Figura 17A e figura 17B).

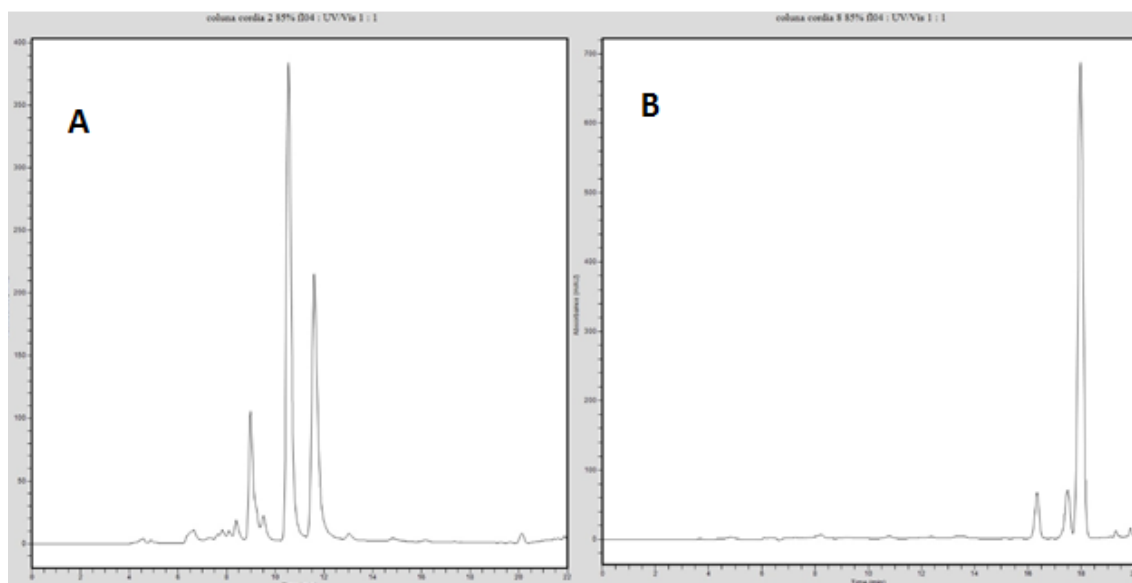


Figura 17 Cromatogramas em HPLC-UV das frações 2 (A) e 8 (B), obtidas por 3.2EFS2. Modo isocrático: MeOH/H₂O 85:15 (A) e 85:15 (B); coluna Ace[®] C18 (250 x

4,6 mm; 5 μ m), λ = 254 nm, vazão de 0,4 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis.

Após a definição das condições para o HPLC preparativo, foi injetado 1 mL das amostras na concentração de 10 mg/mL, sendo realizadas diversas injeções, sendo coletados juntos os picos com mesmo t_R das diferentes injeções.

As frações recolhidas foram analisadas por HPLC-UV e HPLC-DAD. A partir da fração 8 foram recolhidas 3 frações: 8p1 (figura 18A), 8p2 (figura 18B) e 8p3 (figura 18C).

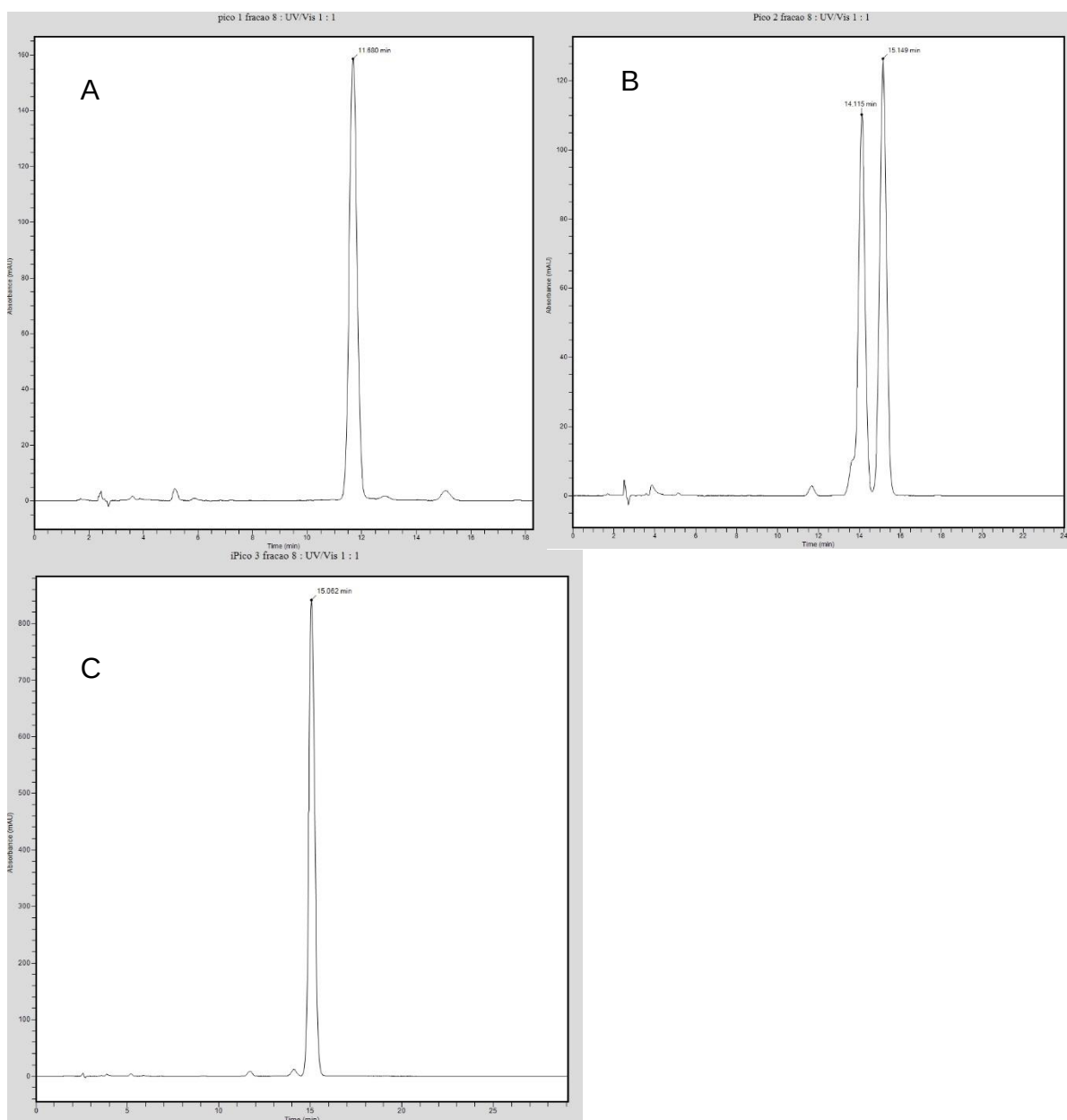


Figura 18 Cromatogramas em HPLC-UV de 8p1 (A), 8p2 (B) e 8p3 (C), obtidos por cromatografia preparativa a partir da fração 8. Modo isocrático: MeOH/H₂O 80:20 (A);

coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), λ = 254 nm, vazão de 1 mL/min, volume de injeção de 20 μ L, cromatógrafo Perkin Elmer[®] Flexar[®] UV/Vis.

Não foi realizado o processo semi-preparativo para a fração 2. As massas de 8p1 (substância 3) e 8p3 (substância 4) foram, respectivamente 7,9 mg (91% de pureza) e 5,0 mg (97% de pureza). A pureza foi avaliada em HPLC-UV em 254 nm por normalização de áreas dos picos.

10.1.3 Isolamento de substância por precipitação

No momento de preparo da fração 3.2 para o primeiro fracionamento houve dificuldade em sua solubilização em Hex/AcOEt 6:4, pois se observava a precipitação de um pó amarelo no fundo do frasco. Este precipitado foi recolhido e na análise por HPLC-UV apresentou perfil com 2 picos cromatográficos majoritários, o que era desejável para purificação (Figura 19), e com t_R de 29,77 min e 39,72 min.

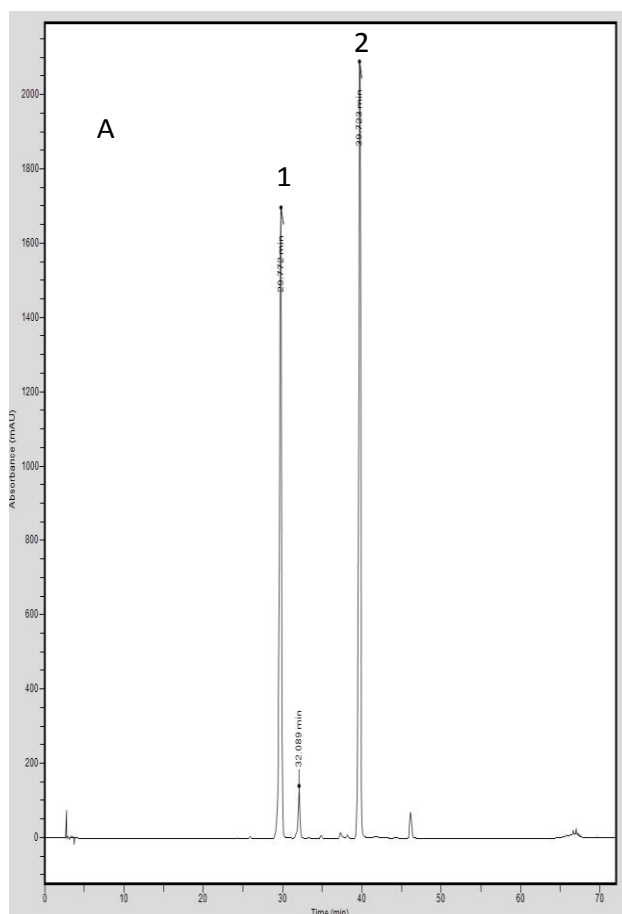


Figura 19 Cromatograma em HPLC-UV do precipitado em Hex/AcOEt 6:4 da fração 3.2 Condições de análise: 0-10': 6 a 20%; 10-13': 20 a 35%; 13-60': 35 a 68%; 60-62': 68 a 100%; 62-70': 100% acetonitrila; coluna: Ace[®] C18 (250x4.6mm; 5 μ m); Injeção de

20 μ L; λ -254 nm; vazão de 1,0 mL/min. Preparo de amostra em: ACN (0,1% dietilamina), cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis.

Com base nos resultados obtidos, procedeu-se a HPLC-preparativa para a obtenção dos componentes da amostra precipitada.

10.1.3.1 HPLC semi-preparativo com o precipitado

O perfil cromatográfico obtido em HPLC-UV com a análise do precipitado de 3.2 antes da transposição para um sistema semi-preparativo está ilustrado na figura 20. A condição isocrática acetonitrila/H₂O (71:29), 0,4 mL/min, foi a que apresentou melhor resolução cromatográfica considerando a diferença nos t_R dos compostos que se desejava isolar.

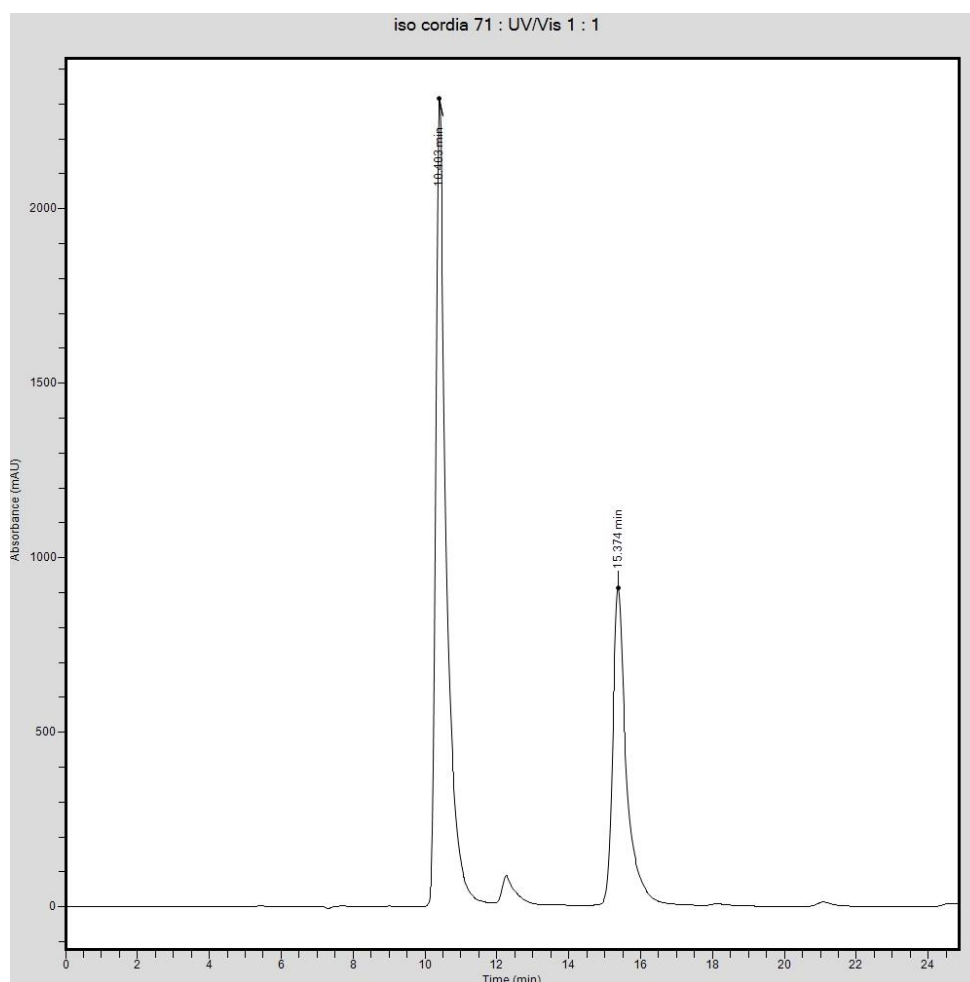


Figura 20 Cromatograma em HPLC-UV da porção insolúvel da fração 3.2. Modo isocrático: ACN/H₂O 71:29; coluna Ace® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), λ = 254 nm, vazão de 0,4 mL/min, volume de injeção de 20 μ L. Cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis.

A injeção nas condições de sistema preparativo (figura 21) permitiu a obtenção de 2 substâncias, sendo substância 1 ($t_R=5,89$ min) com 97% de pureza (HPLC-UV; 254 nm) e massa de 30 mg, e substância 2 ($t_R=12,98$ min) com 99% de pureza e 19 mg de massa (HPLC-UV; 254 nm).

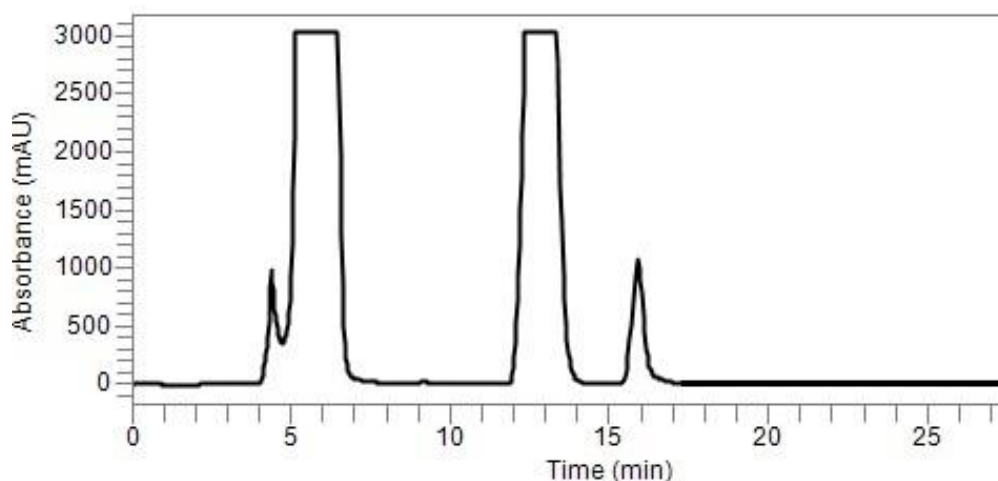


Figura 21 Cromatograma em HPLC-UV da porção insolúvel da fração 3.2. Modo isocrático: ACN/H₂O 71:29; coluna semi-preparativa Agilent Eclipse XDB C18 (250x 21,20 mm; 7 μ m), λ = 254 nm, vazão de 8 mL/min, volume de injeção de 1 mL. Cromatógrafo Perkin Elmer® Flexar® UV/Vis.

10.4 Determinação estrutural

10.4.1 Substâncias 3 e 4

As substâncias 3 e 4 apresentavam-se na forma de pó branco. Os dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da substância 3, identificada como cordialina A (figura 22), bem como os dados prévios para esta substância da literatura (VELDE; LAVIE, 1982; PEREIRA, 2017), estão na tabela 4 (Apêndices 7, 8 e 9). A identificação das substâncias foi realizada também com base nas correlações observadas nos experimentos de COSY, HMQC e HMBC, além dos dados do experimento DEPT.

Tabela 4 Dados espectrométricos de RMN obtidos para a cordialina A (substância 3) em 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^{**}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ J(Hz)*	$\delta^1\text{H}$ J(Hz)**	$\delta^1\text{H}$ J(Hz)
1	29,8 t	29,9 t	3,12 td (12,5; 6,0)	3,11 td (12,7; 5,9)	3,11 td (12,6; 5,9)
2	37,8 t	37,8 t	nd	nd	nd

3	98,7 s	98,3 s	-	-	-
4	36,1 s	37,2 s	-	-	-
5	50,9 d	50,8 d	nd	1,31 dl (3,3)	-
6	19,4 t	19,3 t	nd	1,67 dd (12,3; 3,3)	nd
7	34,3 t	34,2 t	nd	nd	nd
8	39,9 s	37,8 s	-	-	-
9	50,0 d	50,2 d	nd	1,56 d (11,0)	1,57 d
10	41,0 s	-	nd	nd	nd
11	70,5 d	70,9 d	3,65 td (10,5; 4,2)	3,65 td (11,0; 3,9)	3,66 td (11,3; 4,1)
12	36,9 t	37,2 t	nd	1,85 td (11,2; 3,9)	1,85 td (11,3 3,7)
13	44,8 d	44,9 d	nd	nd	nd
14	49,0 s	48,9 s	-	-	-
15	31,7 t	31,6 t	nd	nd	nd
16	27,9 t	26,3 t	nd	nd	nd
17	51,5 d	50,8 d	2,40 td (11,0; 6,0)	2,38 td (10,5; 5,7)	nd
18	15,4 q	15,7 q	0,95s	0,95s	0,94s
19	67,8 t	67,8 t	α -H 4,15 dd (8,5; 0,7) β -H 4,32 dd (8,5; 2,0)	4,15 dd (8,5;1,0) 4,31 dd (8,5; 2,5)	4,16 dd (8,5; 1,1) 4,32 dd (8,5; 2,3)
20	164,8 s	164,2 s	-	-	-
21	17,3 q	17,1 q	2,21 sl	2,11 sl	2,12 sl
22	120,4 d	120,3 d	6,28 sl	6,27 sl	6,27 sl
23	195,7 s	195,6 s	-	-	-
24	66,4 d	66,3 d	3,34 s	3,33 s	3,32 s
25	61,2 s	60,9 s	-	-	-
26	24,9 q	24,9 q	1,42 s	1,42 s	1,41 s
27	18,6 q	18,7 q	1,27 s	1,26 s	1,24 s
28	26,4 q	26,3 q	1,03 s	1,03 s	1,04 s
29	18,8 q	18,6 q	1,01 s	1,00 s	1,00 s
30	16,8 q	16,8 q	0,90 s	0,90 s	0,90 s

* VELDE & LAVIE (1982); ** PEREIRA (2017). nd não determinado.

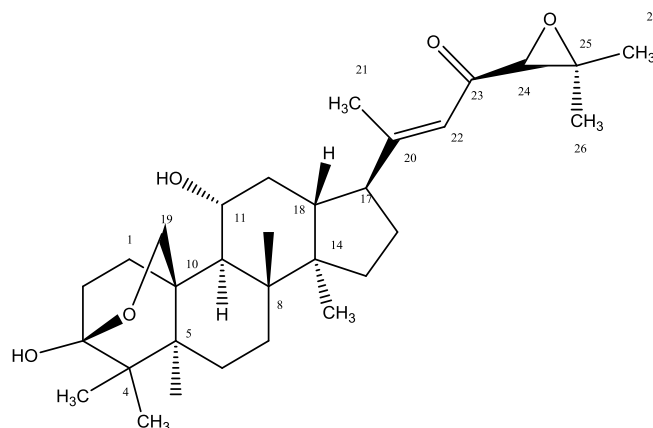


Figura 22 Estrutura química do triterpeno cordialina A (substancia 3).

A substância 4, por comparação dos t_R em análise por HPLC-UV em modo reverso (ordem de retenção) e dados de RMN de ^1H com o trabalho de Pereira (2017), foi identificada como (*Z*)-cordialina A (figura 23), que difere estruturalmente da cordialina A na configuração da ligação dupla em C-20(*Z*). Os dados encontram-se na tabela abaixo (Tabela 5). Os dados de RMN de ^{13}C não são apresentados porque o arquivo foi danificado e não houve possibilidade de repetição do experimento por falta de substância.

As diferenças nos valores de δ dos sinais de RMN de ^1H entre a cordialina A e a (*Z*)-cordialina A foram observadas para H-17, H-21 e H-22, sendo coerentes com a diferença na configuração da ligação dupla em C-20. Pereira (2017) observou diferenças também nos valores de δ para C-17, C-21 e C-22 entre as substâncias e confirmou a configuração em C-20 da (*Z*)-cordialina A através da observação do efeito nuclear Overhauser (espectro NOE1D) entre H-21 e H-22, demonstrando sua proximidade espacial.

Tabela 5 Dados espectrométricos de RMN obtidos para a (Z)-cordialina A (substancia 4) em 300 MHz para ^1H , em CDCl_3 .

	$\delta^1\text{H}$ J(Hz)**	$\delta^1\text{H}$ J(Hz)
1	2,15 m	2,13 m
2	nd	nd
3	-	-
4	-	-
5	nd	nd
6	nd	nd
7	nd	nd
8	-	-
9	1,59 s	1,59 s
10	nd	nd
11	3,61 td (10,6; 4,1)	3,34 td
12	3,12 td (13,4; 5,8)	3,13 td (13,1; 5,5)
13	4,12 d (7,0)	4,16 d (7,0)
14	-	-
15	nd	nd
16	nd	nd
17	1,84 m	1,89 m
18	0,95 s	0,95 s
19	4,17 dd (8,5;1,2) 4,31 dd (8,5; 2,4)	4,18 dd (8,5; 1,1) 4,34 dd (8,5 2,3)
20	-	-
21	1,87 d (1,0)	1,89 d (1,1)
22	6,29 d (1,1)	6,28 d
23	-	-
24	3,33 s	3,33 s
25	-	-
26	1,42 s	1,43 s
27	1,01 s	1,05 s
28	1,02 s	1,02 s
29	1,25 s	1,26 s
30	0,94 s	0,95 s

** PEREIRA 2017. nd não determinado.

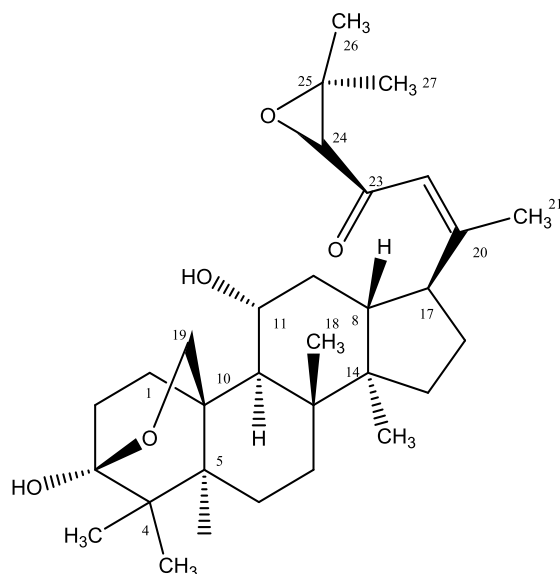


Figura 23 Estrutura química do triterpeno (*Z*)-cordialina A (substancia 4).

10.4.2 Substancia 1 e substancia 2

Abaixo estão os dados de RMN de ^1H e ^{13}C das duas substâncias que compunham o pó amarelo que precipitou (Tabelas 6 e 7) que foram identificadas como flavonas polimetoxiladas (apêndices 6, 7, 8 e 9).

Os dados de RMN para a substância 1 são coerentes com um esqueleto flavonoídico do tipo aglicona ($\text{C}_6\text{C}_3\text{C}_6$) pentametoxilado, apresentando 20 sinais no espectro de RMN de ^{13}C , sendo cinco referentes a metoxilas (Tabela 6). A substância foi identificada como 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona devido a impossibilidade de atribuir a posição do grupo hidroxila em C-4' ou C-2' do esqueleto flavonoidico, mesmo problema apresentado por Pereira (2017) que também isolou e identificou esta substância do mesmo extrato. Inuma (1986) identificou a substância 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona, sintetizada em laboratório, e relatou a dificuldade em elucidar algumas estruturas de flavonoides pela presença de muitos grupos oxigenados.

Tabela 6 Dados espectrométricos de RMN obtidos para 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona ou 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona (sustância 1) em 300 MHz para ^1H e em 75 MHz para ^{13}C , em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^*$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H J(Hz)}^*$	$\delta^1\text{H J(Hz)}$
2	156,1 s	156,08 s	-	-
3	136,7 s	136,6 s	-	-
4	177,6 s	177,5 s	-	-
5	152,9 s	152,7 s	-	-
6	132,6 s	132,5 s	-	-
7	159,2 s	159,03 s	-	-
8	90,8 d	90,7 s	6,51 s	6,51 s
9	153,0 s	152,9 s	-	-
10	106,5 s	106,8 s	-	-
1'	108,8 s	108,8 s	-	-
2'	154,0 s	153,9 s	-	-
3'	103,1 d	103,2 d	6,62 s	6,63 s
4'	151,3 s	151,1 s	-	-
5'	143, 7 s	144,1 s	-	-
6'	111, 0 d	111,0 d	7,10 s	7,11 s
OMe	62,3 q	62,1 q	3,88 s	3,89 s
OMe	61,0 q	61,0 q	3,92 s	3,93 s
OMe	56,2 q	56,1 q	3,96 s	3,97 s
OMe	56,5 q	56,4 q	3,93 s	3,93 s
OMe	56,8 q	56,7 q	3,93 s	3,92 s
4'ou 2'OH	-	-	7,89 s/	7,89 s/
5 OH	-	-	12,36 s	12,38 s

*PEREIRA, 2017.

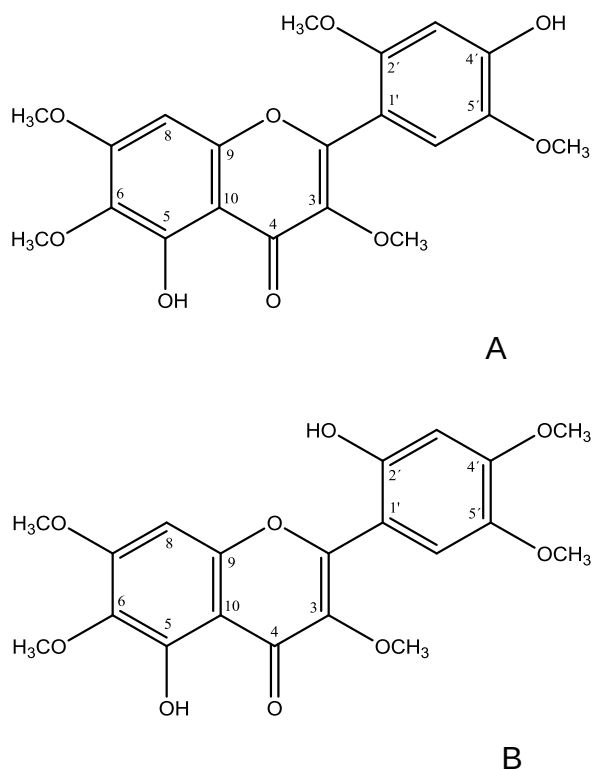


Figura 24 Estruturas químicas de 4',5-dihidroxi-2',3,5',6,7-pentametoxiflavona (A) e 2',5-dihidroxi-3,4',5',6,7-pentametoxiflavona (B), substancia 1.

A substância 2 foi identificada como a artemetina ou 5-hidróxi-3,3',4',6,7- pentametoxiflavona, já identificada por Pereira (2017), Sertie (1990, 1991), Ticli (2005) e Michielin (2011). Para o composto substancia 2, os dados de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos encontram-se na tabela 7. Os dados também são coerentes com um esqueleto flavonoídico do tipo aglicona pentametoxilado, sendo que no espectro de RMN de ^1H os sinais com valores de δ de 3,89, 3,92, 3,92, 3,93 e 3,97 se referem aos hidrogênios das metoxilas.

Tabela 7 Dados espectrométricos de RMN obtidos para artemetina (substancia 2) em 300 MHz para ^1H e para ^{13}C , em CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}^{**}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H } J(\text{Hz})^*$	$\delta^1\text{H } J(\text{Hz})^{**}$	$\delta^1\text{H } J(\text{Hz})$
2	155,2 s	155,9 s	-	-	-
3	138,0 s	138,8 s	-	-	-
4	178,9 s	178,9 s	-	-	-
5	152,3 s	152,3 s	-	-	-
6	132,5 s	132,3 s	-	-	-
7	158,8 s	158,7 s	-	-	-
8	90,4 d	90,3 d	6,67 s	6,51 s	6,51 s
9	152,8 s	152,8 s		-	-
10	160,6 s		-	-	-
1'	122,9 s	122,9 s	-	-	-
2'	110,9 s	110,8 s	-	-	-
3'	148,8 d	148,8 d	6,43 s	6,62 s	6,63 s
4'	151,5 s	151,4 s	-	-	-
5'	111,4 s	111,3 s	-	-	-
6'	122,2 d	122,1 d	6,94s	7,10 s	7,11 s
OMe	60,1 q	60,2 q	3,79 s	3,88 s	3,89 s
OMe	60,8 q	60,9 q	3,80 s	3,92 s	3,93 s
OMe	56,3 q	56,3 q	3,81 s	3,96 s	3,97 s
OMe	56,3 q	56,3 q	nd	3,93 s	3,93 s
OMe	56,3 q	56,3 q	nd	3,93 s	3,92 s
5 OH	-	-	-	12,36 s	12,38 s

*MARTINEZ et al, 1987; ** PEREIRA 2017. nd não determinado.

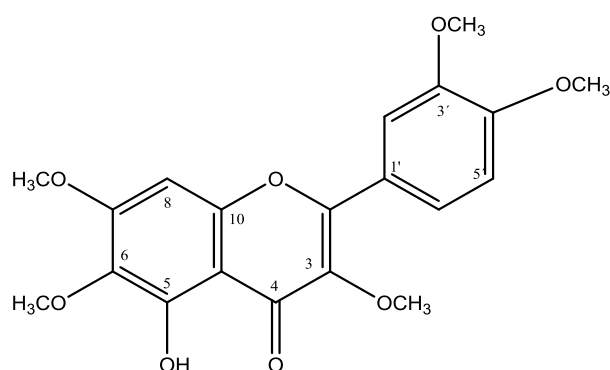


Figura 25 Estrutura química da artemetina (5-hidróxi-3,3',4',6,7- pentametoxiflavona), substancia 2.

10.5 Determinação do teor de açúcares redutores em EEtOH e EEt

O teste para determinação de açúcares redutores com DNS (3-5'-dinitroalicílico) foi proposto no intuito de verificar a possibilidade de interferência destas substâncias nos ensaios de Folin-Ciocalteu e DPPH'. A partir da construção da curva analítica para determinação de açúcares redutores utilizando a glicose (figura 26), foram realizadas as leituras, a 540nm, em triplicata, dos extratos.

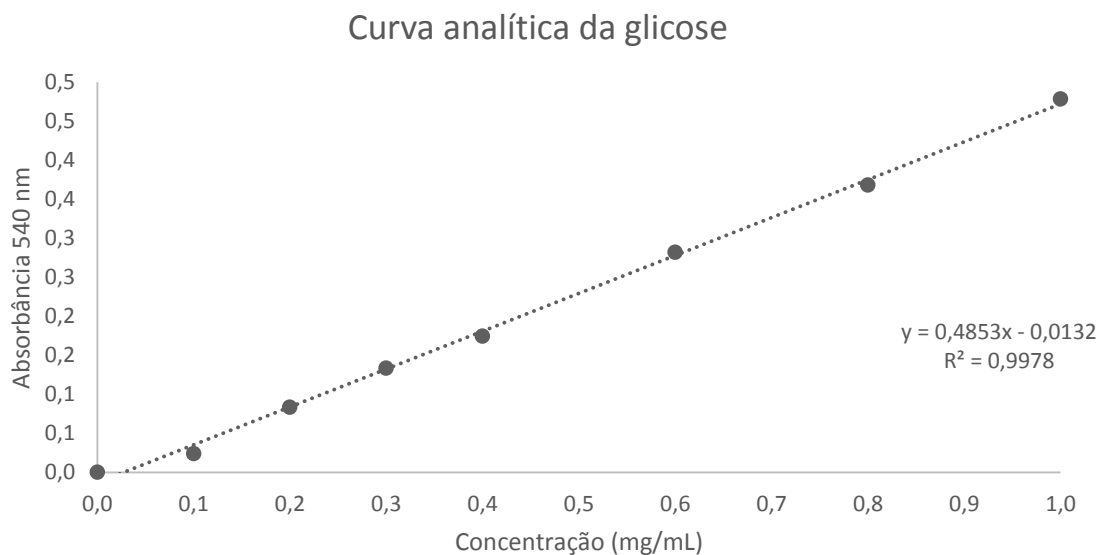


Figura 26 Curva analítica obtida com a glicose para a determinação de açúcares redutores, utilizando DNS.

Os valores encontrados para a glicose nos extratos (tabela 8) foram muito baixos e inferiores às menores concentrações de glicose (0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,6, 0,8 mg/mL), estando fora da curva elaborada (valores abaixo do limite de quantificação). Desta forma, pode ser inferido que a quantidade de açúcares redutores presente nos extratos não é capaz de interferir de modo a criar resultados falso-positivos com relação a atividade de interesse.

Tabela 8 Leituras, em triplicata, das absorbâncias a 540 nm dos extratos de *C. verbenacea* no ensaio de determinação de açúcares redutores.

Amostras	Concentração (mg/mL)	Leitura branco	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Desvio padrão
EEt	1,00	0,04	0,03	0,04	0,04	0,006
EEtOH	1,00	0,08	0,09	0,08	0,08	0,006

10.6 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Compostos fenólicos possuem eminente capacidade de atuarem como antioxidantes. Em vista disso, e da observação de atividade antioxidante mais pronunciada de EEtOH que em EEt neste trabalho, foi avaliado o teor de fenólicos totais em ambos extratos a partir da curva analítica com ácido gálico como padrão na quantificação (figura 27). Os resultados foram encontrados pela equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do ácido gálico e expressos em miligramas de compostos fenólicos totais equivalente ao ácido gálico por grama de extrato.

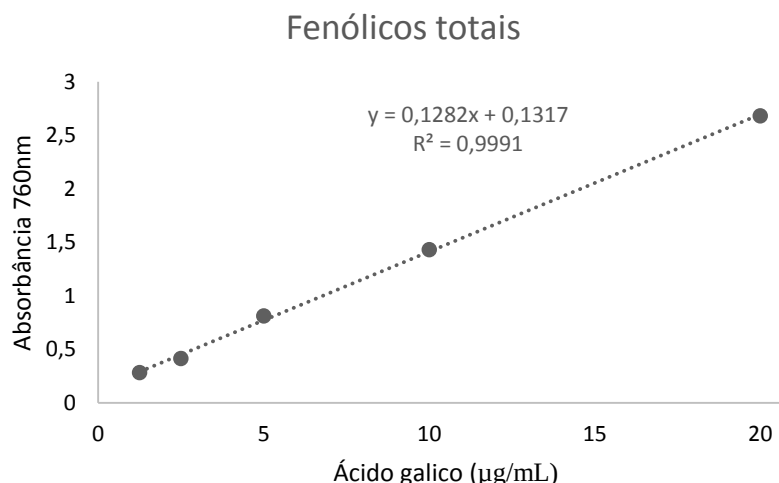


Figura 27 Curva analítica do ácido gálico para determinação dos fenólicos totais dos extratos de *C.verbenacea*.

Os valores de absorvância encontrados para os extratos e o erro padrão da média foram $0,372 \pm 0,0042$ UA para EEt e $0,698 \pm 0,000,31$ UA para EEtOH. Levando em conta o valor das absorvâncias dos extratos, a equação da reta da curva analítica e a concentração dos extratos ($25,0 \mu\text{g/mL}$), pode ser inferido que EEt e EEtOH possuem, respectivamente, $4,7 \mu\text{g}$ e $11,0 \mu\text{g}$ de compostos fenólicos equivalente ao ácido gálico por $100 \mu\text{g}$ de extrato. De acordo com Romão (2016), EEt apresentou $4,5 \mu\text{g}$ e EEtOH $14,4 \mu\text{g}$ de compostos fenólicos equivalente ao ácido gálico por $100 \mu\text{g}$ de extrato, aproximando-se dos resultados obtidos nesse trabalho.

10.7 OLE-HPLC

Para a comparação da eficiência do método tradicional/convencional (HPLC sem o sistema OLE) na análise por cromatografia de fase líquida utilizando extratos e o processo com OLE utilizando material vegetal seco e moído (droga vegetal), foram realizadas análises com o mesmo método e foram comparados os resultados quanto ao número total e intensidade de picos (ou picos). Foram observadas 80 picos com o método convencional e 84 picos com o sistema OLE.

Quanto ao rendimento, considerando a injeção de $20 \mu\text{L}$ de solução de EEt a 10 mg/mL , e levando em conta que o rendimento na obtenção de EEt foi

13% (massa de extrato seco/droga vegetal, %), pode ser inferido que foram injetados 1,5 mg equivalentes a planta seca, enquanto que para o sistema OLE apenas 1 mg da mesma foi utilizado. As imagens abaixo mostram os cromatogramas para OLE e para EEt (figura 28), e a figura 30 sobrepõe os resultados. Pelas duas figuras é possível notar a presença de mais picos, incluindo um grupamento de substâncias com t_R baixo (entre 5 e 10 minutos), presentes mais claramente no extrato EEtOH (figura 29), de acordo com as análises de Romão (2016), indicando que o método separa e identifica ampla gama de componentes sem a necessidade de diferentes solventes extratores para análise do perfil químico da espécie, podendo ser muito útil em análises metabolômicas.

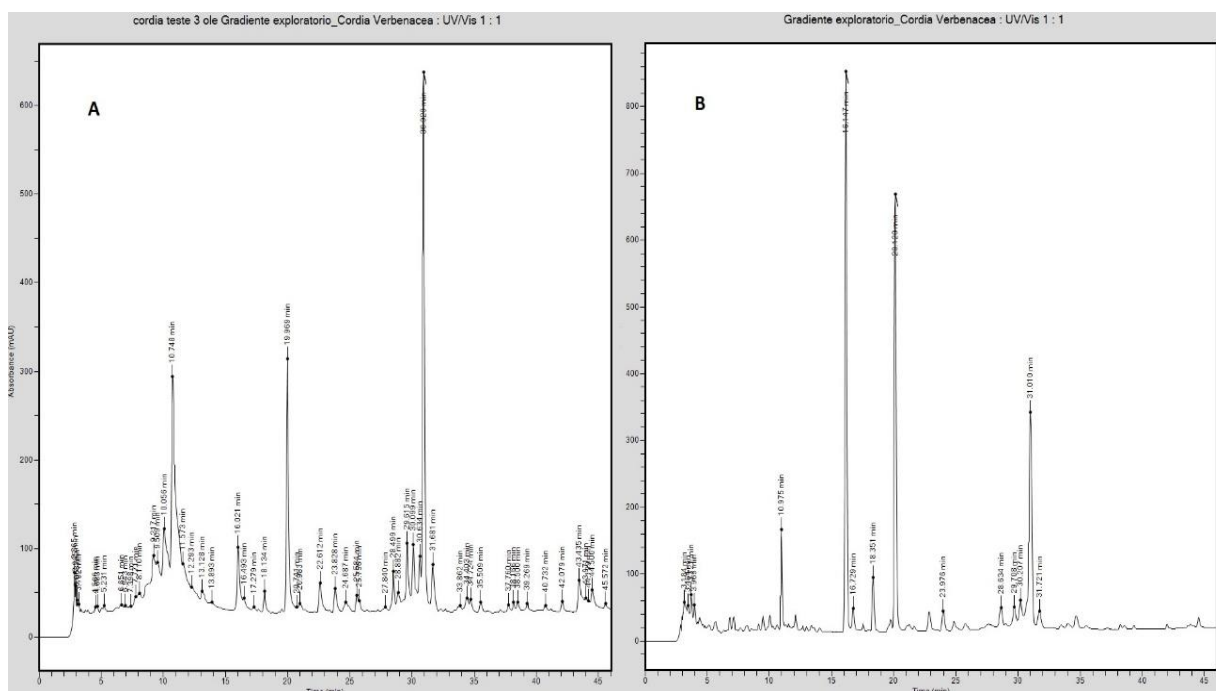


Figura 28 Cromatogramas em HPLC-UV. Método OLE-HPLC (A; material vegetal seco e moído) e método convencional de análise de amostra (B; EEt). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 15 min; coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), λ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL (10 mg/mL) (B); 1 mg de planta seca e moída (A).

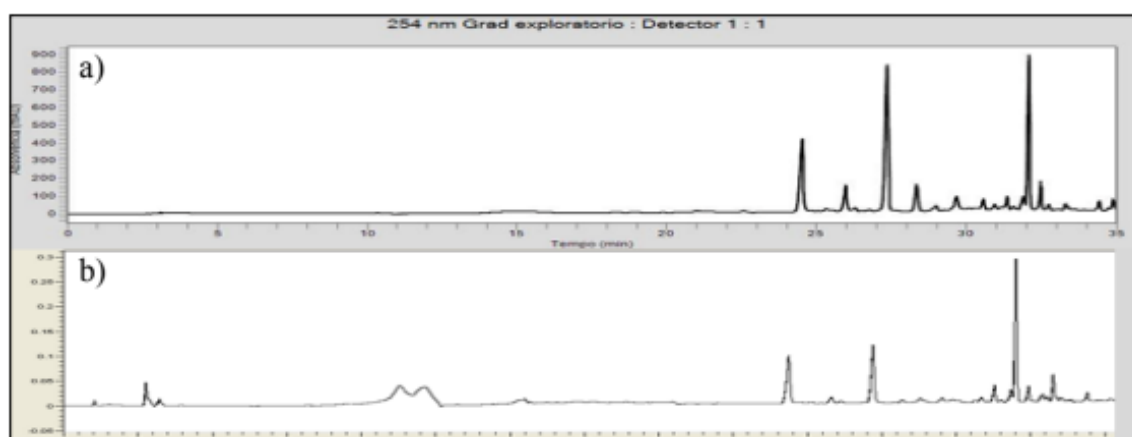


Figura 29 Cromatogramas em HPLC- DAD/UV-Vis (gradiente exploratório) de EEt (a) e EEtOH (b). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 5 min; coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), $\lambda_{\text{máx}}$ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L (Fonte: ROMÃO 2016).

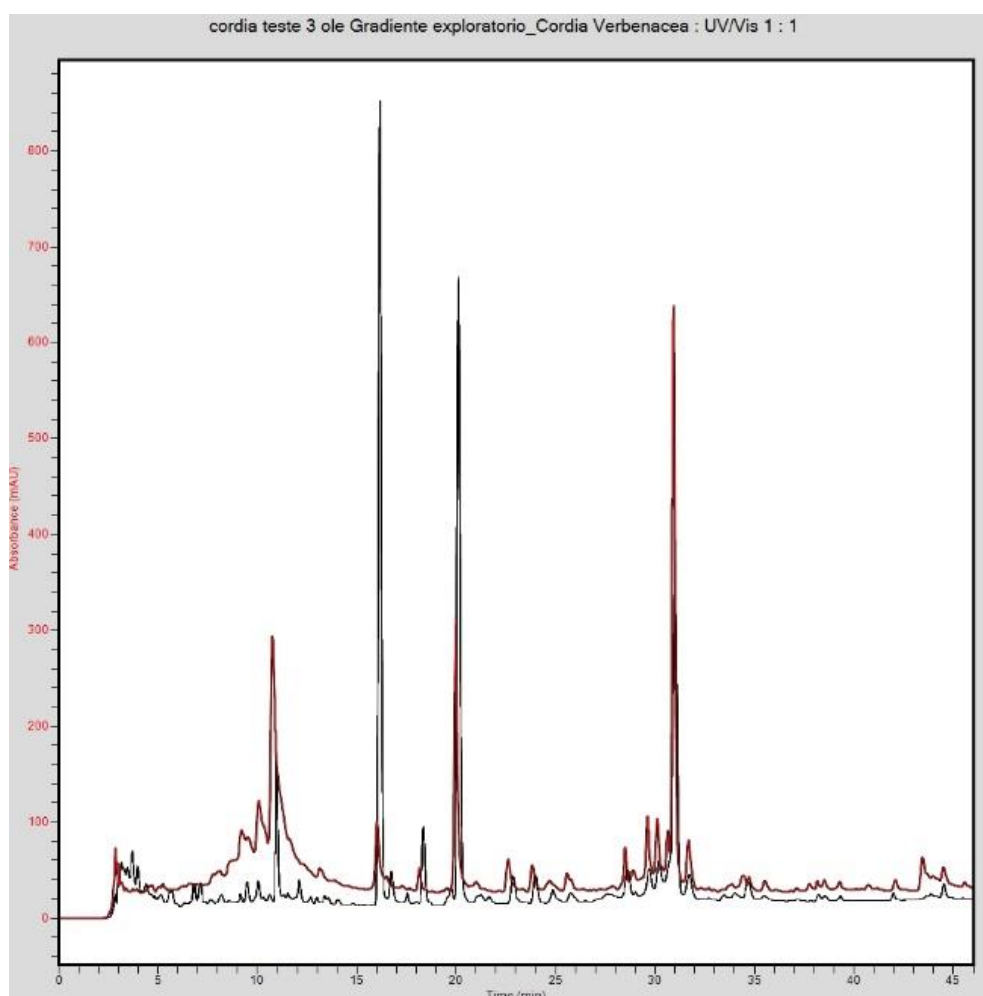


Figura 30 Cromatogramas em HPLC UV. Sobreposição das análises por OLE-HPLC (planta seca e moída; linha vermelha) e método convencional (EEt; linha preta). Gradiente exploratório: 5-100 % de metanol em 30 min, mais 100% de metanol por 15

min; coluna Ace[®] C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m), λ = 254 nm, vazão de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μ L (10 mg/mL) (B); 1 mg de planta seca e moída (A).

Vistas a praticidade, economicidade, celeridade e o interesse ambiental, o sistema OLE se torna viável e pertinente ao ambiente científico. Além de economizar o tempo para a obtenção do extrato, que geralmente envolve várias etapas de extração e a secagem de solventes, o sistema também evita o tempo que seria utilizado no processo de pré-tratamento de amostra, para a retirada de impurezas. Além disso, o sistema permite a redução do consumo de energia relacionado ao procedimento de secagem dos solventes, e a redução do volume de resíduos contaminantes dos solventes. Um outro ponto de destaque é a facilidade do processo diante de problemáticas de solubilização de amostras.

10.8 Desenvolvimento de método em UPLC-UV

Com vistas à Química Verde, foi desenvolvido um método em UPLC-UV para a análise do extrato hidroetanólico (EEtOH). As bases para esta etapa foram métodos anteriormente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, principalmente aquele desenvolvido e validado por Faibicher (2020), cujo cromatograma está ilustrado na figura a seguir (figura 31).

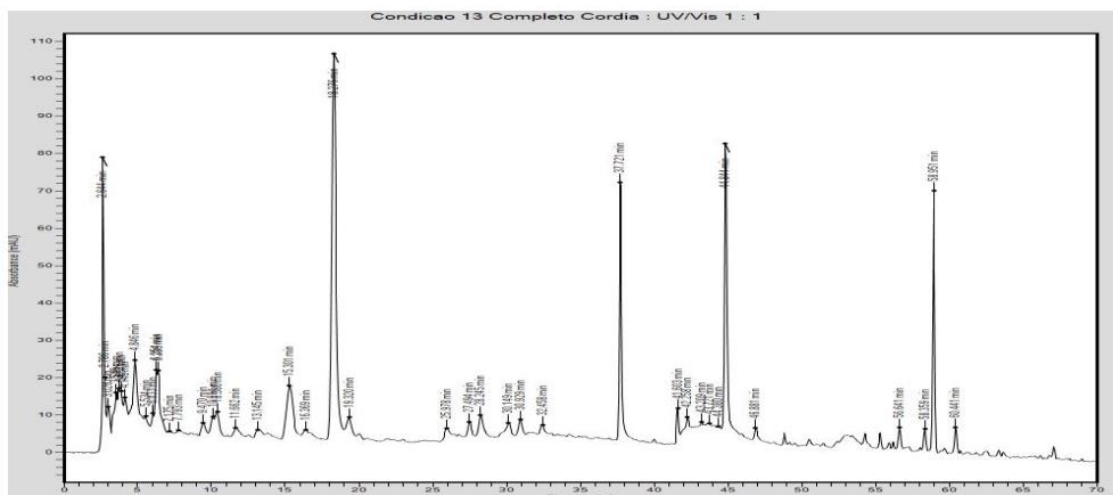


Figura 31 Método desenvolvido por Faibicher (2020): coluna C18, fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 35-42% B (0-20 min); 42-60% B (20-30 min); 60-70 % B (30-40 min); 70-100% B (40-70 min). Fonte: Faibicher, 2021.

O método reportado acima apresenta boa separação e tem a presença de marcadores da espécie vegetal em estudo, à exemplo da cordialina (t_R =58,9 min). Para o método em UPLC, o etanol foi escolhido como solvente orgânico

devido à sua classe e à sua menor toxicidade e poluição ambiental. A partir de então, outras variáveis passaram a ser consideradas, tais como a força de eluição ($\mathcal{E}$, %B), a temperatura, que interfere na viscosidade dos solventes podendo superar os limites de pressão do equipamento, o controle de ionização de componentes do extrato, e o volume de injeção, que podem influenciar na resolução das picos cromatográficas.

Os métodos 1 a 10 tiveram mantidos a vazão, o volume de injeção e a temperatura. O método 1 teve início com uma %B inferior à inicial no método convencional de comparação. Esta tentativa fez com que, inicialmente, o gradiente tivesse uma característica de maior polaridade, favorecendo a eluição de componentes com a mesma característica. Porém, aos 6 min, com 90% de solvente orgânico, muitos componentes co-eluíram e não houve uma separação satisfatória (Figura 32A). O método 2 se iniciou com uma %B semelhante ao do método em HPLC. Até os 6 min, muitas substâncias co-eluíram (Figura 32B), o que sugeriu a diminuição da força de eluição inicial.

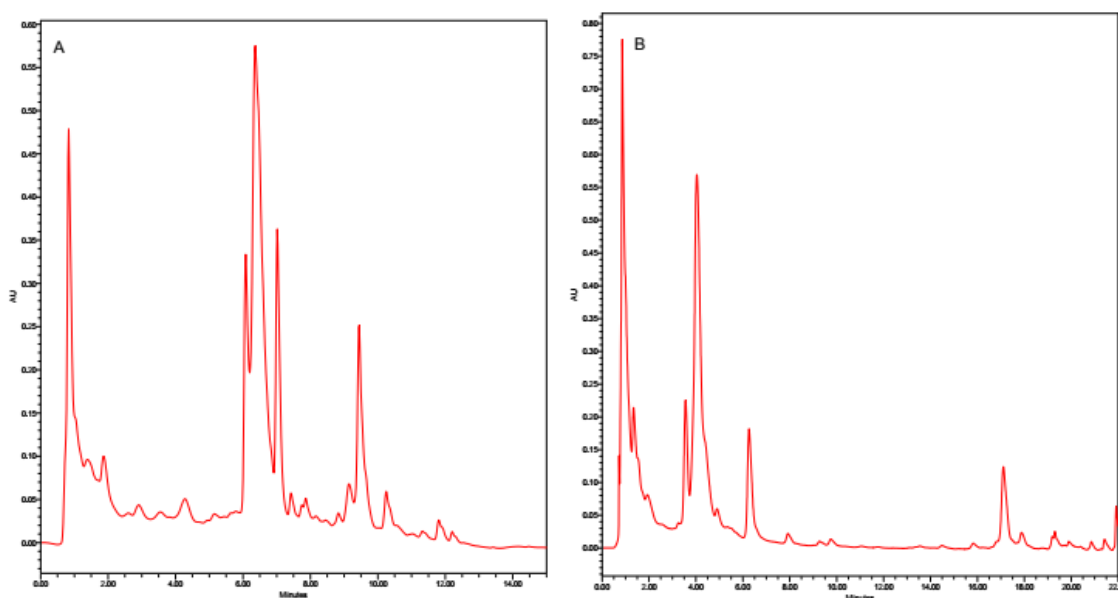


Figura 32 Método 1(A) e Método 2(B) em UPLC-UV. *Método 1:* 25-32% B (0-3 min), 32-60% B (3-5,5 min), 60-90% B (5,5-10 min), 90-100% (10-12 min), 100% B (12-15 min). *Método 2:* 35-40% B (0-3 min), 40-45% B (3-6min), 45-50% B (6-9 min), 50-55% (9-12 min), 55-60% (12-15 min), 100% B (15-22min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V_{inj} =10 μ L, 35°C.

Do método 3 ao método 8, as tentativas se basearam em variar o intervalo da força de eluição até 8 min, na intenção de melhorar a separação das picos iniciais.

Os métodos 3 (Figura 33A) e 4 (Figura 33B) apresentaram resultados muito semelhantes até os 8 min. O método 4, a partir desse tempo, tem a %B menor com relação ao método 3, e verifica-se a tendência de separação das picos entre 10 e 12 min com melhor resolução que entre 12 e 14 min no método 3, provavelmente em decorrência do maior tempo de gradiente. A partir destes gradientes, foi possível observar o padrão de picos com maior absorbância no comprimento de onda analisado, gerando um perfil de separação que remonta aos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa para a análise dos extratos etanólico e hidroetanólico da erva-baleeira.

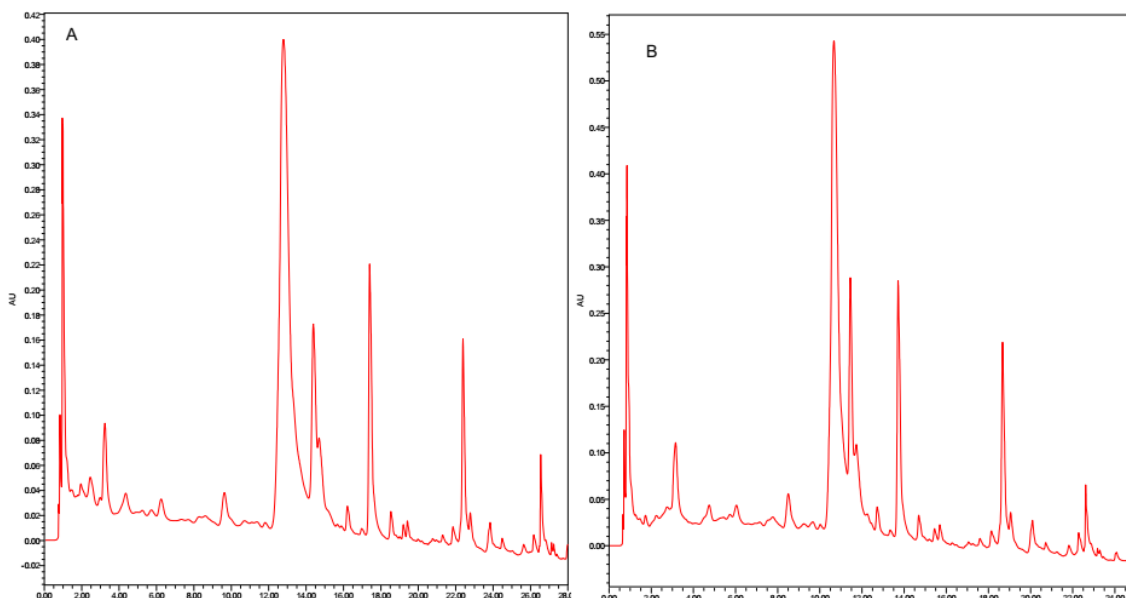


Figura 33 Método 3 (A) e Método 4 (B) em UPLC-UV. Método 3: 14-31% B (0-8 min), 31-80% B (8-20 min), 80-100% B (20-21 min), 100% (21-25 min). Método 4: 14-27% B (0-8 min), 27-80% B (8-22 min), 80-100% B (22-23 min), 100% (23-25 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, $V_{inj}=10\mu\text{L}$, 35°C, UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

As pequenas diferenças entre os gradientes 5 e 6, até 80% de B, não promoveram grandes alterações na separação das picos cromatográficas, conforme demonstrado na figura a seguir (Figura 34A e Figura 34B). Todavia, o método 5 apresentou tendência de separação dos picos entre 12 e 14 min. O método 7 (Figura 34C) tem o mesmo gradiente do método 6, porém foi utilizado ácido fórmico como modificador da fase aquosa, o que levou a co-eluição dos

picos entre 12 e 14 min, e, dessa forma, o desenvolvimento do método seguiu com o ácido acético. A figura 34D trata do resultado obtido com o método 8. Dentre os gradientes já citados, de 0 a 8 min há a menor variação na %B, o que piorou a separação das substâncias dessa parte inicial.

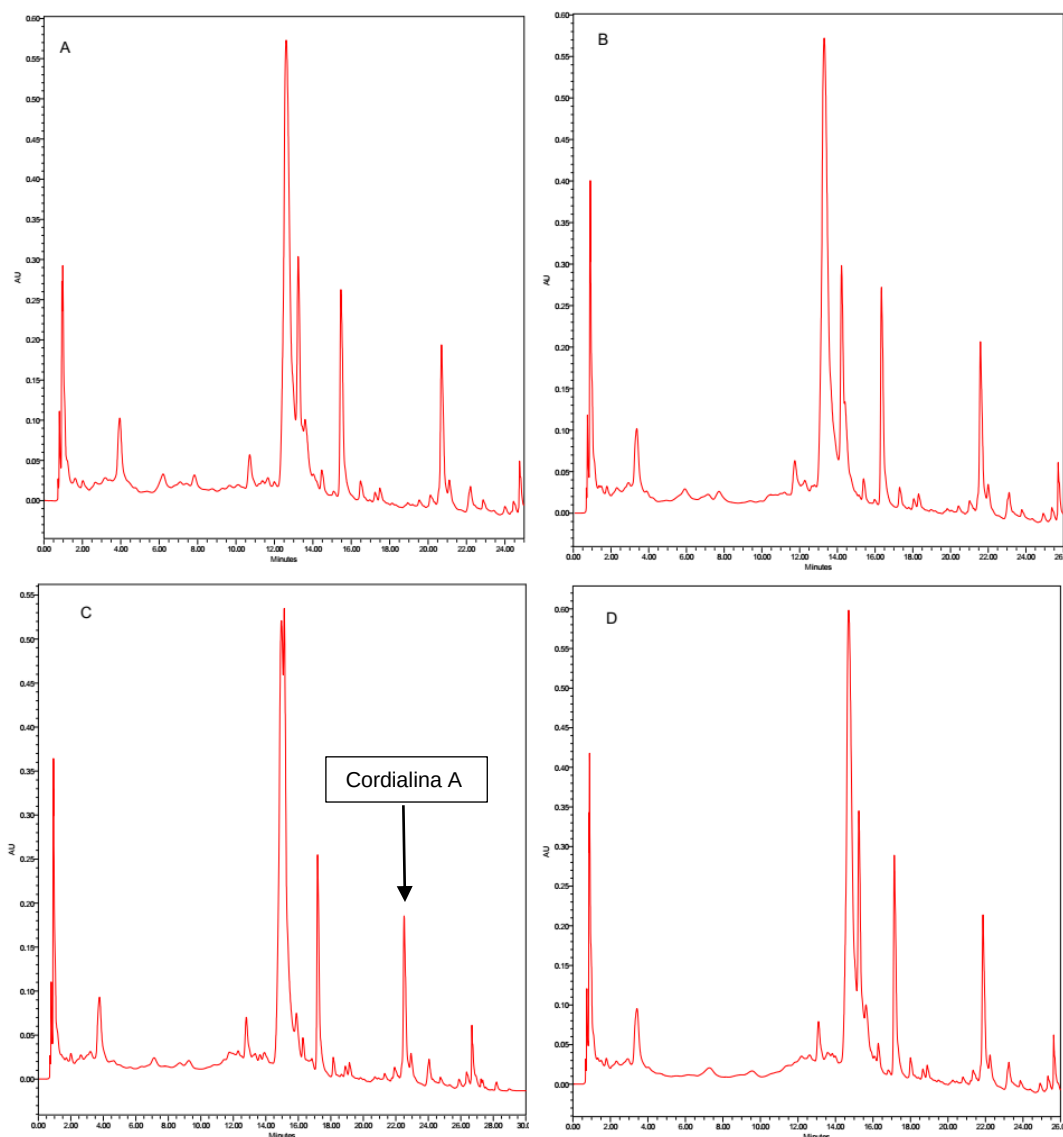


Figura 34 Método 5 (A), Método 6 (B), Método 7 (C) e Método 8 (D) em UPLC-UV. Método 5: 14-23% B (0-8 min), 22-80% B (8-23 min), 80-100% B (23-24 min), 100% (24-26 min). Método 6: 14-20% B (0-8 min), 20-80% B (8-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min). Método 7: 14-20% B (0-8 min), 20-80% B (8-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-30 min). Método 8: 14-17% B (0-8 min), 17-80% B (8-23 min), 80-100% B (23-24 min), 100% (24-27 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V_{inj} =10 μ L, 35°C. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

O método 9 (Figura 35) apresentou boa separação e resolução das picos nos 12 min iniciais de análise, a parte final também se mostrou

adequada, porém, entre 12 e 14 min as picos continuavam sem a separação efetiva.

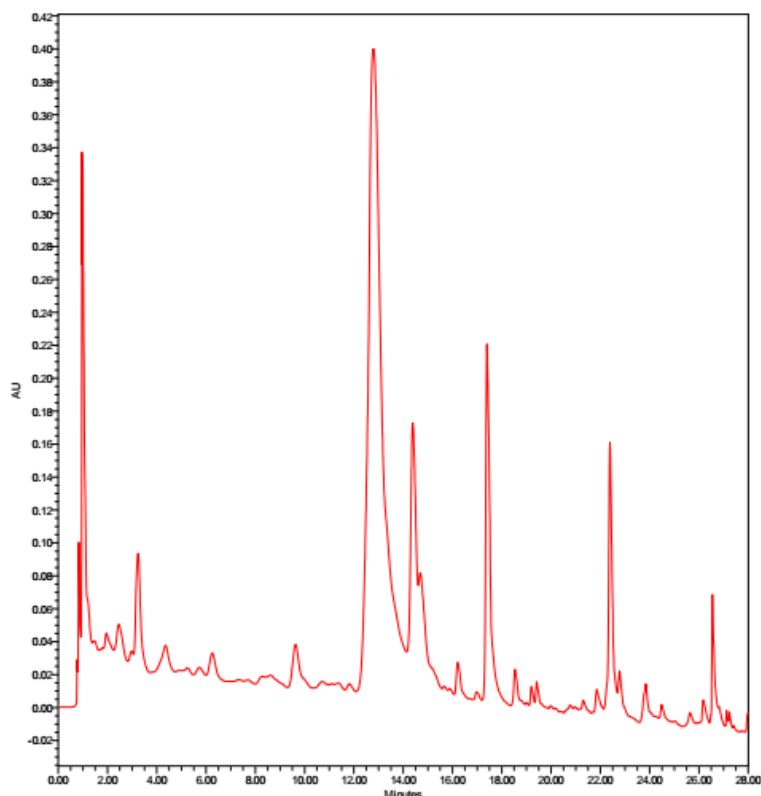


Figura 35 Método 9: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V_{inj} =10 μ L, 35°C. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

O Método 10 foi composto por uma rampa em 12 min, e 6 min em modo isocrático. A manutenção do método em 32%B também não foi capaz de separar os picos entre 14 e 18 min (Figura 36). A partir de então, o método 9 foi escolhido e outras variáveis passaram a ser analisadas experimentalmente.

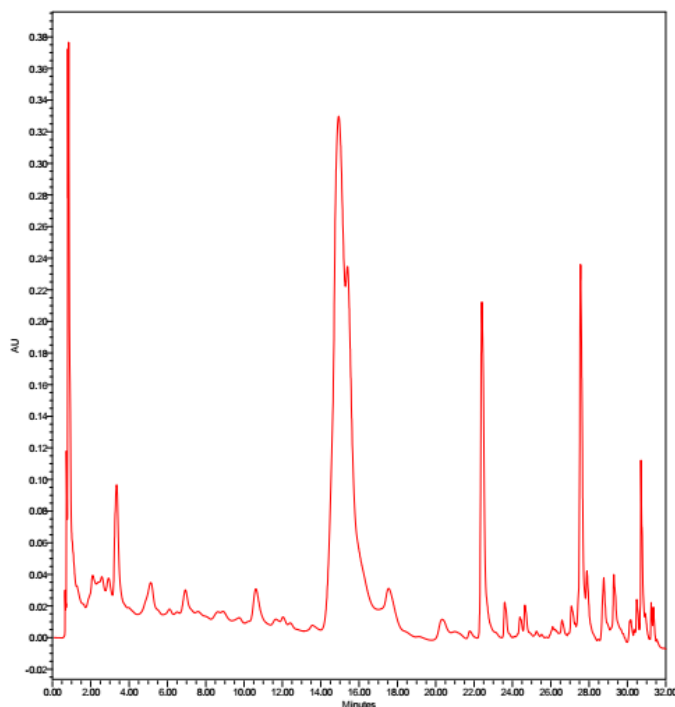


Figura 36 Método 10: 17-32% B (0-12 min), 32% B (12-18 min), 32-80% B (18-28 min), 80-100% B (28-29 min), 100% (29-32 min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. 0,300 mL/min, V_{inj} =10 μ L, 35°C. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

As primeiras variáveis avaliadas foram, concomitantemente, a vazão, que passou de 0,300 mL/min para 0,350 mL/min, e a temperatura, que era de 35°C e passou a 45°C (Figura 37A, método 11). Este ajuste na temperatura foi importante para a diminuição da pressão do sistema, que havia se elevado em decorrência do fluxo mais intenso. Para o método 12, além dessas variações em vazão e temperatura, também houve a redução no volume de injeção de 10 para 5 μ L (Figura 37B).

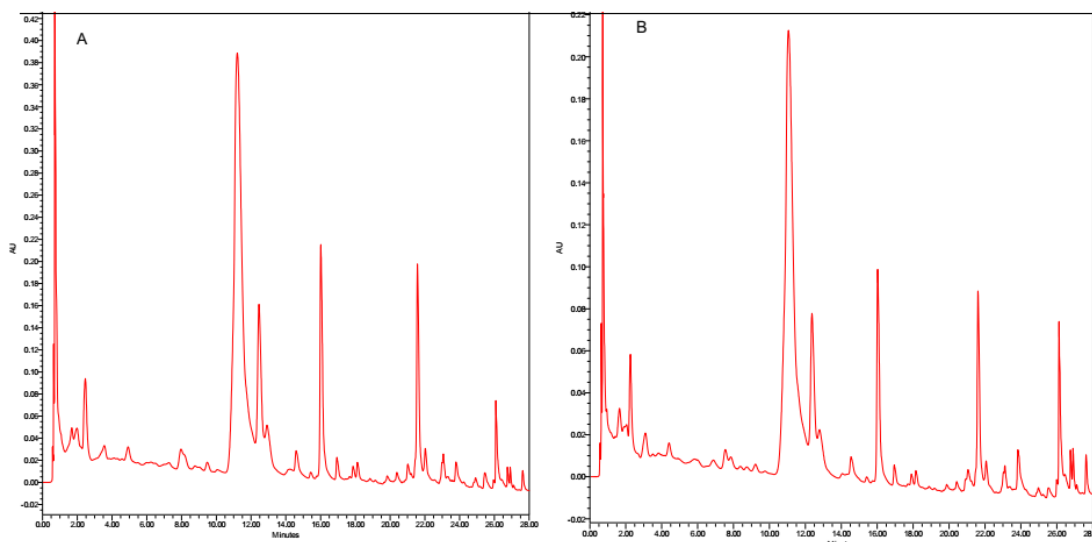


Figura 37 Método 11 (A) e método 12 (B). Método 11: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, $V_{inj}=10\mu\text{L}$, 45°C. Método 12: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, $V_{inj}=5\mu\text{L}$, 45°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

Tanto o método 11 quanto o método 12 apresentaram os melhores resultados para a separação dos picos críticos existentes entre 10 e 12 min. A menor área das picos do método 12 foi relativa ao menor volume injetado, não tendo levado a significativas mudanças no perfil e resolução das mesmas. Contudo, por critérios de Química Verde que norteiam esta parte do trabalho, é de interesse a injeção de menor quantidade de amostra, o que sugere menores desperdícios de material no preparo da mesma.

Por fim, foram desenvolvidos os métodos 13 (Figura 38A) e 14 (Figura 38 B), variando-se com relação aos métodos 11 e 12, novamente, a vazão, agora de 0,350 mL/min para 0,400 mL/min e a temperatura de 45°C para 50°C. O volume de injeção para os métodos 13 e 14 foram, respectivamente, 10 e 5 μL .

Avaliação do método em UPLC e comparação com o método convencional de análise do extrato, utilizando a métrica Agree (Analytical Greenness Metric)

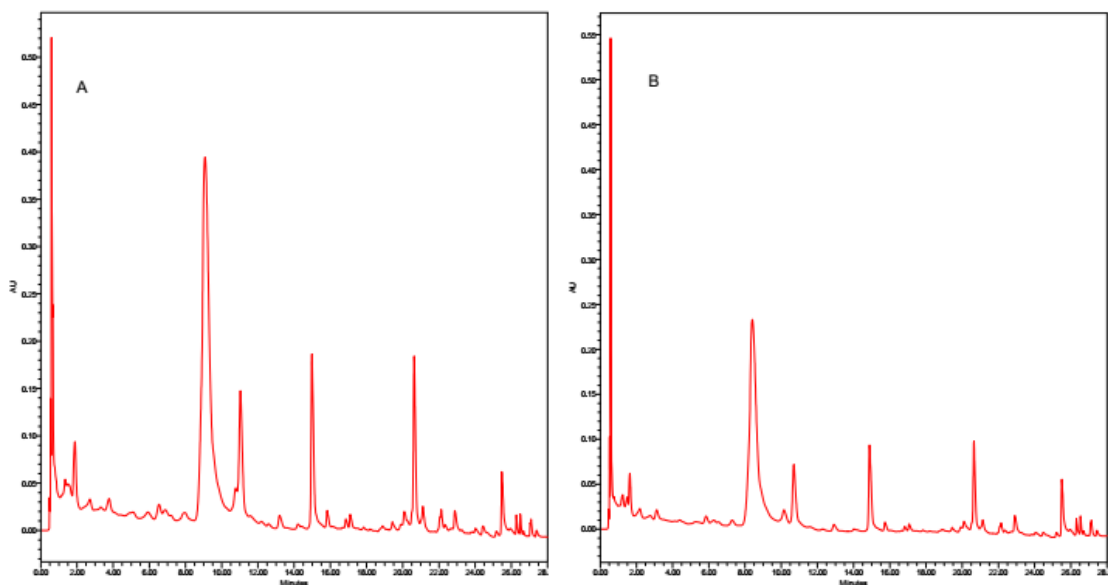


Figura 38 Método 13 (A) e Método 14(B). Método 13: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,400 mL/min, $V_{inj}=10\mu\text{L}$, 50°C. Método 14: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,400 mL/min, $V_{inj}=5\mu\text{L}$, 50°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

Ambos métodos apresentaram um perfil de separação desejável, boa resolução dos picos e, com relação ao método utilizado para comparação desenvolvido por Faibicher (2020) em HPLC, uma economia de 42 min de tempo de análise, reduzindo o consumo de energia, materiais, equipamentos, solventes e exposição aos mesmos.

10.8.1 Comparação dos métodos cromatográficos verdes desenvolvidos com o método convencional de análise de folhas de erva-baleeira, utilizando a métrica Agree (*Analytical Greenness Metric*)

Vários critérios podem ser utilizados para avaliar o impacto que as metodologias analíticas podem proporcionar. Este conceito é bastante válido, ainda mais quando se pretende privilegiar um método dentro dos princípios da Química Verde.

Dentre as métricas disponíveis para avaliar estes critérios, está a calculadora *Analytical Greenness Metric*, que avalia os 12 princípios da Química

Verde e os converte em uma pontuação 0-1, fornecendo um resultado facilmente interpretável, e oferecendo a possibilidade de atribuição de pesos aos princípios mais desejáveis (PENA-PERERA et al., 2020). Na métrica *Agree*, a pontuação geral é mostrada ao centro do pictograma, e a intensidade da coloração verde, para cada princípio, indica o quão a etapa em destaque atende a Química Verde.

A métrica foi utilizada para calcular a pontuação do método em HPLC-UV descrito por Faibicher (2021) e dos métodos por UPLC-UV e OLE-UPLC-UV desenvolvidos neste trabalho. Como princípio número 1, foi avaliado se os métodos precisavam ou não de pré-tratamento de amostras. Para os métodos em HPLC e UPLC, foi considerado o pré-tratamento das amostras através da EFS, que envolve o uso de solventes, filtração em membrana e o tempo de secagem.

Para o princípio número 2, foram considerados o tamanho mínimo de amostras. Neste caso, os métodos convencionais em HPLC e UPLC necessitam de mais material vegetal que o método OLE, e as análises por HPLC e UPLC forneceram picos de menor área, sugerindo que diferentes solventes extratores podem ser necessários para atingir a abrangência da extração e análise simultâneas realizadas por OLE. O princípio 3 se refere a medidas *in situ*, ou seja, quanto mais direta a determinação do analito, mais verde é o processo. Desta forma, os métodos convencionais foram considerados off-line e o método OLE-UPLC, on-line, uma vez que os métodos convencionais exigiram pré-tratamento, extração e análise em diferentes etapas, enquanto que o método OLE permitiu extração e análise durante o processo cromatográfico.

O princípio 4 avaliou a integração entre os processos analíticos e a economia de energia e de reagentes. Por realizar a extração e análise concomitantemente, e evitar o uso de solventes e materiais e equipamentos de secagem, a pontuação verde do processo em OLE foi superior aos demais métodos. No princípio 5, a métrica *Agree* verificou a automação e miniaturização de métodos, sendo que esses conduzem a economia de material, energia e exposição ocupacional dos analistas. Por tudo já citado, os métodos convencionais obtiveram uma menor pontuação na métrica diante deste quesito. Já no princípio 6, é desejável que o processo de derivatização

seja evitado por exigir etapas adicionais, todavia, nenhum dos três métodos em análise pela métrica necessitaram destas transformações.

O 7º princípio diz respeito ao desperdício analítico, que deve ser evitado para que ocorra economia e não cause prejuízo ao Meio Ambiente. No 8º princípio analisado, é considerado o desperdício analítico pela geração de um grande volume de resíduo, que causa prejuízo ambiental e econômico. Claramente, o método OLE-UPLC utiliza uma quantidade de solvente menor, desde a não necessidade de pré-tratamento com solventes, até a análise por menor tempo em UPLC. Porém, diante da métrica *Agree*, devem ser computados em g ou mL a quantidade de resíduos, sem distinção entre essas medidas. Sendo assim, ainda que a análise por OLE tenha gerado cerca de 10 mL de resíduo de solvente, a métrica não distingue e considera um nível intermediário de contaminação. No entanto, se, a nível de comparação, forem consideradas todas as etapas anteriores de preparação para os métodos convencionais e o tempo de análise dos mesmos, o método OLE decerto possui características razoavelmente mais desejáveis em Química Verde. O princípio 8 considera o número de analitos determinados em 1 hora. Foi considerada a análise do extrato e da planta seca, tendo sido obtidos, em média, 40 picos cromatográficos para as técnicas. A diferença é que, no tempo avaliado, é possível realizar 2 análises por UPLC e OLE-UPLC e 1 por HPLC.

O 9º princípio considera a economia de energia, levando em consideração o tipo de equipamento ou técnica utilizada. Mais uma vez, por análises mais rápidas, métodos desenvolvidos em UPLC tendem consumir menor energia por apresentarem menor tempo de corrida cromatográfica.

O princípio 10 se refere a preferência pelo uso de solventes que se originam e fontes renováveis/biológicas. Os métodos em UPLC utilizaram etanol e água acidificada por ácido acético, enquanto que o método em HPLC utilizou metanol e água acidificada por ácido acético. O 11º princípio avaliado levou em consideração a toxicidade dos solventes, obtendo a nota 1 os considerados menos tóxicos, e a nota 0 os mais tóxicos. O etanol possui toxicidade menor que o metanol. Finalmente, para o 12º princípio, a métrica *Agree* considera a segurança do operador, a partir de toxicidades conhecidas, devendo ser listados ameaças não evitadas (da água, da acumulação biológica, de ser altamente inflamável, altamente oxidável, explosivo ou

corrosivo). Caso nenhuma ameaça dessas seja marcada na calculadora, a pontuação é igual a 1.

Em síntese, a figura 39 traz os pictogramas resultantes das análises dos 3 métodos comparados aqui. O método em HPLC convencional obteve um score de 0.59, o método em UPLC convencional obteve 0.67 e o método OLE-UPLC obteve um score de 0.86. Considerando a análise na escala de 0 (menos verde) a 1 (mais verde), a ordem crescente das metodologias diante do atendimento dos critérios da Química Verde é: HPLC convencional < UPLC convencional < OLE-UPLC.

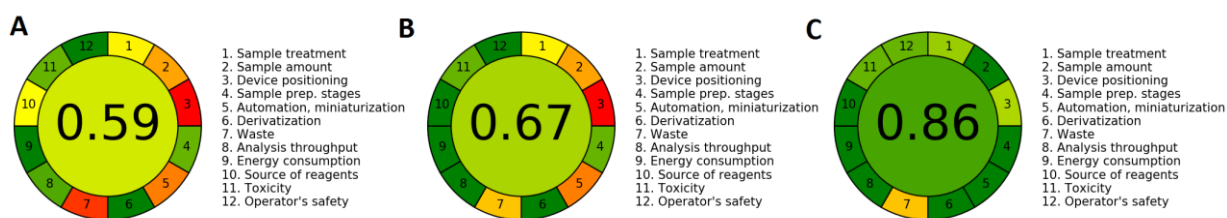


Figura 39 Scores obtidos através da métrica Agree. (A): método convencional em HPLC. (B) Método convencional em UPLC. (C) Método OLE-UPLC.

10.8.2 Validação do método em UPLC-UV

10.8.2.1 Linearidade

A linearidade foi estimada através do método dos mínimos quadrados, a partir de uma curva analítica (concentração mg/mL *versus* integrais das áreas dos picos) construída com o padrão ácido rosmarínico nas seguintes concentrações, em triplicata: 0,500 mg/mL, 0,222 mg/mL, 0,148 mg/mL, 0,099 mg/mL, 0,066 mg/mL e 0,044 mg/mL (Figura 40).

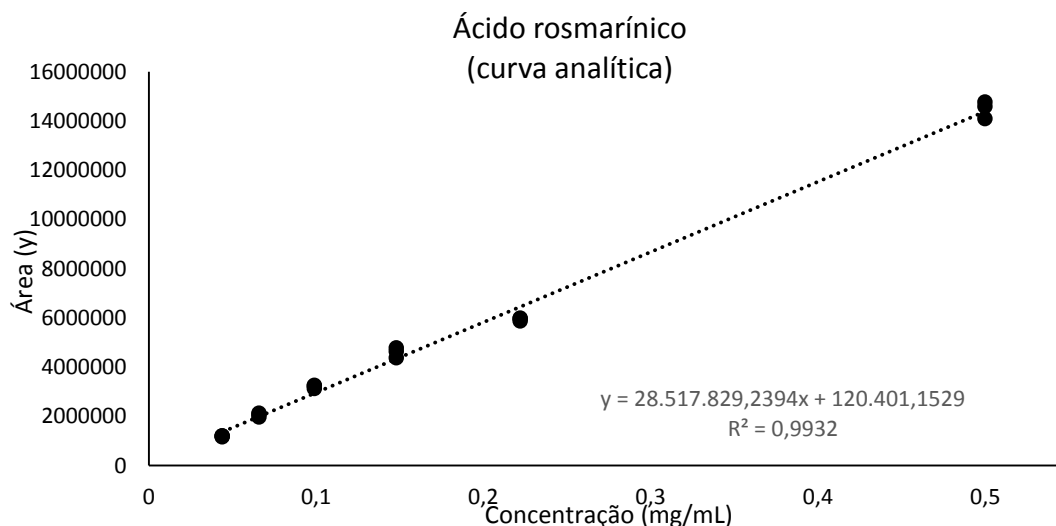


Figura 40 Curva analítica do ácido rosmarínico.

Os resultados apresentaram relação linear aparente e valores de correlação ($r^2 > 0,99$) aceitáveis para matriz complexa (BRASIL, 2017). Foi realizada a avaliação das variâncias através do teste de hipóteses para a avaliação da homocedasticidade das variâncias dos erros de construção da curva. Uma vez que a variância de y para x seja constante, os dados são considerados homocedásticos. Em caso de alteração de variância, os dados são considerados heterocedásticos.

A estimativa da equação pode ser realizada através do método dos mínimos quadrados. Caso os dados sejam heterocedásticos, pode haver um fator de ponderação que normaliza a tendência da reta permitindo coeficientes aceitáveis (BRASIL, 2017). Se os dados forem homocedásticos, pode ser aplicado diretamente.

Para a avaliação da homocedasticidade, foi utilizado o Teste de Cochran, que compara a variância de cada ponto da curva, avaliando duas hipóteses: variâncias iguais (H_0), e pelo menos uma variância diferente (H_1). O valor calculado ($C_{\text{calculado}}$) é comparado a um valor tabelado (C_{tabelado}), ao nível de 5% de significância, podendo ser: ($C_{\text{calculado}} < C_{\text{tabelado}}$), concluindo-se que os dados são homocedásticos e aceitando-se a hipótese de igualdade das variâncias, ou ($C_{\text{calculado}} > C_{\text{tabelado}}$), concluindo-se que há heterocedasticidade e não igualdade de variâncias. Os resultados do teste de Cochran permitiram concluir que os dados obtidos para o ácido rosmarínico eram heterocedásticos ($C_{\text{calculado}} = 0,3834$; $C_{\text{tabelado}} = 0,2705$).

Nos casos de heterocedasticidade, é aplicado um fator de ponderação que normaliza a tendência de reta e gera coeficientes aceitáveis. Este fator de ponderação $1/y^2$ foi aplicado utilizando-se um software de análises estatísticas, e gerou uma nova equação de reta ($y = 30000000x + 131178$) e de valor r^2 ($r^2=0,99$).

A comprovação da significância dos coeficientes angulares, importante para a composição da linearidade, foi realizada pelo teste F de Anova, tendo duas hipóteses: H_0 (coeficiente angular = 0) e H_1 (coeficiente angular $\neq 0$). Para o aceite de H_0 , $F_{\text{calculado}}$ deve ser menor que F_{tabelado} ao nível de 5% de significância, enquanto que, para o aceite de H_1 , $F_{\text{calculado}}$ deve ser maior que F_{tabelado} . Dessa forma, concluiu-se pela rejeição de H_0 e aceite de H_1 ($F_{\text{calculado}}=28996,94$; $F_{\text{tabelado}}=4,38$), podendo o coeficiente angular ser considerado diferente de zero.

O teste t de Student é utilizado para a avaliação do coeficiente linear (H_0 : coeficiente linear = 0; H_1 : coeficiente linear $\neq 0$), e é desejável que ele seja igual a zero. No caso de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$ e p-valor superior a 0,05, H_1 é rejeitado e o coeficiente linear é zero. O valor de t_{tabelado} é igual a 2,09, enquanto que o valor de $t_{\text{calculado}}$ é equivalente a 1,54, e, portanto, a curva do padrão ácido rosmarínico possui coeficiente linear estatisticamente igual a zero.

A variação devido à regressão deve ser maior que a variação devida aos erros (resíduos), para que, de fato, y varie em função de x (BRASIL, 2017). Os resíduos são a diferença entre o valor de y calculado e o estimado pela equação em um ponto. Durante a avaliação dos resíduos, podem ser observados dependência entre erros, desvios de linearidade e outros, e a avaliação dos gráficos incluem a distribuição de todos eles em função da concentração e da resposta. Os valores fora da faixa considerada devem ser investigados a fim de verificar se existe alguma causa analítica. O gráfico de avaliação visual (dispersão) de resíduos encontra-se abaixo (Figura 41), e a avaliação estatística foi realizada por meio do teste de Ryan-Joyner, testando H_0 (resíduos com distribuição normal) ou H_1 (resíduos com distribuição não normal).

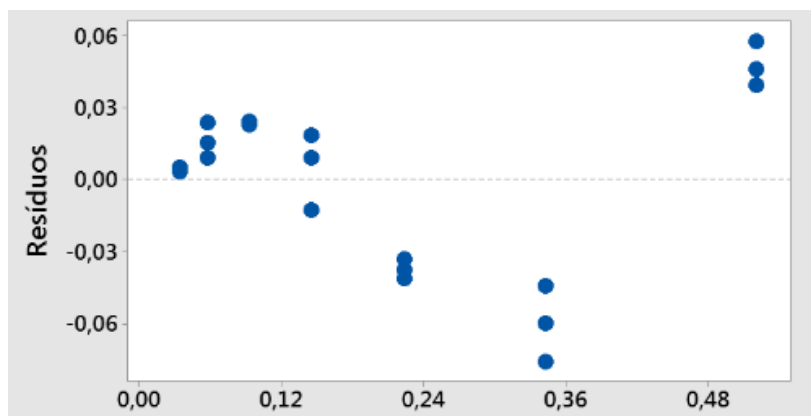


Figura 41 Análise gráfica dos resíduos dos padrões de ácido rosmarínico.

O valor da estatística Ryan-Joyner para o ácido rosmarínico foi equivalente a 0,956, e $p\text{-valor} < 0,01$, demonstrando não existir distribuição normal ($p\text{-valor} < 0,05$), e a presença de outliers. A partir dessa conclusão, foi realizado o teste de Grubbs, no qual o valor do resíduo deve estar em uma faixa de valores tabelados. No caso do ácido rosmarínico, a faixa avaliada foi 2,58/-2,58, e o resíduo padronizado igual a 2,52. Apesar de indicar a presença de *outlier*, fatores como a utilização das triplicatas e análises consecutivas apontam garantias no resultado final.

10.8.2.2 Exatidão e Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos, enquanto que a exatidão é o grau de concordância entre os resultados individuais em relação a um valor aceito com verdadeiro (BRASIL, 2017). Ambas foram analisadas utilizando-se três diferentes concentrações do ácido rosmarínico, em triplicata. A precisão intermediária foi avaliada, sendo as triplicatas analisadas em dias diferentes e não de forma interlaboratorial. A tabela 9 apresenta as concentrações (CQB: controle de qualidade baixo, CQM: controle de qualidade médio, CQA: controle de qualidade alto) e os resultados obtidos, que se encontraram dentro das faixas consideradas aceitáveis (0-15%: precisão, 85-115%: exatidão).

Tabela 9 Dados de precisão e exatidão do ácido rosmarínico para o método analítico.

Padrão	CQB	CQM	CQA
	(0,044	(0,099	(0,500
	mg/mL)	mg/mL)	mg/mL)

Ácido	Precisão	1,39	1,61	1,92
rosmarínico	(%)			
	Exatidão	89	109	104
	(%)			

CQB: controle de qualidade baixo. CQM: controle de qualidade médio. CQA: controle de qualidade alto.

10.8.2.3 Sensibilidade

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados matematicamente segundo as equações:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \text{ (Equação 1)}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S} \text{ (Equação 2)}$$

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto com o eixo Y; S = inclinação da curva analítica.

O valor encontrado como LD para o ácido rosmarínico foi 0,011 mg/mL, e LQ equivalente a 0,034 mg/mL.

10.8.2.4 Seletividade

A avaliação da seletividade foi realizada utilizando um UPLC-DAD para a obtenção do espectro de absorção no UV. Os dados do espectro do padrão de ácido rosmarínico foi comparado ao espectro obtido através da análise de EEtOH. De acordo com a RDC 266/2017 (BRASIL, 2017), em ativos de origem vegetal, a seletividade deve ser capaz de demonstrar que o método distingue o material de interesse de outros semelhantes.

A semelhança entre os resultados obtidos (Figura 42) para EEtOH e ácido rosmarínico sugere se tratar desta substância no extrato, não existindo picos interferentes no t_R do padrão na matriz vegetal. Foram coletados os espectros em diferentes regiões do pico cromatográfico. A figura 43 traz os cromatogramas obtidos com o extrato e com o padrão.

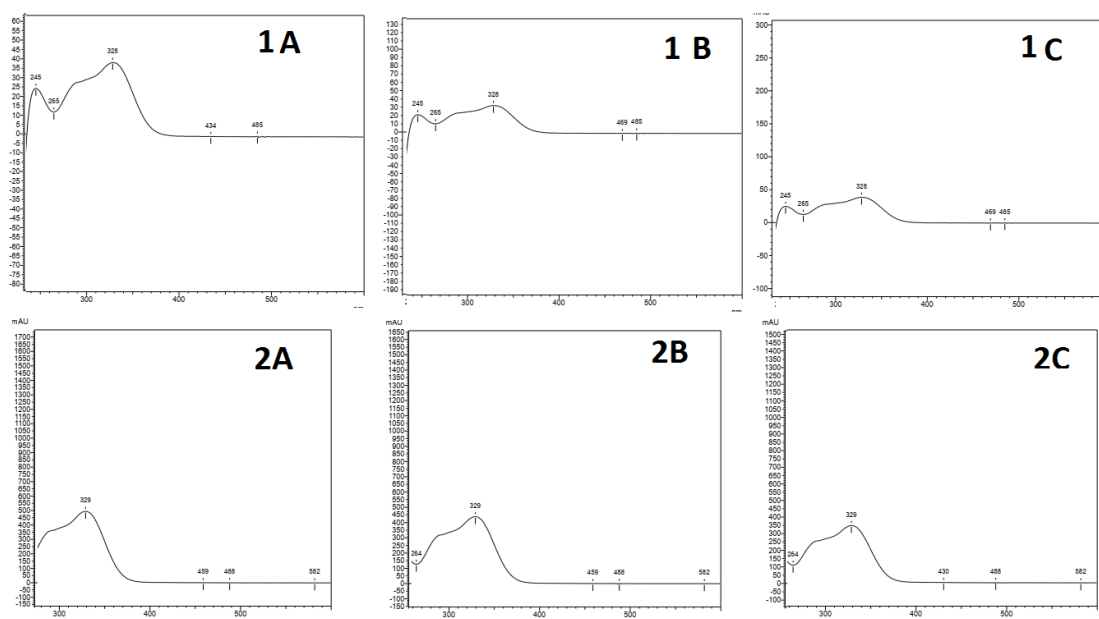


Figura 42 Espectro de absorção no UV no início (A), meio (B) e fim (C) do pico cromatográfico referente ao EEtOH (1) e do ácido rosmarínico (2).

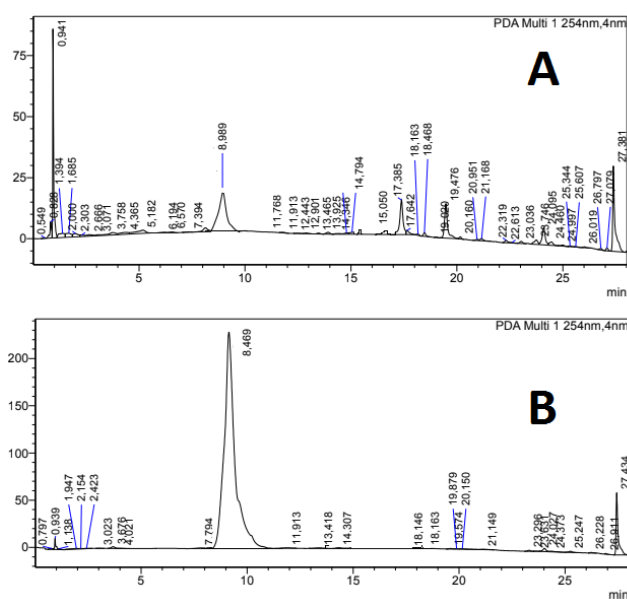


Figura 43 Cromatogramas de EEtOH (A) e do ácido rosmarínico resultantes da análise para a obtenção do espectro no UV. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-24 min), 80-100% B (24-25 min), 100% (25-28 min), 0,350 mL/min, V_{inj} =5 μ L, 45°C. Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2 %. UPLC Shimadzu® PDA Nexera.

10.8.2.5 Quantificação do ácido rosmarínico

A quantificação do padrão foi realizada a partir da análise de EEtOH 1 mg/mL na curva analítica gerada pelo ácido rosmarínico, e o resultado obtido foi equivalente a 6,1% (m/m).

10.9 Desenvolvimento de método em OLE-UPLC-UV

Os métodos acima descritos para UPLC-UV não forneceram bons resultados para a análise por OLE. Esse fato se justifica por conta do sistema extrair em maior quantidade os componentes durante a corrida cromatográfica, e pelos intervalos de gradiente serem curtos nos métodos desenvolvidos para UPLC-UV, fazendo com que as picos sobreponham e não obtenham boa resolução. Sendo assim, foram definidos intervalos maiores entre as rampas de gradiente do método, de modo que o conjunto de compostos pudesse eluir com mais eficiência.

Também foi realizada a injeção do extrato (10 mg/mL) no método desenvolvido. Levando-se em consideração o rendimento na obtenção do extrato e a injeção de 10 μ L, conclui-se que foi aplicado 0,8 mg de planta seca na análise convencional. Para o sistema OLE, foi colocado 0,5 mg de planta seca no *holder*.

A figura (Figura 44) abaixo traz o cromatograma obtido com a planta seca através do sistema OLE. Cabe ressaltar que a massa utilizada estava no limite daquele possível de se calcular com os equipamentos disponíveis, e valores menores poderiam acarretar erros experimentais.

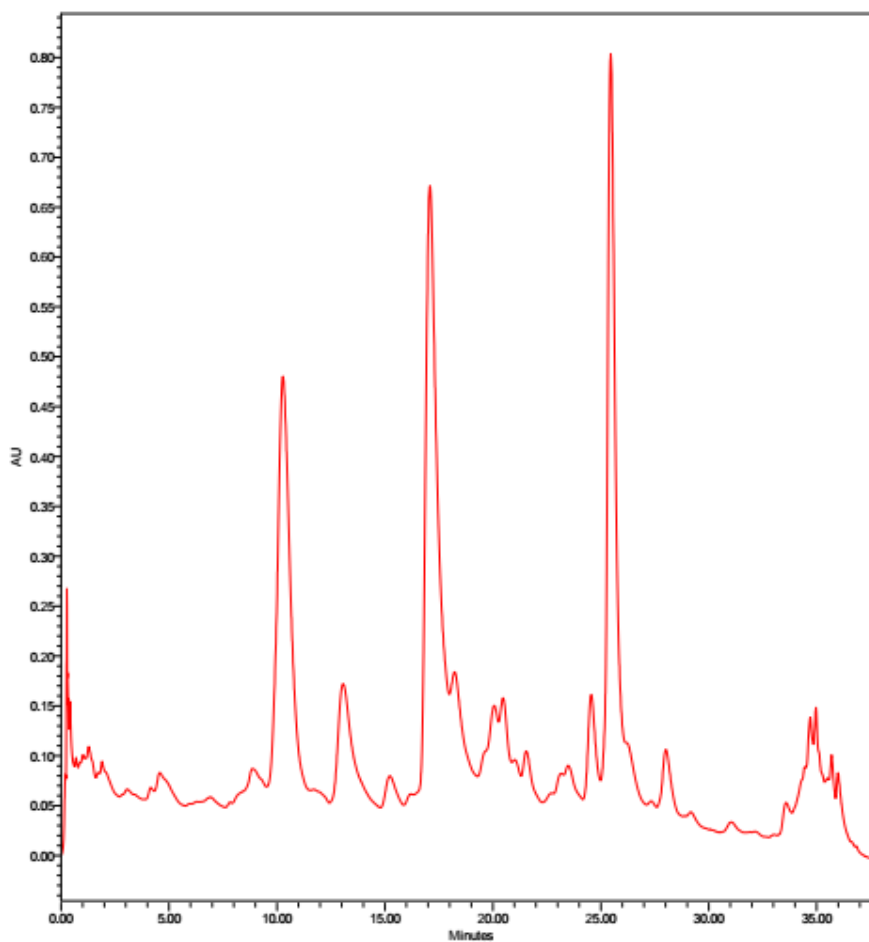


Figura 44 OLE-UPLC-UV. Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Coluna HSS T3, fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

A título de comparação entre os perfis obtidos diretamente com a matéria vegetal seca através do sistema OLE e o perfil cromatográfico obtido no método desenvolvido para o sistema OLE mas com o EEtOH sendo analisado, pode ser observado que o perfil de picos cromatográficos principais ($t_r=9,089$ min, $t_r=11,713$ min, $t_r=16,039$ min, $t_r=24,812$ min; Figura 45) se assemelha ao perfil obtido nos métodos convencionais de análise da erva-baleeira. Para esta comparação, o extrato foi injetado na concentração de 0,5 mg/mL, sem pré-coluna, no método OLE-UPLC-UV.

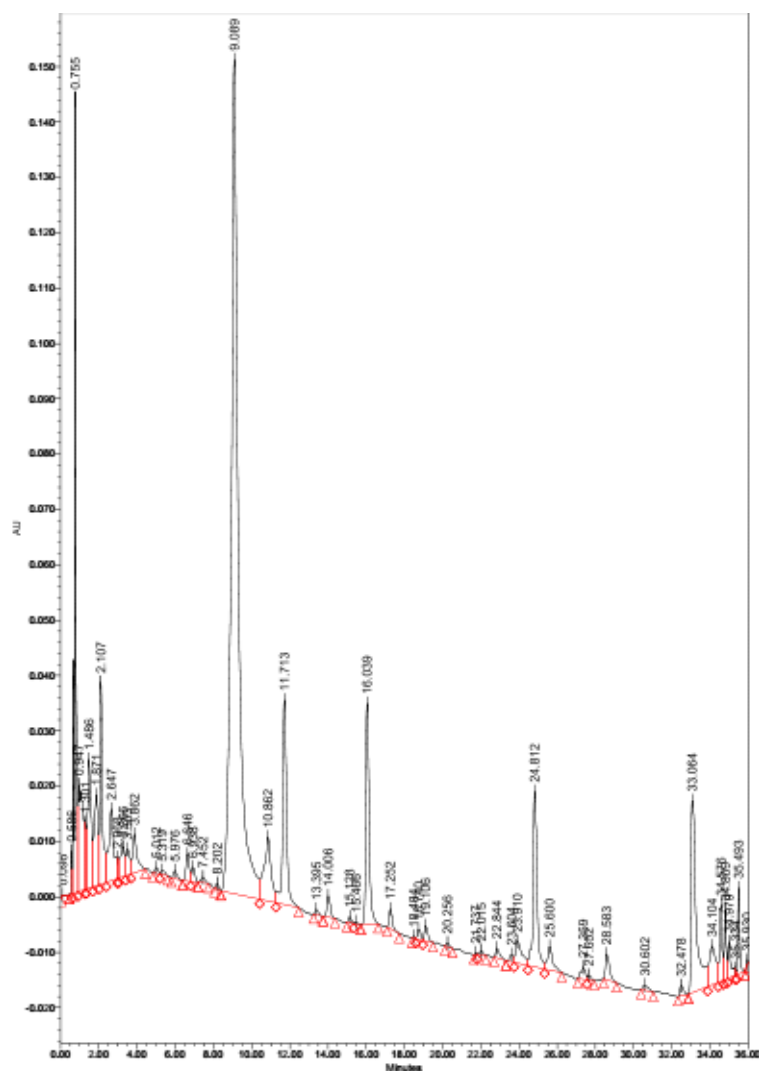


Figura 45 Injeção de EEtOH (0,5 mg/mL) no método desenvolvido para o sistema OLE. $V_{inj}=5\mu\text{L}$. Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters UV/Vis.

No método desenvolvido para análise pelo sistema OLE, também foi avaliado efeito da extração exaustiva na análise. Para isso, após a realização da primeira análise cromatográfica (Figura 46A), o fluxo foi interrompido e a pré-coluna desacoplada, uma vez que para este método é necessário controle de temperatura através de forno de coluna, e, pela existência de injetor automático, não há possibilidade de ligação direta do *holder* ao injetor. Em seguida, houve a limpeza e o condicionamento da coluna para uma segunda análise cromatográfica utilizando o mesmo *holder* da primeira análise. Após a observação de que a segunda extração com o OLE havia sido exaustiva, foi

cordialina possa ser perdida durante o processo de preparo de amostra, uma vez que ela se encontra em maior quantidade quando é analisado o material vegetal seco e moído, tendo a mesma observação para a substância marcada por uma seta nas duas análises. Pode ser também inferido que isso seja consequência do solvente extrator utilizado (etanol 70%), uma vez que nessa proporção aproximada de etanol no método, sob alta pressão, haveria uma maior eficiência na extração da substância.

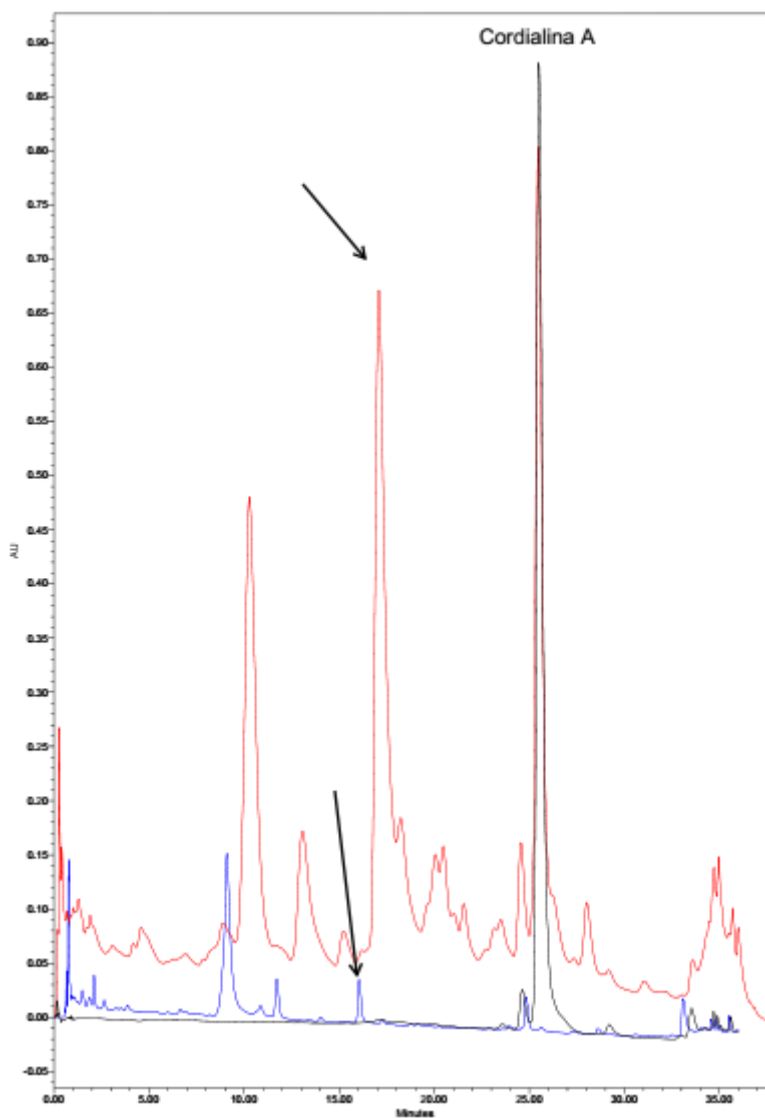


Figura 47 Método OLE-UPLC-UV. Sobreposição das análises do EEtOH (azul), material vegetal seco e moído (vermelho) e padrão cordialina A (preto). Coluna HSS T3. Método: 17-33% B (0-12 min), 33-80% B (12-32 min), 80-100% B (32-33 min), 100% (33-36min). Fase móvel ácido acético 2%. UPLC Acquity® Waters

11 Embriotoxicidade em zebrafish

O modelo de zebrafish foi utilizado para a verificação da toxicidade dos extratos EEt e EEtOH da erva-baleeira sobre o desenvolvimento embrionário. Com relação à sobrevivência, as três concentrações testadas para EEt resultaram em baixa taxa de sobrevivência dos embriões (figura 48), o que resultou diferença estatística comparado aos controles ($p < 0,05$). Em 24hpf, a maior concentração testada com EEt resultou em uma sobrevivência abaixo de 10%, tendo sido totalmente letal em 48hpf. A maior concentração (200 $\mu\text{g/mL}$) levou a morte de todos os embriões em 24hpf, enquanto que a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ resultou em morte de todos os embriões em 72hpf, e a concentração inicial (50 $\mu\text{g/mL}$) levou a morte de aproximadamente 40% dos embriões com 72hpf, tendo sido a CL_{50} (concentração letal 50%) de EEt estimada em 122,9 $\mu\text{g/mL}$, com 24hpf. Dessa forma, considerando o modelo de toxicidade aguda em embriões de zebrafish, pode ser observado que existem concentrações com baixo potencial de toxicidade e que demonstraram atividades biológicas *in vitro* no estudo de EEt, como DPPH e HOCl/OCl⁻. Apesar desta observação, são necessários estudos mais aprofundados para verificar o intervalo entre a dose eficaz e tóxica (janela terapêutica).

O etanol, utilizado na preparação dos extratos, foi testado como controle de veículo e não foi tóxico aos embriões, uma vez que a curva de sobrevivência resultante dessa exposição foi estatisticamente igual a do controle do meio embrionário.

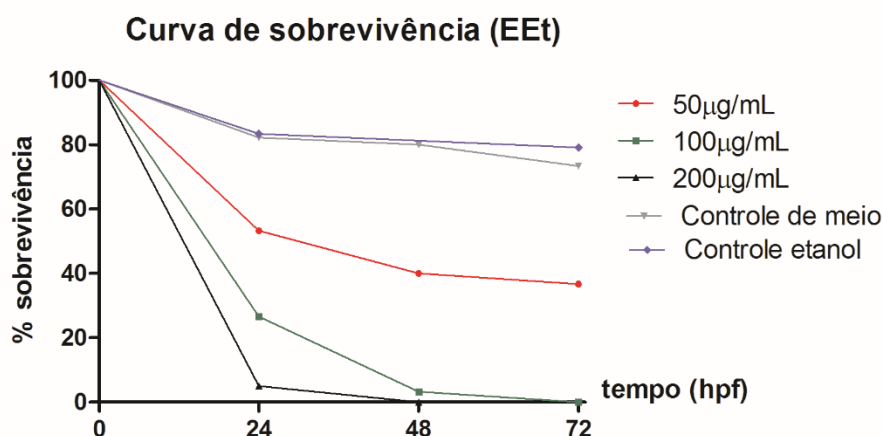


Figura 48 Curva de sobrevivência de embriões de zebrafish em 0, 24, 48 e 72hpf sujeitos à exposição ao EEt. Média em 2 ensaios independentes. hpf=horas pós fecundação. n=20 embriões. Hpf: horas pós fecundação.

Para EEtOH foi observada menor embriotoxicidade quando comparado ao EET (figura 49). O valor de CL_{50} (concentração letal 50%) encontrado para EEtOH em 24hpf foi de 164,3 $\mu\text{g/mL}$, ou seja, superior ao encontrado para EEt, sugerindo ser um extrato mais seguro com relação a toxicidade embrionária, o que torna interessante seu estudo tendo em vista seu uso popular.

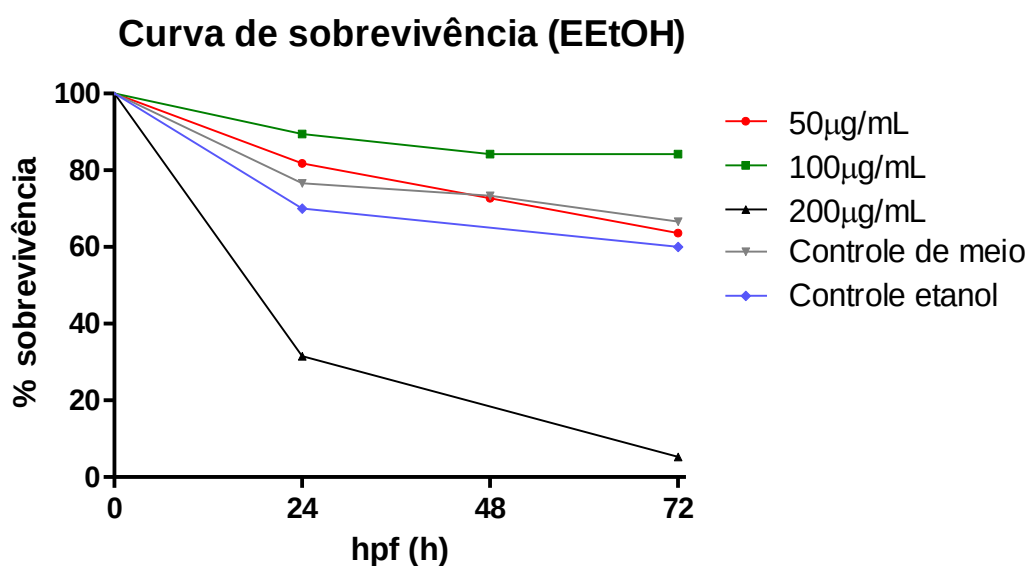


Figura 49 Curva de sobrevivência de embriões de zebrafish em 0, 24, 48 e 72hpf sujeitos à exposição ao EEtOH. Média em 2 ensaios independentes. hpf=horas pós fecundação. n=20 embriões. Hpf: horas pós fecundação.

Os controles do ensaio, tanto de meio embrionário quanto de veículo dos extratos (etanol), confirmam o desenvolvimento embrionário normal, sendo possível observar a presença de somitos, pigmentação e saco vitelino em 24hpf. Em 48hpf, podemos notar a pigmentação do corpo do embrião, enquanto em 72 hpf ocorre a eclosão da larva, na qual o saco vitelínico tem aparência normal e há formação correta de cauda (Figura 50).

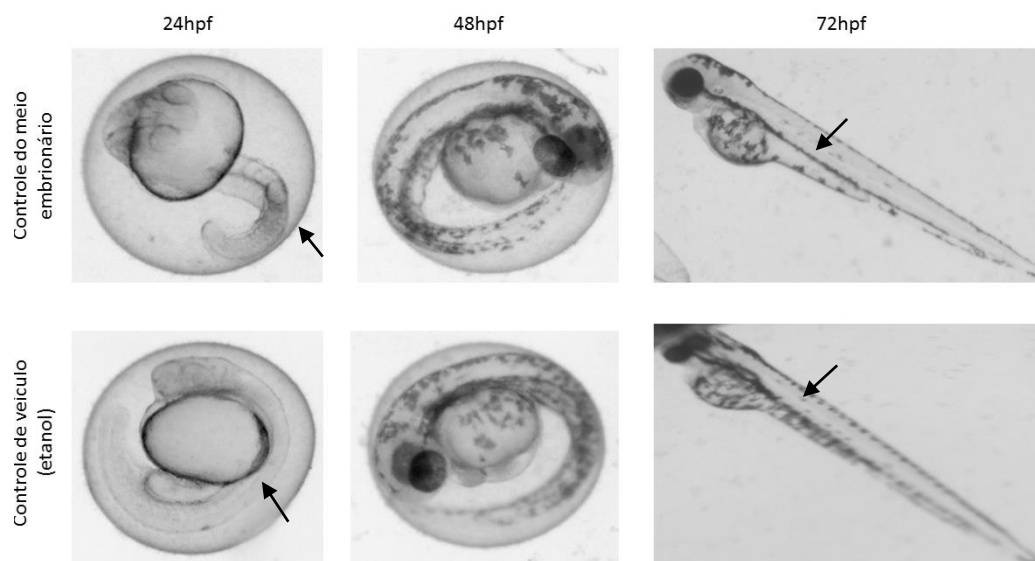


Figura 50 Controles de meio embrionário e de veículo (etanol) de ensaio de toxicidade em zebrafish em 24hpf, 48hpf e 72hpf. Os somitos são apontados pelas setas. Hpf: horas pós fecundação.

Os extratos EEt e EEtOH inviabilizaram parte dos embriões conduzindo a malformações e morte precoce em alguns casos. Com EEt, logo na menor concentração avaliada (50 $\mu\text{g/mL}$) em 24h, notou-se atraso no desenvolvimento de um embrião com a presença do saco vitelínico, apresentando malformação (Figura 51A). Em 48h, o embrião já não estava viável, apresentando-se coagulado (Figura 51B).

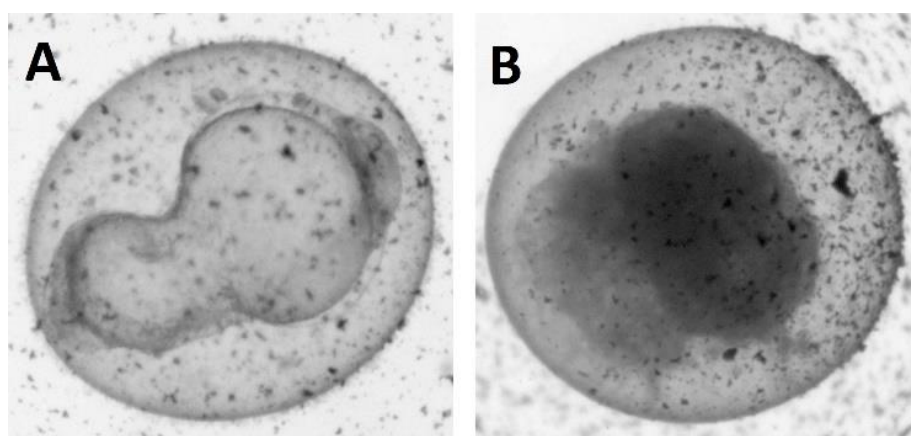


Figura 51 Embrião de zebrafish tratado com EEt (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentando malformação em 24hpf (A) e coagulação em 48hpf (B).

O tratamento com 100 $\mu\text{g/mL}$ de EEt se assemelhou a descrita com 50 $\mu\text{g/mL}$, sendo observados sinais de coagulação, atrasos no desenvolvimento,

como a não formação de somitos e de olhos, e outras malformações (figura 52). Para 48hpf e 72hpf em 100 $\mu\text{g/mL}$, e desde 24hpf em 200 $\mu\text{g/mL}$, não houve sobrevivência.

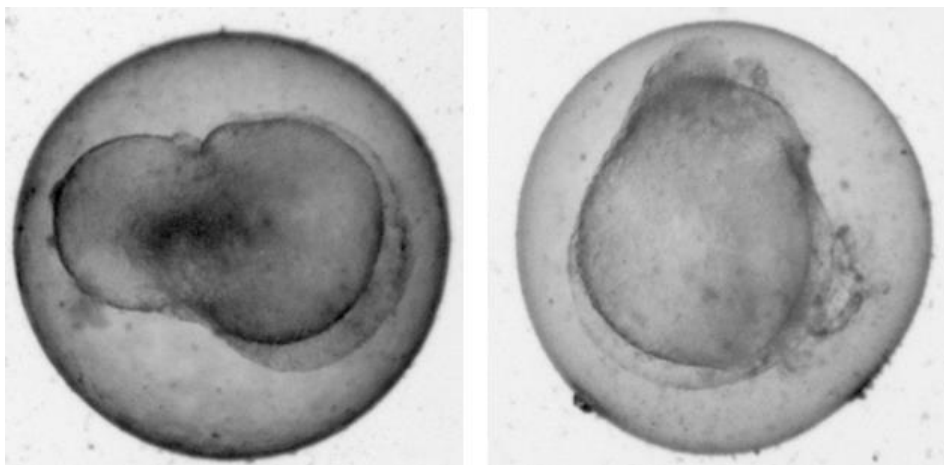


Figura 52 Embrião de zebrafish tratado com EEt (100 $\mu\text{g/mL}$) apresentando malformação em 48hpf. Hpf: horas pós fecundação.

Com relação aos tratamentos com EEtOH, com 50 $\mu\text{g/mL}$ em 24hpf foi observado um sinal sugestivo de edema pericardial e atraso no desenvolvimento de um embrião apesar da presença de somitos (figura 53A), e uma notável malformação do saco vitelino (figura 53B).

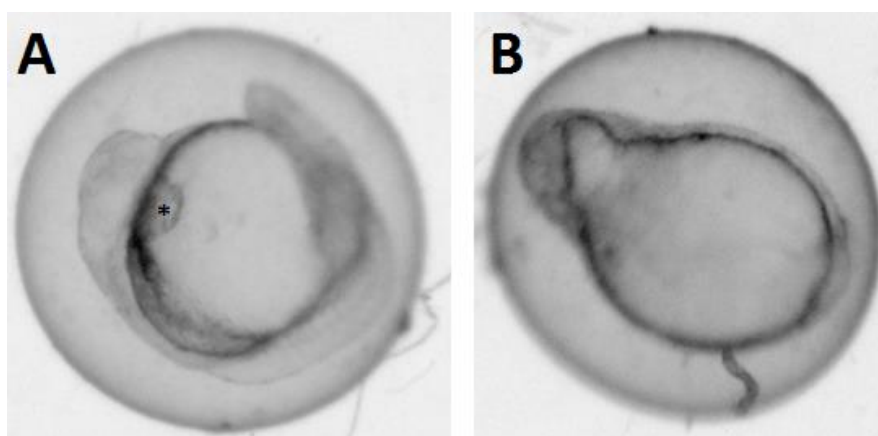


Figura 53 Embrião de zebrafish após 24hpf tratado com EEtOH (50 $\mu\text{g/mL}$) apresentando edema pericardial (*) e atraso no desenvolvimento em A e malformação de saco vitelino em B. Hpf: horas pós fecundação.

Alguns embriões sobreviventes com 72hpf e tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$ de EEtOH apresentaram edema pericardial (*) e malformação dos somitos, o que gerou curvatura espinhal acentuada e malformação caudal (figura 54).



Figura 54 Embrião de zebrafish após 72hpf tratado com EEtOH (50 µg/mL) apresentando edema pericardial (*), malformação de cauda e acentuada curvatura espinhal. Hpf: horas pós fecundação.

Em 24hpf e com o tratamento de 100 µg/mL de EEtOH, o embrião de zebrafish apresentou desenvolvimento normal, conquanto, em 48hpf várias alterações puderam ser observadas (Figura 55), tais como edema de saco vitelino e atraso em sua reabsorção (**), e edema de pericárdio (*). EEtOH, assim como EEt, induziu malformações do embrião.

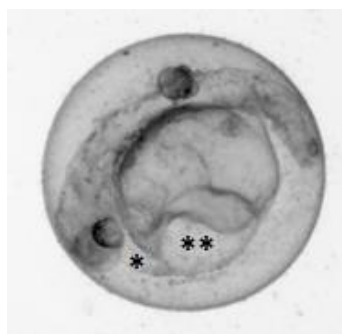


Figura 55 Embrião de zebrafish após 48hpf tratado com EEtOH (100 µg/mL) apresentando edema pericardial (*), edema de saco vitelino (**), ausência de somitos e de pigmentação. Hpf: horas pós fecundação.

Na máxima concentração avaliada (200 µg/mL), com 24hpf os embriões tratados com EEtOH apresentaram alterações como atraso no desenvolvimento e na reabsorção do saco vitelino (Figura 56A), deformação do saco vitelino, falta de botões oculares e hiperpigmentação (Figura 56B), edema

de saco vitelino e deformidade de cauda (Figura 56C), coagulação (Figura 56D) e coagulação e desintegração do embrião (Figura 56E).

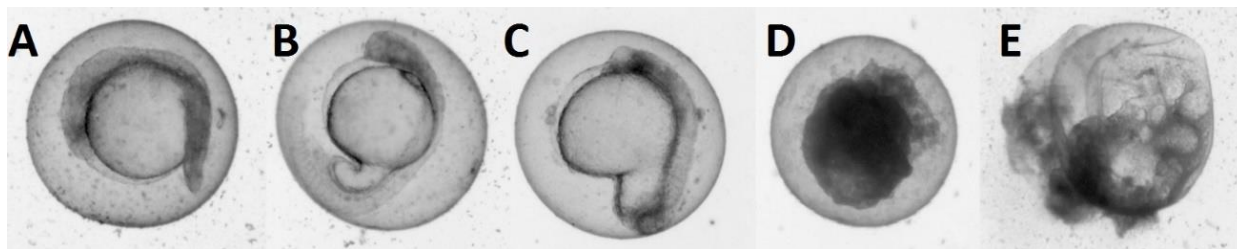


Figura 56 Embrião de zebrafish após 24hpf tratado com EEtOH (200 µg/mL) apresentando variadas malformações (A a C) e morte (D e E). Hpf: horas pós fecundação.

Em 48hpf, embriões tratados com EEtOH 200 µg/mL apresentaram ausência de pigmentação, ausência de botões oculares, edemas e outras malformações de saco vitelino ou coagulação (figura 57).

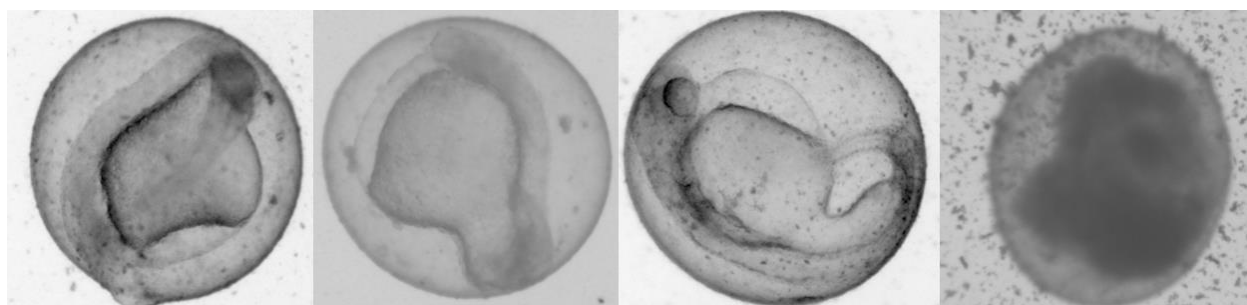


Figura 57 Embrião de zebrafish 48hpf tratado com EEtOH (200 µg/mL) apresentando variadas malformações e morte. Hpf: horas pós fecundação.

Na concentração de 200 µg/mL, em 72hpf, os embriões se apresentavam coagulados. De uma maneira geral, a partir da análise das curvas e das malformações, pode ser observado que EEtOH mostrou efeitos menos embriotóxicos. A sua composição química, de baixo teor de flavonas polimetoxiladas e menor quantidade de triterpenos que EEt, pode estar associada a estes efeitos, todavia, esta conclusão necessita de ensaios mais específicos e apurados. Por exemplo, de acordo com Pereira (2017), são 0,79% m/m de cordialina em EEt, e 0,69% m/m em EEtOH, nos dados obtidos por Romao (2016).

12 Ensaios antioxidantes

12.1 Ensaio com o DPPH•

Inicialmente, foi determinado o CE_{50} da quercetina, um metabólito secundário com hidroxilas ligadas ao anel B flavonoídico e de reconhecida atividade antioxidante (figura 58). Para este ensaio, a porcentagem de captura do radical foi calculada de acordo com a equação a seguir:

$$\% \text{ Inibicao} = \frac{A_{\text{máxima}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{máxima}}} \times 100,$$

em que % Inibição = porcentagem de captura da espécie reativa; $A_{\text{máxima}}$ = absorbância da espécie reativa na ausência de amostra; A_{amostra} = absorbância da espécie reativa na presença de amostra.

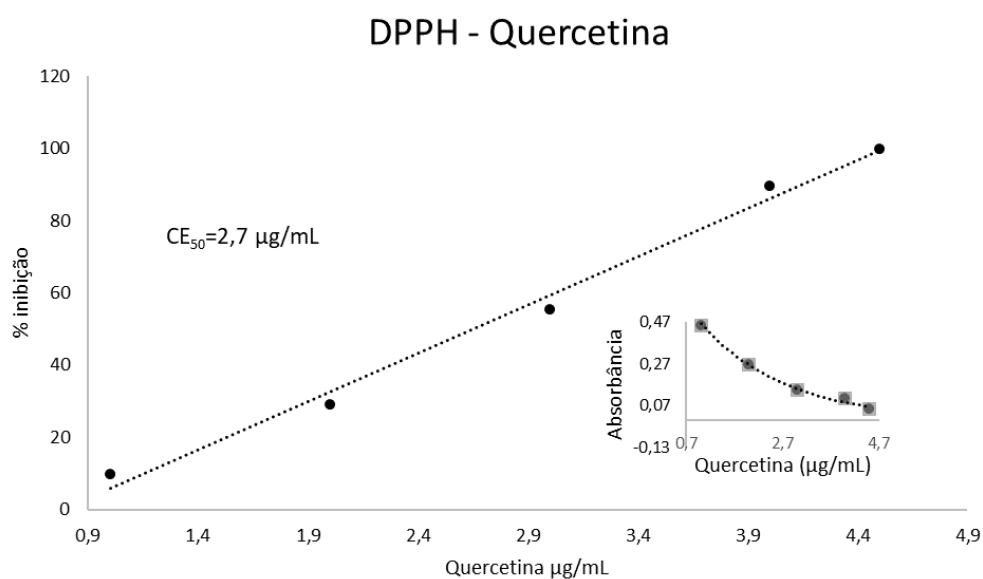


Figura 58 Captura do radical DPPH• pela quercetina (µg/mL) em etanol. $\lambda=517$ nm. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

De acordo com a equação da reta obtida, a concentração de quercetina suficiente para capturar 50% dos radicais DPPH (CE_{50}) equivale a 2,7 µg/mL, o que vai ao encontro com Chua et al. (2008), que obteve CE_{50} de 2,2 µg/mL.

Também foram avaliadas diferentes concentrações de EEt (figura 59) e EEtOH (figura 60).

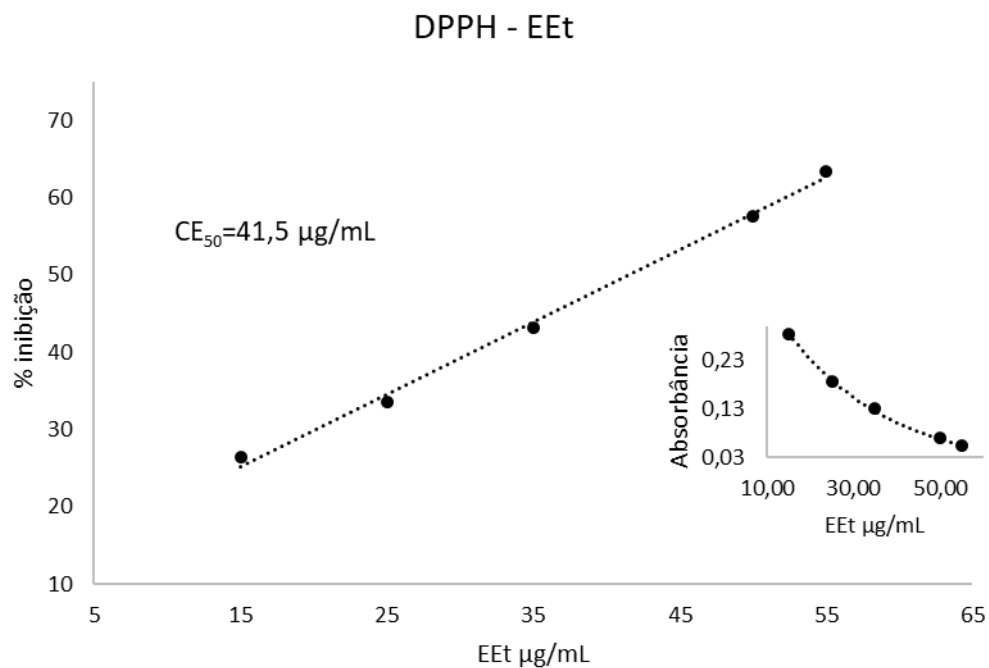


Figura 59 Captura do radical DPPH• pelo EEt ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=517 \text{ nm}$. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

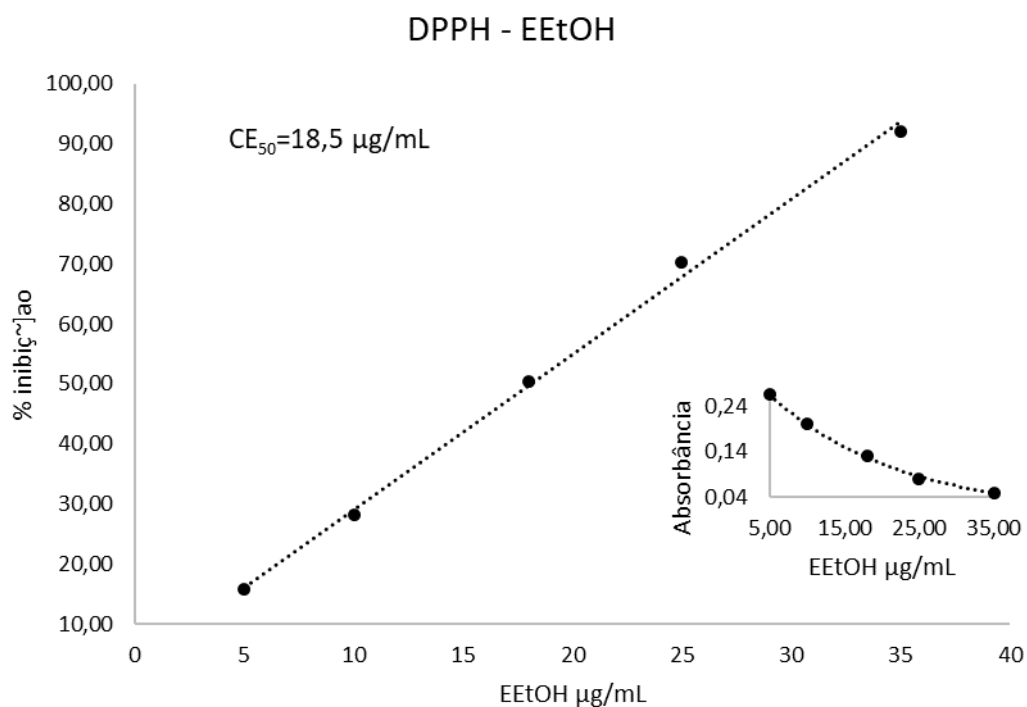


Figura 60 Captura do radical DPPH• pelo EEtOH ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=517 \text{ nm}$. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

Utilizando a equação da reta, foi determinado o valor de CE_{50} de 41,5 $\mu\text{g/mL}$ para EEt e de 18,5 $\mu\text{g/mL}$ para EEtOH, ainda coerentes com os resultados encontrados por Romão (2016) de 35,8 $\mu\text{g/mL}$ e 13,4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A influência dos solventes utilizados para a extração indubitavelmente afeta o tipo e a quantidade de metabólitos secundários que são concentrados. Além disso, a técnica para obtenção dos extratos decerto também interfere neste sentido. Michelin et al (2011) e Santi et al (2014) demonstraram estes efeitos em seus trabalhos comparando a atividade de sequestro de $\text{DPPH}^\bullet$ de extratos obtidos por diferentes métodos e solventes.

Ainda, foi avaliada a capacidade de sequestro dos radicais $\text{DPPH}^\bullet$ por 2 flavonas polimetoxiladas (Substância 1 e Substância 2) e por uma fração que continha apenas as 2 flavonas juntas (PPt, figura 61). O CE_{50} para o PPt (25,2 $\mu\text{g/mL}$) foi aproximadamente metade do encontrado para a substância 1 (40,5 $\mu\text{g/mL}$, figura 62), sendo que estas duas últimas amostras superaram a captura dos radicais quando comparadas ao EEt, cujo CE_{50} foi de 41,5 $\mu\text{g/mL}$.

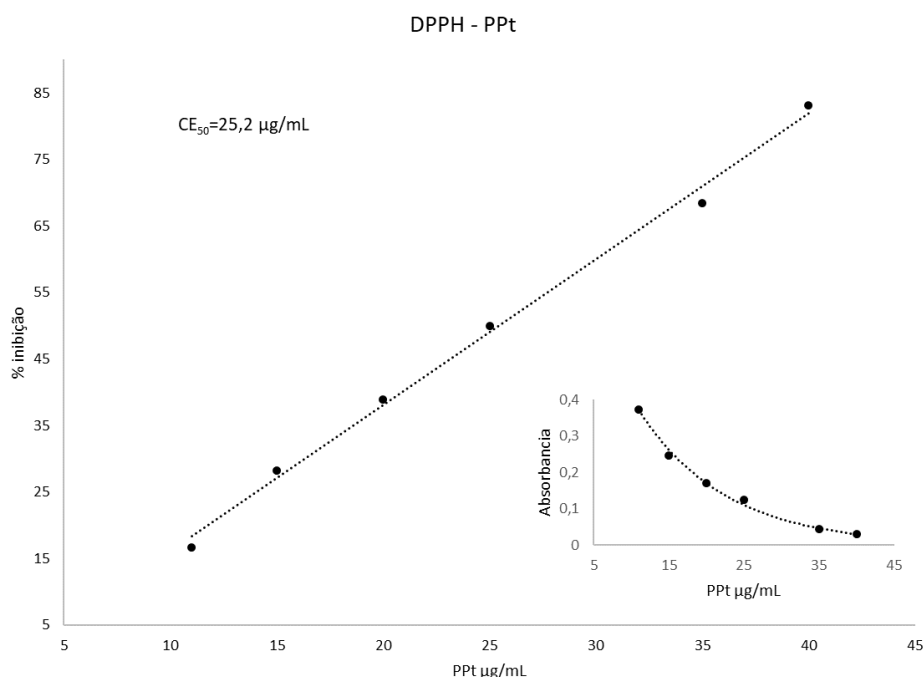


Figura 61 Captura do radical $\text{DPPH}^\bullet$ pelo PPt ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=517 \text{ nm}$. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

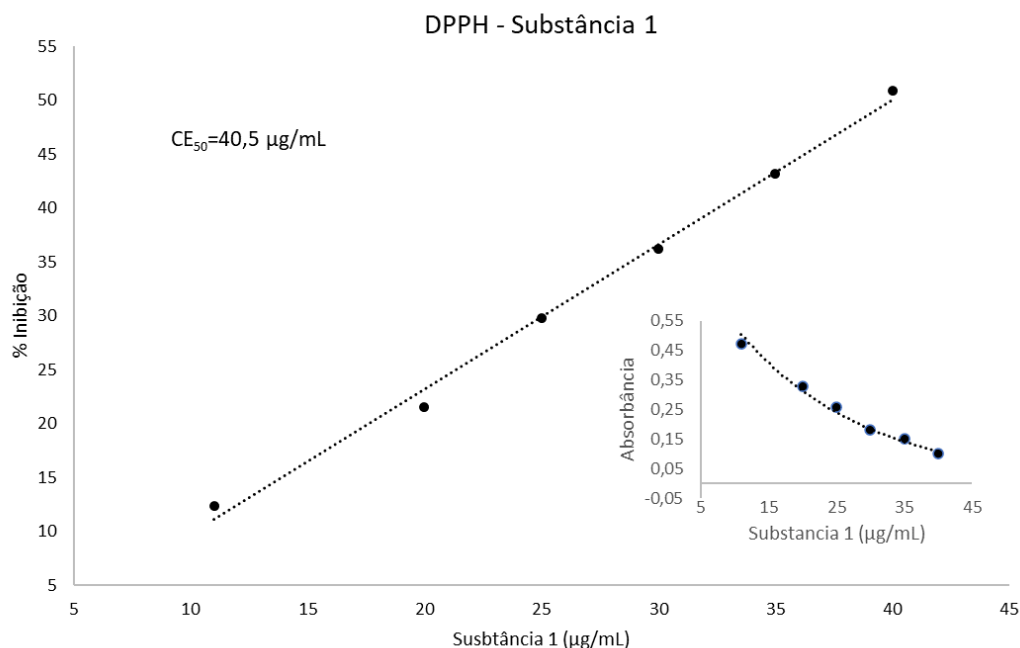


Figura 62 Captura do radical DPPH• pela substancia 1 (µg/mL) em etanol. $\lambda=517$ nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

Nas concentrações avaliadas (11,0, 20,0, 25,0, 30,0, 35,0, 40,0 e 45,0 µg/mL), não foi atingido o CE₅₀ para a substância 2. Apesar da semelhança estrutural com a substância 1, é provável que sua maior atividade de sequestro de DPPH• ocorra quando em sinergismo com a substância 1, justificando a maior efetividade de PPT no ensaio com o referido radical.

12.2 Ânion radical superóxido (O₂^{•-})

A reação entre PMS e NADH, seguida pela reação com o NBT promovem a síntese de formazana, que possui coloração violeta. Como padrão para esta análise, mais uma vez, foi utilizada a quercetina (figura 63), e a CE₅₀, de acordo com a equação da reta, equivale a 37,5 µg/mL.

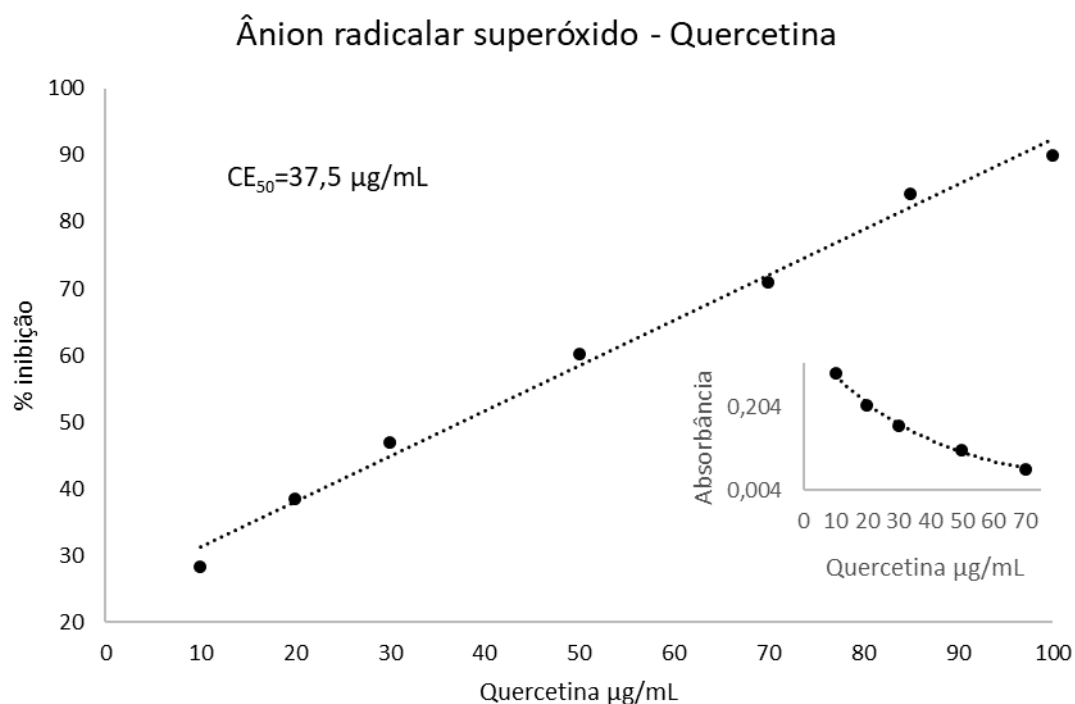


Figura 63 Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pela quercetina ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=560\text{ nm}$. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

A literatura científica fornece dados experimentais a respeito do sequestro do $O_2^{\bullet-}$ em diferentes métodos. Em um método modificado utilizando NBT, foi encontrado como CE₅₀ o valor de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (YUTING et al, 1990). Velloso et al (2011) encontrou CE₅₀ de 7,55 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que Romão (2016), utilizando a mesma metodologia, obteve o valor de CE₅₀ de quercetina em 21,2 $\mu\text{g/mL}$.

Com relação aos extratos, nas concentrações testadas apenas EEtOH (figura 64) atingiu a CE₅₀ (257,0 $\mu\text{g/mL}$). Apesar dos valores superiores aos alcançados com o DPPH $^{\bullet}$, o extrato hidroetanólico continuou a se mostrar com maior potencial antioxidante.

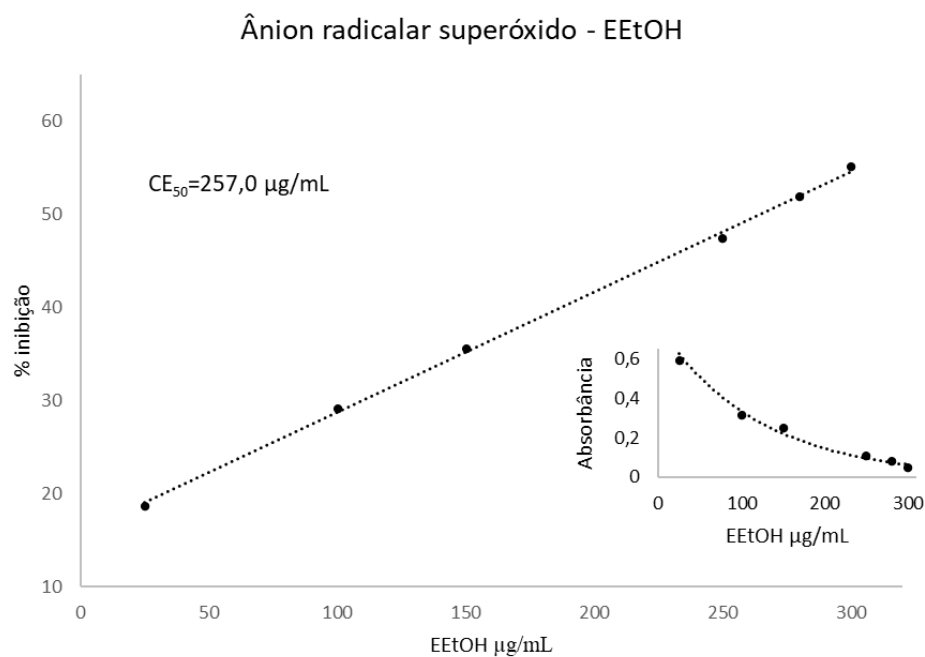


Figura 64 Inibição (captura) do $O_2^{\bullet -}$ pelo EEtOH (µg/mL) em etanol. $\lambda=560\text{nm}$. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

Para PPt obteve-se um valor menor de CE₅₀ do que para a substância 1 (174,1 µg/mL e 291,0 µg/mL, respectivamente, figuras 65 e 66), e, tal como no ensaio com DPPH $^{\bullet}$, a substância 2 não atingiu CE₅₀ nas concentrações avaliadas (100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0 e 350 µg/mL).

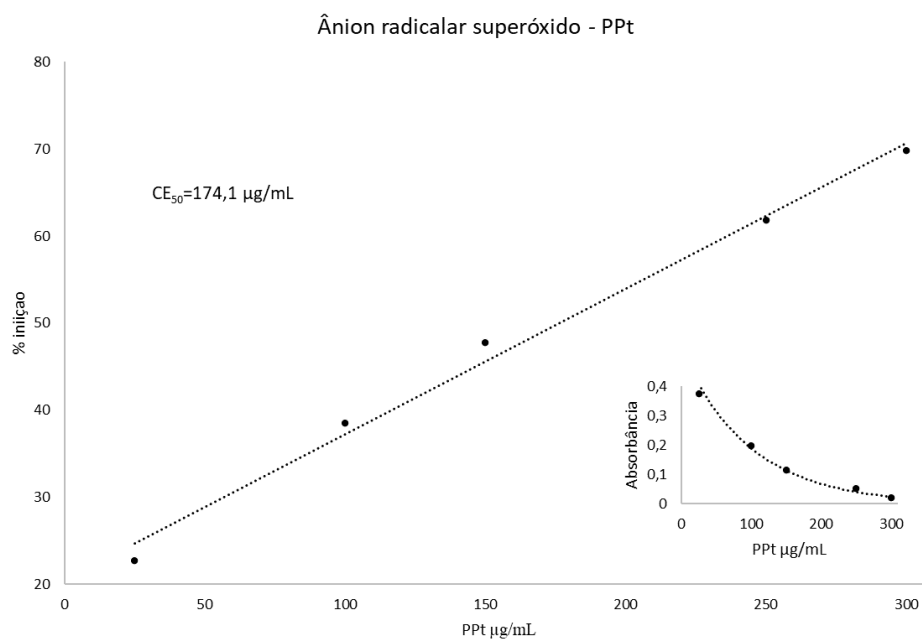


Figura 65 Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pelo PPT (µg/mL) em etanol. $\lambda=560$ nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

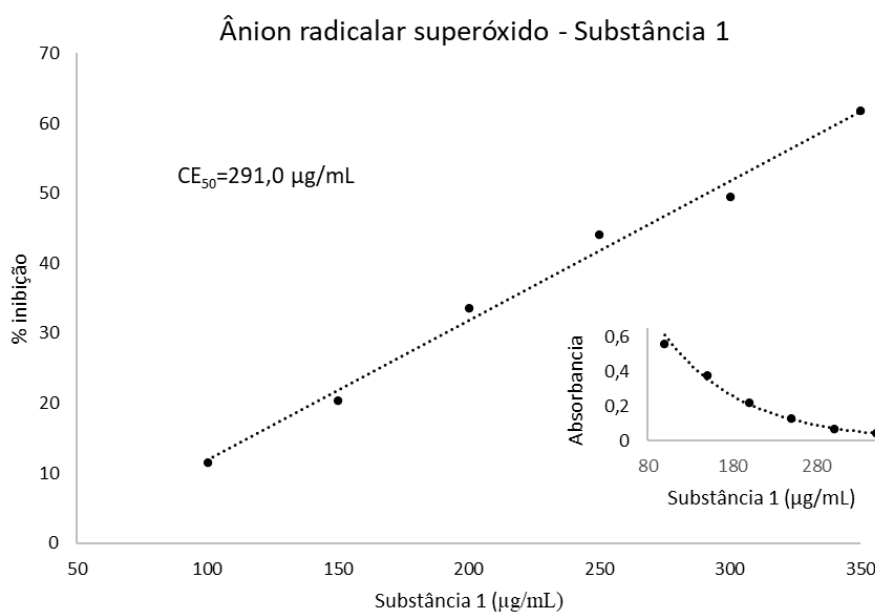


Figura 66 Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ pela substância 1 (µg/mL) em etanol. $\lambda=560$ nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

12.3 HOCl/OCl⁻

A quercetina (figura 67) se mostrou com potencial antioxidante bastante superior ($CE_{50}=0,2 \mu\text{g/mL}$) ao PPt ($CE_{50}=2,7 \mu\text{g/mL}$, Figura 68) e substância 1 ($CE_{50}=3,5 \mu\text{g/mL}$, Figura 69).

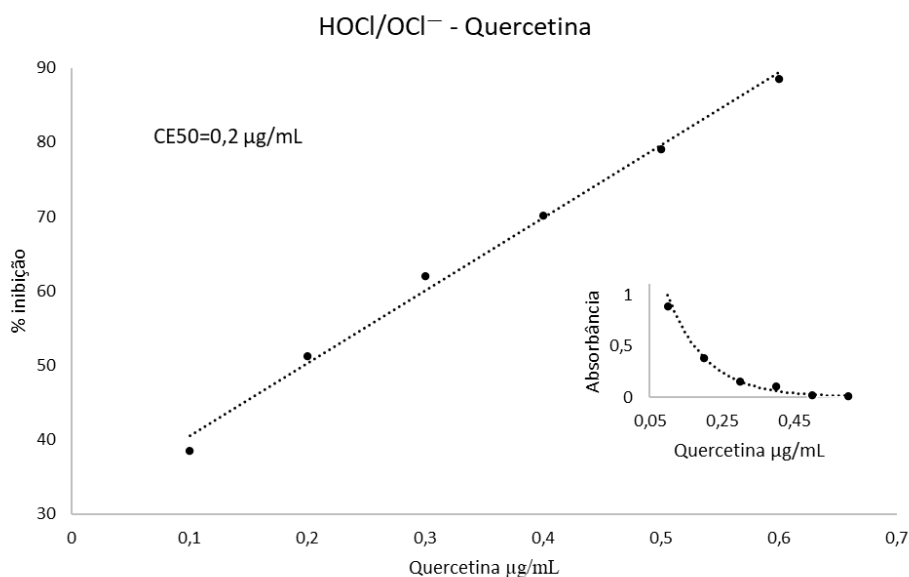


Figura 67 Inibição (captura) de HOCl/OCl⁻ pela quercetina ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=655$ nm. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

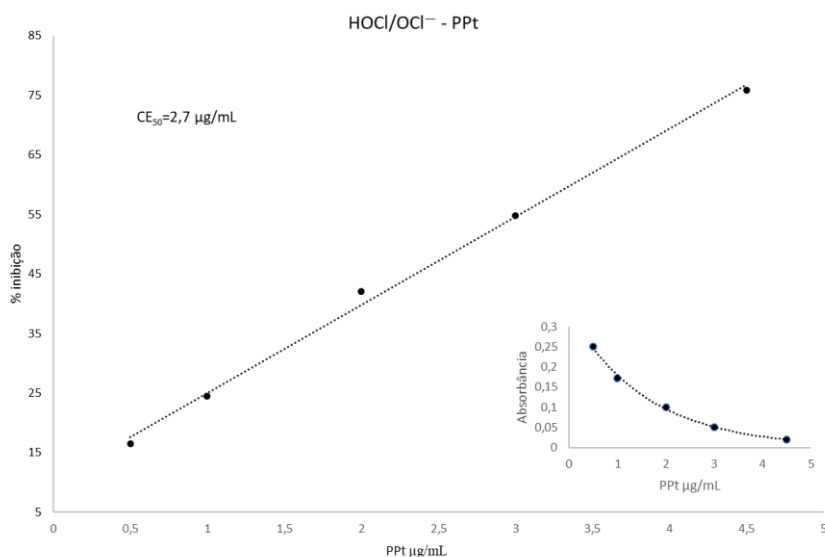


Figura 68 Inibição (captura) de HOCl/OCl⁻ pelo PPt ($\mu\text{g/mL}$) em etanol. $\lambda=655$ nm. CE_{50} : concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

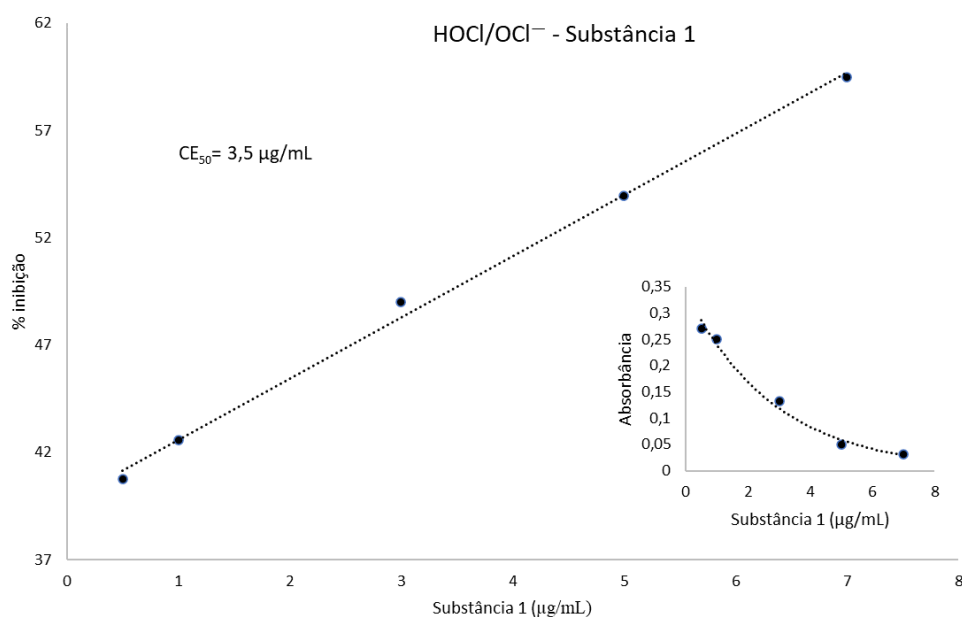


Figura 69 Inibição (captura) de HOCl/OCl⁻ pela substância 1 (μg/mL) em etanol. λ=655nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

Ao contrário do que foi observado com o ânion radical superóxido, tanto EEt quanto EEtOH atingiram os valores de CE₅₀ nas concentrações avaliadas (figuras 70 e 71), sendo 3,4 e 3,6 μg/mL, respectivamente.

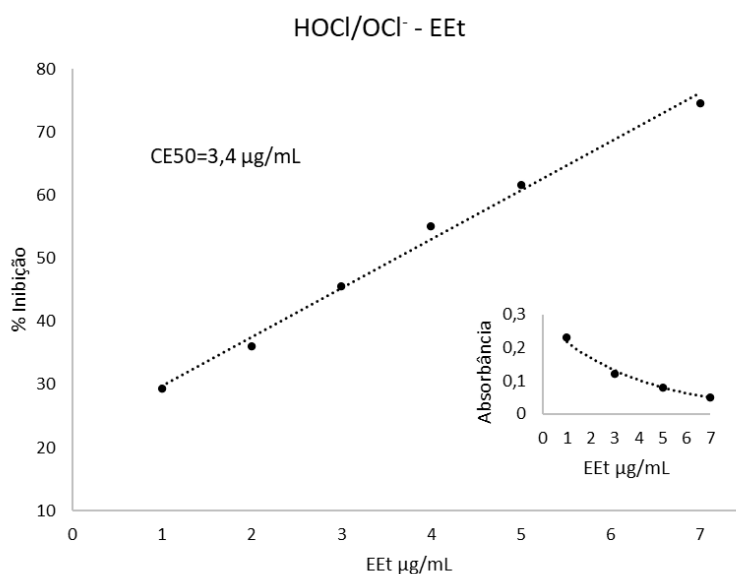


Figura 70 Inibição (captura) de HOCl/OCl⁻ pelo EEt (μg/mL) em etanol. λ=655 nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

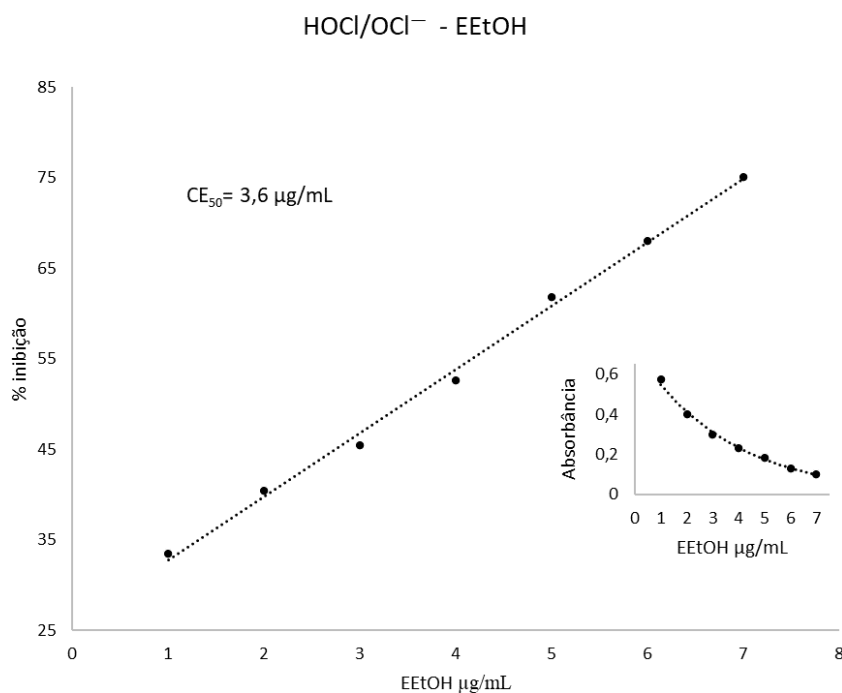


Figura 71 Inibição (captura) de HOCl/OCl⁻ pelo EEtOH (μg/mL) em etanol. $\lambda=655$ nm. CE₅₀: concentração necessária para capturar 50% dos radicais.

A substância 2 não atingiu os valores de CE₅₀ nas concentrações avaliadas (0,5, 1,0, 3,0, 5,0, e 7,0 μg/mL).

A tabela 10 compila os diferentes resultados dos ensaios de atividade antioxidante realizadas com os extratos e flavonas polimetoxiladas. Os extratos mais polares, pela maior quantidade de açúcares redutores, tendem a apresentar um maior efeito antioxidante, conforme observado na tabela a seguir.

Tabela 10 Valores de CE₅₀ para as diferentes amostras em diferentes ensaios de atividade antioxidante (DPPH, O₂^{•-} e HOCl/OCl⁻), e do controle positivo (quercetina). Valores expressos em μg/mL.

Amostra	DPPH	O ₂ ^{•-}	HOCl/OCl ⁻
Quercetina	2,7	37,5	0,2
EEt	41,5	Não atingido	3,4
EEtOH	18,5	257,0	3,6
PPt	25,2	174,1	2,7
Substância 1	40,5	291,0	3,5

Substância 2	Não atingido	Não atingido	Não atingido
--------------	--------------	--------------	--------------

A quercetina, padrão escolhido pela sua estrutura flavonoídica, necessitou de menores concentrações para a captura de 50% dos radicais nos diferentes ensaios. A mistura das substâncias 1 e 2, designada como PPt, obteve uma capacidade de captura dos radicais melhor que seus componentes isolados. A substância 1 teve um melhor resultado antioxidante que o extrato EEt na captura de radicais DPPH. Apesar da substância 2 não ter atingido o CE_{50} dentro das concentrações avaliadas nos ensaios antioxidantes, é possível que, em maior concentração dentro da mistura PPt, e em sinergismo com a substância 1, tenha colaborado para o resultado apresentado pela mistura. À exceção do ensaio com $HOCl/OCl^-$, EEtOH apresentou melhores resultados antioxidantes que EEt.

13 Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória

Para a realização deste ensaio, foram selecionadas uma amostra de cada classe (flavona e triterpeno). Em vista disso, foram selecionadas a cordialina A e a flavona com maior atividade antioxidante (substância 1). Apesar do uso popular, comercial e da literatura científica demonstrarem a importância do uso da erva-baleeira enquanto anti-inflamatório, os resultados obtidos com os kits Cayman não representaram este potencial de atividade. Os valores obtidos para inibição de COX1, COX2 e fosfolipase A2 foram bastante inferiores aos apresentados pelo controle (tabela 11).

Tabela 11 Porcentagem de inibição das amostras e controles positivos sobre as enzimas COX e sobre sPLA₂, e respectivos CI_{50} .

Porcentagem de inibição						
	COX 1	CI_{50} µg/ml	COX 2	CI_{50} µg/ml	sPLA ₂	CI_{50} µg/ml
Cordialina A (100µg/mL)	27,2		22,2		10,3	
Cordialina A (50µg/mL)	20,5	$65,3 \pm 9,2$	10,3	$67,8 \pm 8,4$	6,1	NA
Cordialina A (10µg/mL)	8,3		3,3		2,8	
Substancia 1 (100µg/mL)	21,5		17,8		9,3	
Substancia 1 (50µg/mL)	10,3	$71,2 \pm 8,9$	8,3	$72,28 \pm 8,4$	4,89	NA
Substancia 1 (10 µg/mL)	4,5		2,7		1,9	
Diclofenaco (100µg/mL)	100	$0,09 \pm 0,02$	100	$0,01 \pm$	100	$0,09 \pm$

Diclofenaco (50µg/mL)	100		100	0,03	100	0,02
Diclofenaco (10µg/mL)	99,4		98,7		99,8	
Tioeteramida(100µg/mL)	100	0,09	100	0,012 ±	100	0,08 ±
Tioeteramida (50µg/mL)	100	±0,02	100	0,03	100	0,02
Tioeteramida (10µg/mL)	99,4		98,7		99,8	

NA: não atingido.

A cordialina A mostrou maior inibição das enzimas COX do que a flavona avaliada. Em COX1, promoveu maior porcentagem de inibição das enzimas quando comparado às demais, porém não atingiu o valor de CI_{50} no ensaio da $sPLA_2$. A baixa atividade da substância 1, nestes ensaios, não exclui a possibilidade de que a substância tenha atividade anti-inflamatória por outras vias de atuação. O resultado, além da possibilidade da ação em outras vias anti-inflamatórias, pode ser consequência da ausência de um possível sinergismo entre os componentes do extrato. Considerando que a substância 1 apresentou atividade antioxidante, é possível ainda que colabore para a atividade anti-inflamatória da *C. verbenacea* através do bloqueio dos efeitos lesivos dos radicais livres liberados durante o processo inflamatório.

A literatura científica também traz muitos dados a respeito da atividade anti-inflamatória dos constituintes da espécie. Contudo, cabe ser lembrado que existem ainda outros mecanismos para o controle da inflamação, e que possam ser alvo dos componentes metabólicos da erva-baleeira. A artemetina, por exemplo, mostrou atividade na proteção da função endotelial pela modulação da liberação de óxido nítrico pelas vias de AMPc/PKA e fosfolipase C, e protegeu contra injúrias causadas por estresse oxidativo as células endoteliais da artéria coronária de porcos (GROSSINI et al., 2015).

14 Conclusões

As principais conclusões obtidas a partir desse trabalho estão elencadas na forma de tópicos a seguir:

- O fracionamento de fração do extrato etanólico permitiu que fossem obtidas outras frações simplificadas a partir das quais foram isolados constituintes de *Cordia verbenacea*, sendo dois triterpenos damarânicos e duas flavonas polimetoxiladas, que puderam ser analisadas e purificadas para a avaliação

biológica *in vitro* dos metabólitos secundários, e pode ser feita a comparação com a atividade demonstrada pelos extratos.

- As análises por OLE-HPLC/ OLE-UPLC apresentaram boa resolução e maior quantidade de picos detectados quando comparado ao método tradicional de análise por HPLC-UV.
- Foi possível desenvolver método de análise em UPLC e em OLE-UPLC, e validar o método em UPLC, bem como quantificar o ácido rosmarínico através da curva obtida.
- De acordo com a métrica *Agree*, a análise por HPLC convencional obteve pontuação 0,59, por UPLC 0,67 e, por OLE-UPLC, 0,86. Isto leva a conclusão de que o último método citado atende melhor pontos relacionados ao conceito de química verde.
- O EEtOH apresentou melhor atividade antioxidante quando comparado a EEt, o que coaduna-se com o fato do extrato EEtOH deter maior quantidade de compostos fenólicos, comprovado no teste de fenólicos totais.
- Em todos os ensaios antioxidantes, a substância 2 (artemetina) não atingiu os valores de CE_{50} , enquanto que a mistura das substâncias 1 e 2, talvez por ação sinérgica, demonstrou potencial antioxidante em todos os teste superior a substância 1 isoladamente.
- Apenas no ensaio de $HOCl/OCl^-$, EEt demonstrou ser mais antioxidante que EEtOH.
- Na avaliação da atividade anti-inflamatória, cordialina A foi superior na inibição de COX1, COX2 e sPLA2 quando comparado à substância 1, todavia sua atividade foi constatada em concentrações bastante superiores às dos padrões utilizados.
- Toxicidade com zebrafish: pode ser observado que existem concentrações dos extratos com baixa toxicidade e boa atividade antioxidante, como é o caso de 50 mg/mL do de EEtOH, que manteve cerca de 80% dos embriões vivos com 24hpf, e apresentou CE_{50} de 18,5 ug/mL no ensaio DPPH. Apesar da homologia genética com os seres humanos, o ensaio não descarta a necessidade de avaliação de outras concentrações e em outros modelos de estudo.

- Embriotoxicidade: Nas concentrações das amostras verificadas, foi observada a presença de malformações ou morte, devendo existir cuidado no manejo destas substâncias e estudos de segurança, principalmente no que diz respeito ao uso por estantes e lactantes.
- EEtOH demonstrou mais atividade antioxidante e menor toxicidade, o que é interessante ao considerarmos que há um grande uso popular da espécie na forma de garrafadas.
- EEtOH tem quantidade superior de compostos fenólicos quando comparado ao extrato EEt, e menor teor os triterpenos isolados.

Referências

ABDUSSALAM-MOHAMMED, W.; ALI, A.Q.; ERRAYES, A. O. Green chemistry: principles, applications, and disadvantages. **Chemical Methodologies**, v. 4, n. 4, p. 108-423. 2020.

ACHÉ. Aché, 2020. Apresentação do produto. Disponível em: <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-aerossol-388/> ou <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-creme-4/>. Acesso em: 14 dez 2020.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para a determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210. 2010.

BAYEUX, M. C.; FERNANDES, A. T.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Evaluation of the antiedematogenic of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. Pharmacologyc. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 35, n. 10, p. 229-1232, 2002.

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

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

BHUSNURE, O. G. Drug target screening and its validation by zebrafish as a novel tool. **Pharmaceutica Analytica Acta**, v. 6, 10, p. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política e programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. 1ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 190p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada RDC - Nº 166. Dispõe sobre a validação de métodos

analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, nº141, de 25 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. 2ª edição. Brasília: Anvisa, 2021. 223p.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH. 2012.

CAYMAN CHEMICAL. COX (ovine) inhibitor screening assay kit, (Item No.560101). Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/560101.pdf>>. Acesso em: 9 ago 2020. 2017a.

CAYMAN CHEMICAL. sPLA2 (type V) inhibitor screening assay kit (Item No.10004883). Disponível em: <<https://www.caymanchem.com/pdfs/10004883.pdf>>. Acesso em: 09 ago 2020. 2017b.

CHUA, M.T.; TUNG, Y.T.; CHANG, S.T. Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1918–1925. 2008.

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.

DE CARVALHO JR, P.M.; RODRIGUES, R.F., SAWAYA, A.C.; MARQUES, M.O.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3), p. 297–301. 2004.

DURACKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, v. 59, n. 4, p. 459-469. 2010.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Current Drug Targets**. v. 12, n. 1, p.122-132. 2011.

FERREIRA, V.G.; LEME, G.M.L.; CAVALHEIRO, A.J.; FUNARI, C.S. Online extraction coupled to liquid chromatography analysis (OLE LC): eliminating traditional sample preparation steps in the investigation of solid complex matrices. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 17, p. 8421-8427. 2016.

FAIBICHER, A. **Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de metabólitos secundários em extrato de folhas de Varronia urassavica Jacq. (erva-baleeira)**. 46 p. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciência Farmacêuticas). Unesp, Araraquara, 2021..

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle: Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 3, p. 475-482, 2007.

GUILLARME, D.; NGUYEN, D.T.T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: application to short columns packed with small particle: Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 2, p. 430-440, 2008.

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

GROSSINI, E.; MAROTTA, P.; FARRUFFIO, S.; SIGAUDO, L.; QOQAICHE, F.; RAINA, G.; DE GIULI, V.; MARY, D.; VACCA, G.; POLLASTRO, F. Effects of artemetin on nitric oxide release and protection against peroxidative injuries in porcine coronary artery endothelial cells. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 9, p. 1339-1348. 2015.

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.

HOWE, K.; CLARK, M. D.; STEMPLE, D. L. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498-503. 2013.

INUMA, M.; MATOBA, Y.; TANAKA, T.; MIZUNO, M. Flavonoids Synthesis. I. Synthesis and Spectroscopic properties of flavones with two hydroxy an Five methoxy groups at C-2', 3', 4', 5, 6, 6', 7 and C-2', 3, 4', 5, 5', 6, 7. **Chem. Pharm. Bull**, v.34, n. 4, p. 1656-1662, 1986.

KIMMEL, C. B.; BALLARD, W. W.; KIMMEL, S. R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T. F. Stages of embryonic development of the Zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 203, p.253-310. 1995.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; ARRIGONI-BLANK, M. F. 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.

LEE, J.; JUNG, E.; KIM, Y.; LEE, J.; PARK, J.; HONG, S.; HYUN, C.; PARK, D.; KIM, Y.S. Rosmarinic acid as a downstream inhibitor of IKK-B in TNF- α induced upregulation of CCL11 and CCR3. **British Journal of Pharmacology**, 148(3), p.366-375. 2006.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, 26, 1. 2003.

LIMA Z. P.; SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M. *Byrsonima fagifolia*: an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **J. Ethnopharmacol.**, 120(2), p.149-160. 2008.

LINS,A.P.; ALVARENGA, M. A. Flavonóides de *Cordia verbenacea*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, 32, Supl., p. 457. 1980.

LINS, A.P.; ALVARENGA, M. A.; GOTTLIEB, O.K.; OLIVEIRA, F. Annual Meeting Brazilian Society for Advancement of Science. Rio de Janeiro. Abstract 34-D.2.5. 1980¹.

MAES, J.; VERLOOY, L.; BUENAFE, O. E.; WITTE, P. A.; ESGUERRA, C. V.; CRAWFORD, A. D. Evaluation of 14 solvents and carriers for screening applications in zebrafish embryos and larvae. **Plos One**, v. 7, n. 10, e43850. 2012.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC: Uma abordagem atual. Desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4 n. 3, p. 197-207. 2012.

MARTIM, J.K.P.; MARANHO, L.T.; COSTA-CASAGRANDE, T.A. Review: Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti inflammatory, antimicrobial and healing product. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, e113300, 2021.

MATOS, D.O.; TIRONI, F. L.; MARTINS, D. H. N.; FAGG, C. W.; JUNIOR, N. L.; SIMEONI, L. A.; MAGALHAES, P. O.; SILVEIRA, D.; FONSECA0BAZZO, Y. M. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p.857-864. 2015.

MATTILA, H.; KHOROBRYKH, S.; HAVURINNE, V.; TYYSTJÄRVI. Reactive oxygen species: reactions and detection from photosynthetic tissues. **Photochemistry and Photobiology**, v. 152, Pt B, p-176-214. 2015.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G. F.; VITOR, C. E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T. L.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. 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, n. 5, p. 618-627, 2007.

MICHELIN, E. M. Z.; WIESE, L. P. L.; FERREIRA, E. A.; PEDROSA, R. C.; FERREIRA, S. R. S. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC. obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, v.56, n. 1, p. 89-96. 2011.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

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

NEWMAN, D.J, CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p.770-803. 2020.

NOYES, P.D.; GARCIA, G.R.; TANGUAY, R.L. Zebrafish as an in vivo model for sustainable chemical design. **Green Chemistry**, v.18, n. 24, p. 6410–6430, 2016.

OECD. Guideline for testing of chemicals, 236. Fish Embryo Acute Toxicity (FET), 2013.

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, n. 2, p. 323- 333, 2006.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W. TOBISZEWSKI, M. AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, v. 92, p. 100076-100082. 2020.

PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; SILVA, C.C.M.; FERRO,D.; CARMONA, F.;CESARI, I.M.; BARBOSA, M.G.H. 2014. Formulário de fitoterápico da natureza. 2014. 324p.

PEREIRA,J.A.S. **Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia verbenacea* DC.** 2017. 156 páginas. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Unesp. Araraquara. Araraquara/SP.

PETERSEN, M.; SIMMONDS,M. S. J. Rosmarinic Acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125. 2003.

PŁOTKA, M. TOBISZEWSKI, A. SULEJ, M. KUPSKA, T. GORECKI, J. NAMIE ESNIK. Green chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p.1-20, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Range & Dale – Farmacologia**. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RIBEIRO, F.V.; BARRELLA, G. E.; CASARIN, R. C. V.; CIRANO, F. R.; FOGLIO, M. A.; PIMENTEL, S. P. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 11, n. 1, p.42-46. 2012.

ROLDÃO, E. F.; WITAICENIS, A.; LIMA, C.A.H.; DI STASI, L.C.. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 1, p. 94-98. 2008.

ROMÃO; G.B. **Estudo in vitro da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia Verbenacea* em espécies reativas de oxigênio de importância biológica.** 130 páginas, 2016. Pós graduação em Ciências Farmacêuticas. Unesp Araraquara. Araraquara/SP.

SANTI, M. M.; SANCHES, F. S.; SILVA, J. F. M.; SANTOS, P. M. L. 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.

SHARMA, P. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidante assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p.1202-1205. 2009.

SERTIÉ, J. A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A. K.; ZELNIK, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, v. 56, n.1, p. 36-40. 1990.

SERTIÉ, J.A.A., BASILE, A.C., PANIZZA, S., OSHIRO, T.T., AZZOLINI, C.P., PENNA, S.C., Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical

anti-inflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extracts. **J. Ethnopharmacol.** v. 31, n. 2, p. 239–347.1991.

SERTIÉ, J. 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.

SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.

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.

SHARMA, O. P.; BHAT, K. B. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v.113, n. 4), p. 1202-1205. 2009.

SILVA, J.D.; GOMES, M.V.; CABRAL, L.M.; SPUSA, V.P. Evaluation of the in vitro release and permeation of *Cordia verbenácea* DC essential oil from tropical dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. V. 53, p.101-173. 2019.

SINGULANI, J. L.; SCORZONI, L.; LOURENCETTI, N. M S.; OLIVEIRA, L. R.; CONÇOLARO, R. S.; DA SILVA, P. B.; NAZARÉ, A. C.; POLAQUINI, C. R.; VICTORELLI, F. D.; CHORILLI, M.; REGASINI, L. O.; FUSCO, A. MARISA.; MENDES, G.; SOARES, M. J. Potential of the association of dodecyl gallate with nanostructured lipid system as a treatment for paracoccidioidomycosis: *In vitro* and *in vivo* efficacy and toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 630-636, 2018.

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.

TASNEEM, S.; LIU, B.; LI, B.; CHOUDHARY, M. I.; WANG, W. Molecular pharmacology of inflammation: medicinal plants as anti inflammatory agents. **Pharmacological Research**, v.139, n.3, p.318-327. 2005.

TICLI, F. K.; HAGE, L. I. S.; CAMBRAIA, R. S.; PEREIRA, P. S.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; SAMPAIO, S. V. 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, n.3, p.318-327. 2005.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIESNIK, J.; PEREIRA-PENA, F. Environmental risk based ranking of solvents using the combination of a multimedia model and multi-criteria decision analysis. **Green Chemistry**, v.19, p.1034. 2017.

VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATIDA, A.K. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society Erkin Trans**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

VELLOSA, J. C. R.; REGASINI, L. O.; KHALIL, N. M.; BOLZANI, V. S.; KHALIL, O. A. K.; MANENTE, F. A.; NETTO, H. P.; OLIVEIRA, O. M. M. F. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. **Ecletica Química**, v. 36, n. 2. 2011.

WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J. HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**. v. 52, n. 6, p. 1189-1208. 1989.

WRIGHT, H. L.; MOOTS, R. J.; BUCKNALL, R. C.; EDWARDS, S. W. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. **Rheumatology**, v.49, n.9, p.1618-1631. 2010.

XU, D.; HU, M.J.; WANG, Y.Q.; CUI, Y.L. Antioxidant activities of quercetin and it complexes for medicinal application. **Molecules**, v.24, n.6, p.1123. 2019.

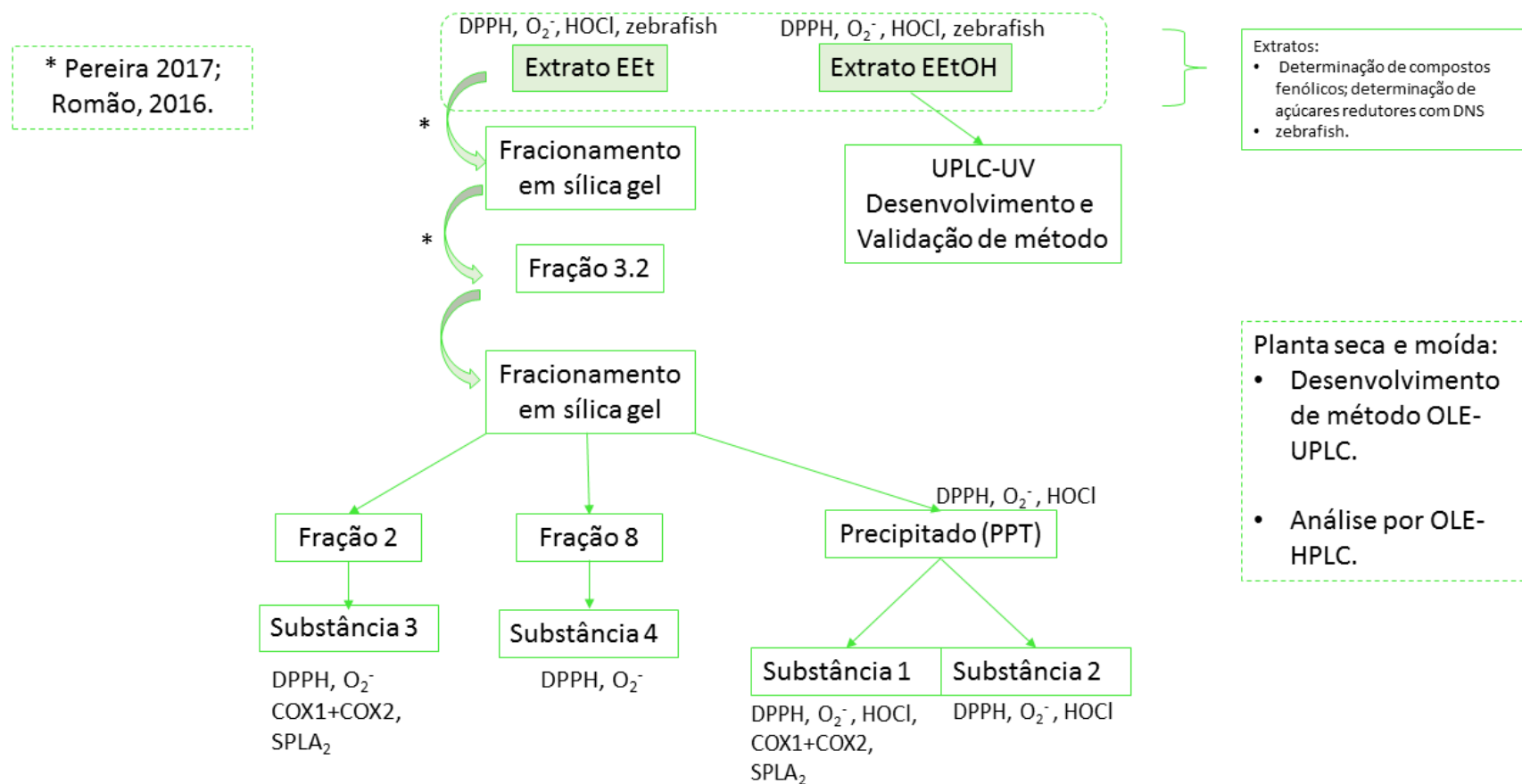
YABRÉ, M.; FERREY, L.; SOMÉ, I. T.; GAUDIN, K. Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis. **Molecules** v.23, n.5, p.1065. 2018.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia**. 4^a ed. Itajaí/SC: Editora da Universidade do Vale do Itajaí, 2014.

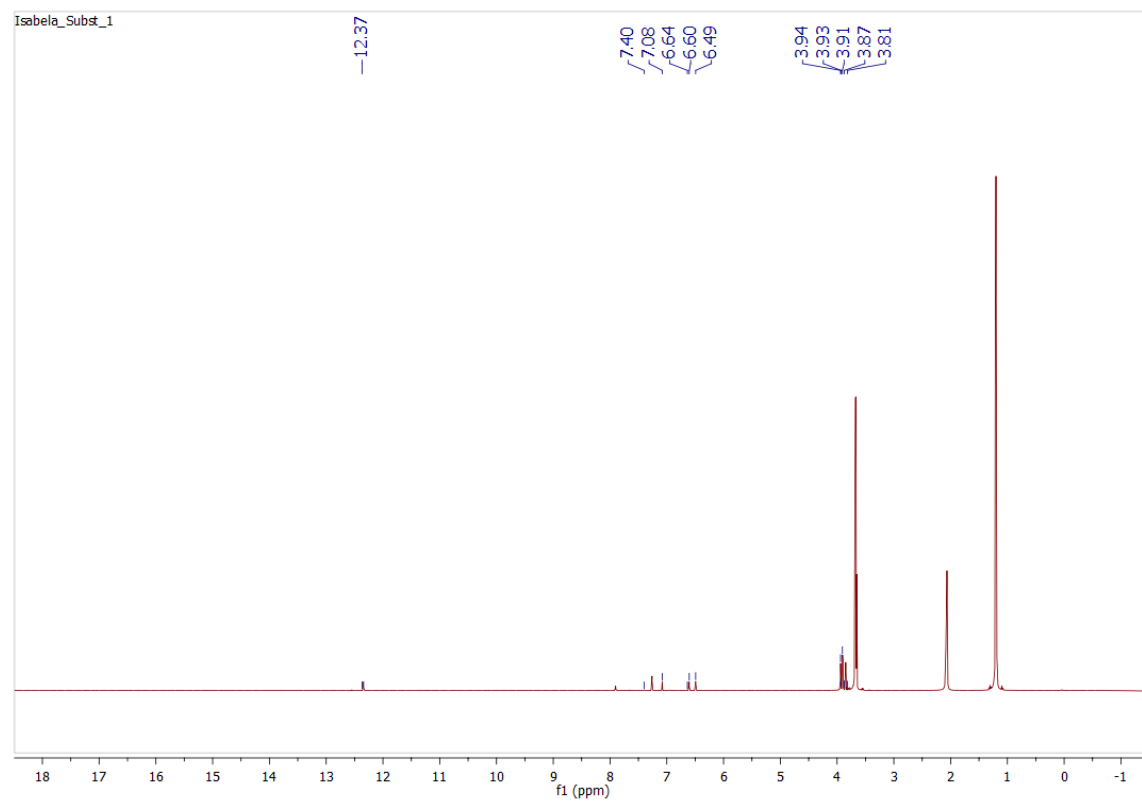
YUTING, C.; RONGLIANG, Z.; ZHONGJIAN, J.; YONG, J. Flavonoids as superoxid scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, V.9,N.1,P.19-21. 1990.

ZGLICZYNSKI, T.J.M.; STELMASZYNSKA, T.; DOMANSKI, J.; PSTROWKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase; **Biochimica et Biophysica Acta**, v.235, n.3, p.419-424. 1971.

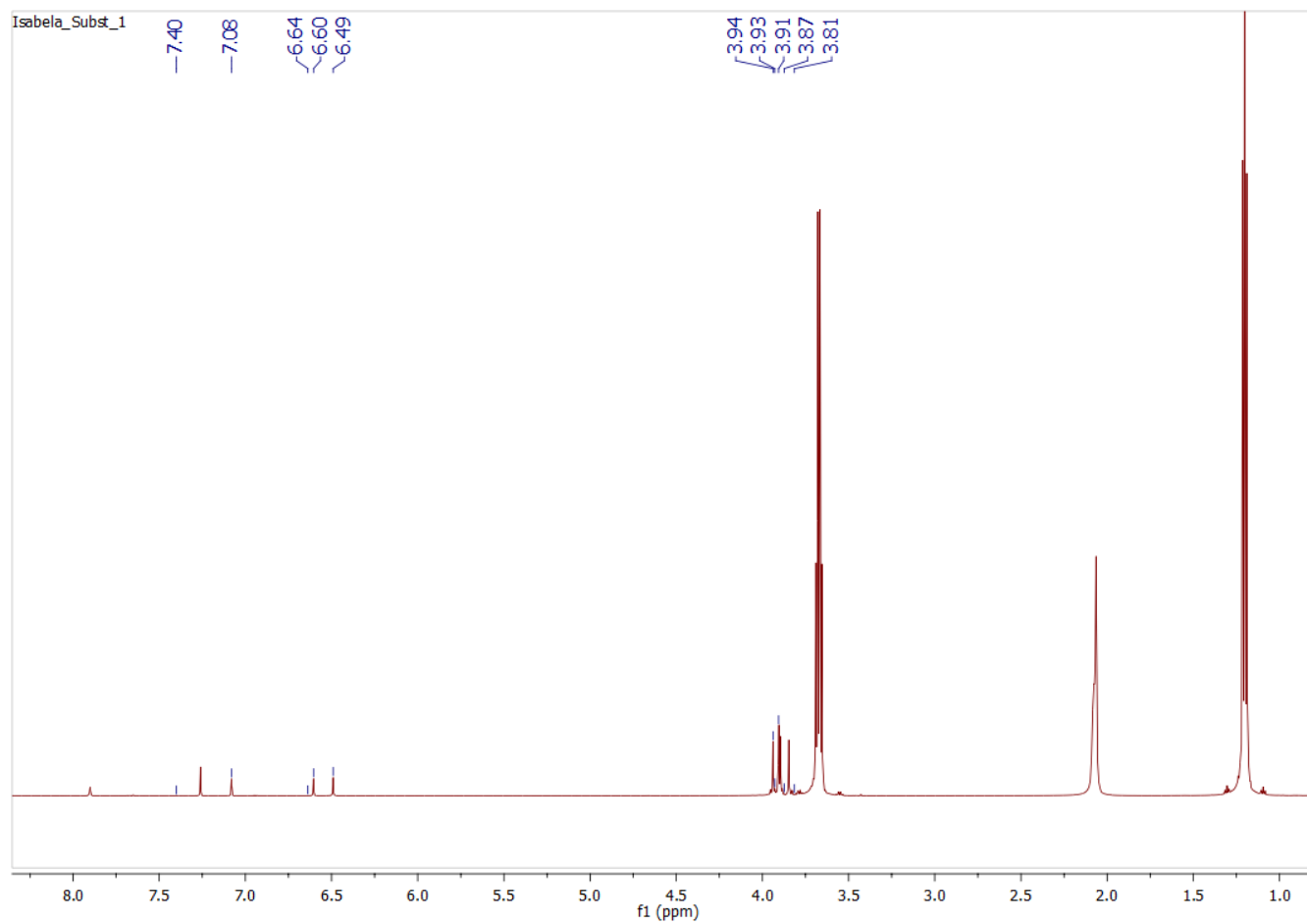
Apêndices



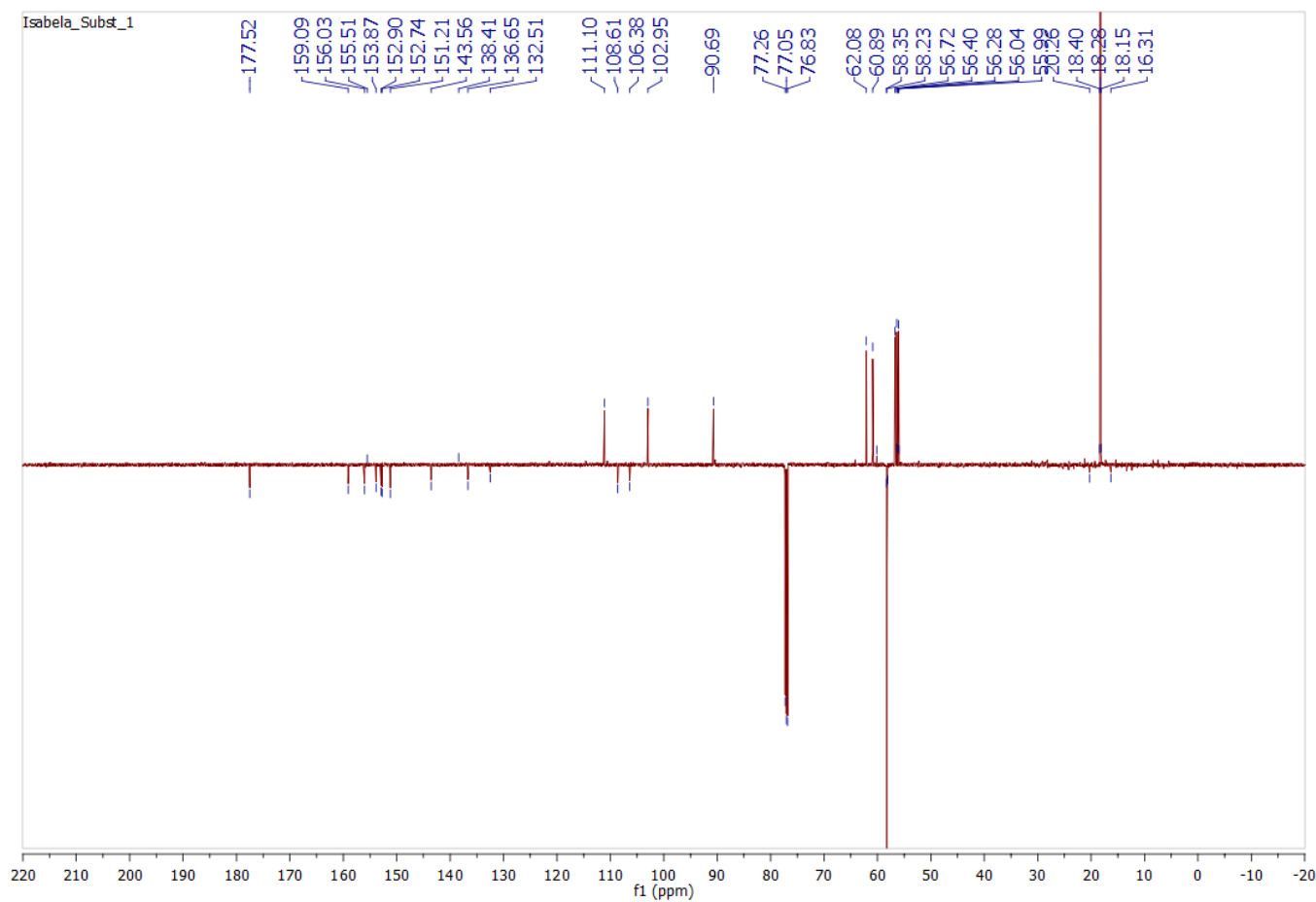
Apêndice 1 Resumo gráfico das etapas do trabalho



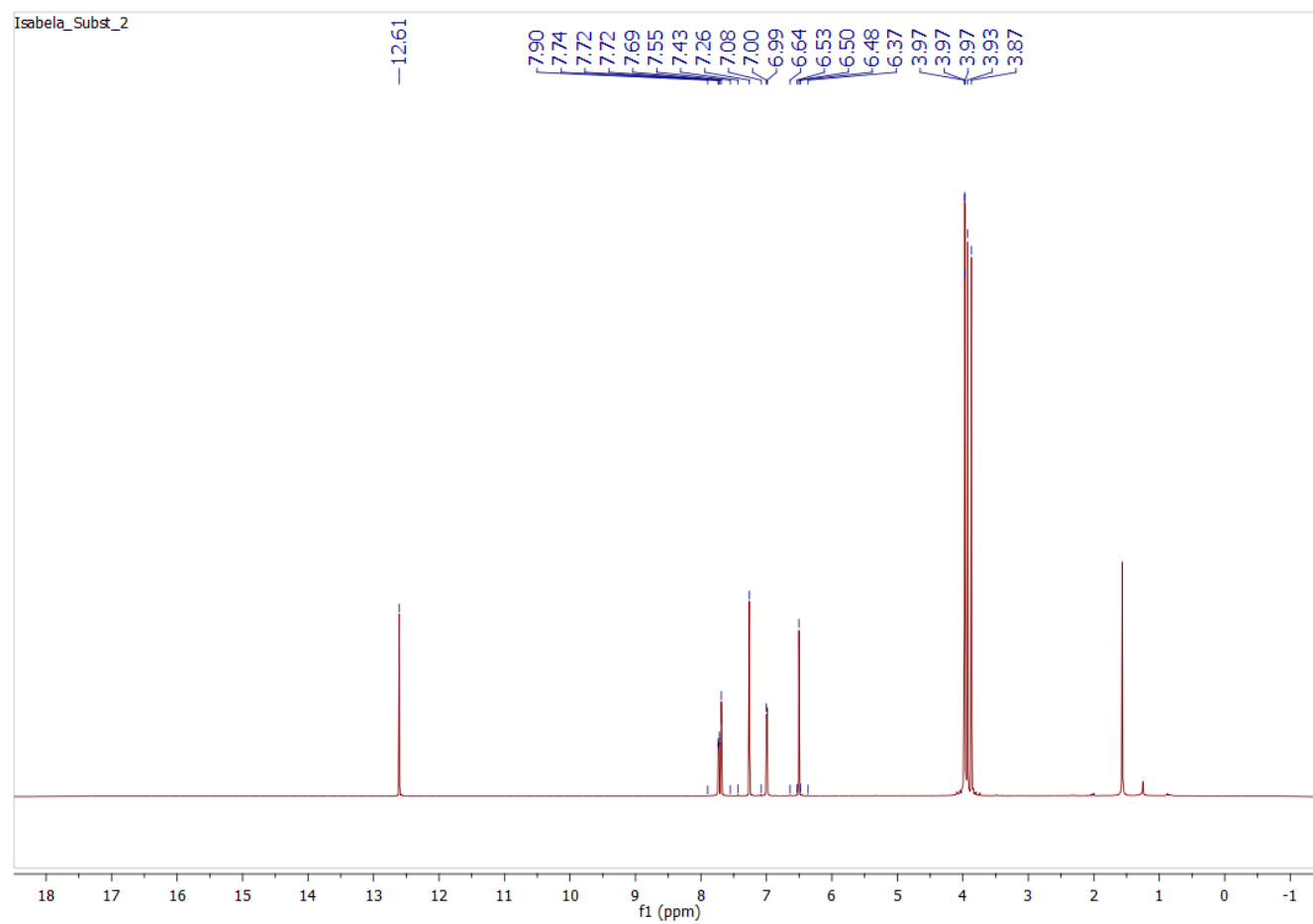
Apêndice 2 Espectro de RMN de ^1H da substância 1 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).



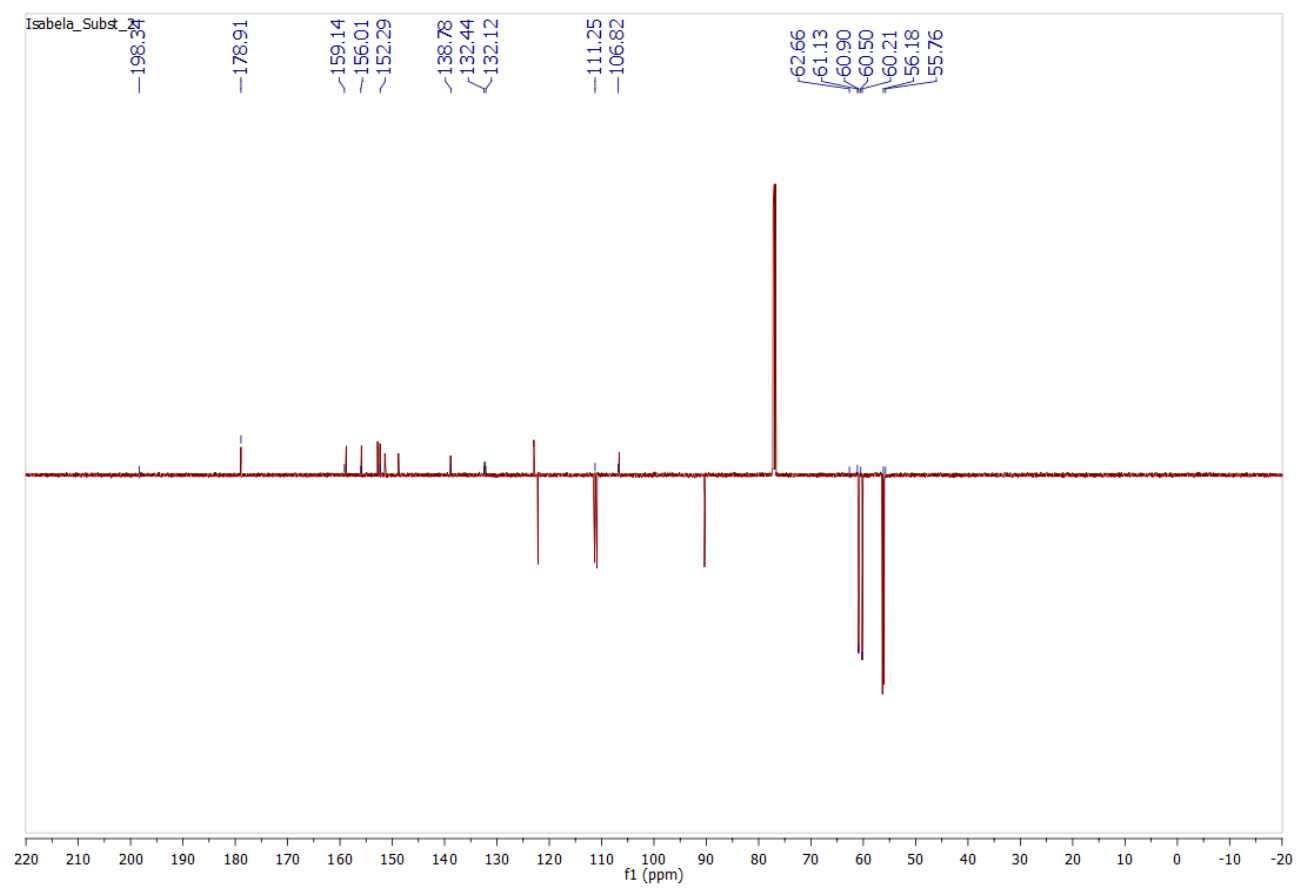
Apêndice 3 Espectro expandido de RMN de ^1H da substância 1 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).



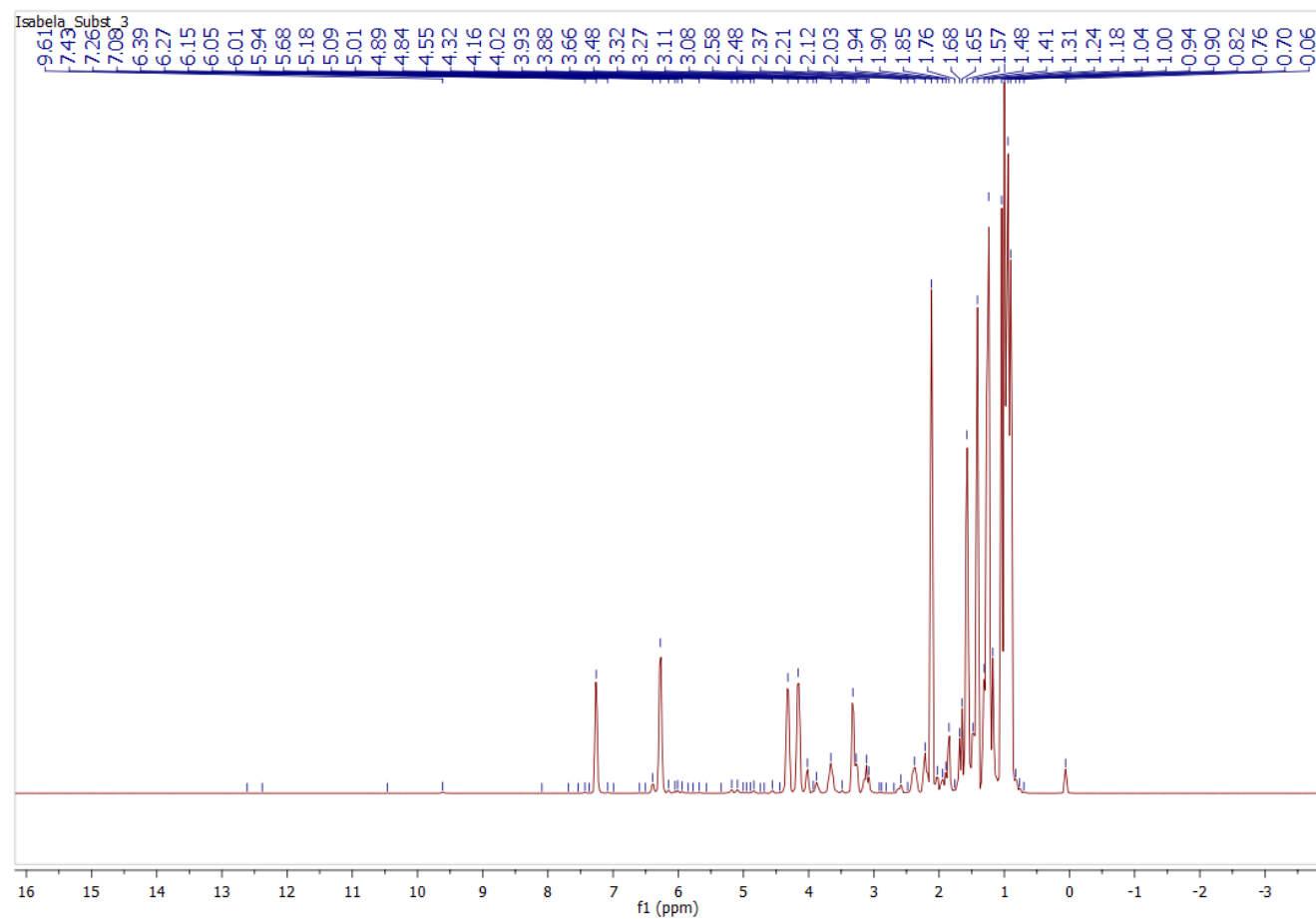
Apêndice 4 Espectro obtido com o experimento DEPT para a substância 1 em CDCl_3 (10 mg/mL).



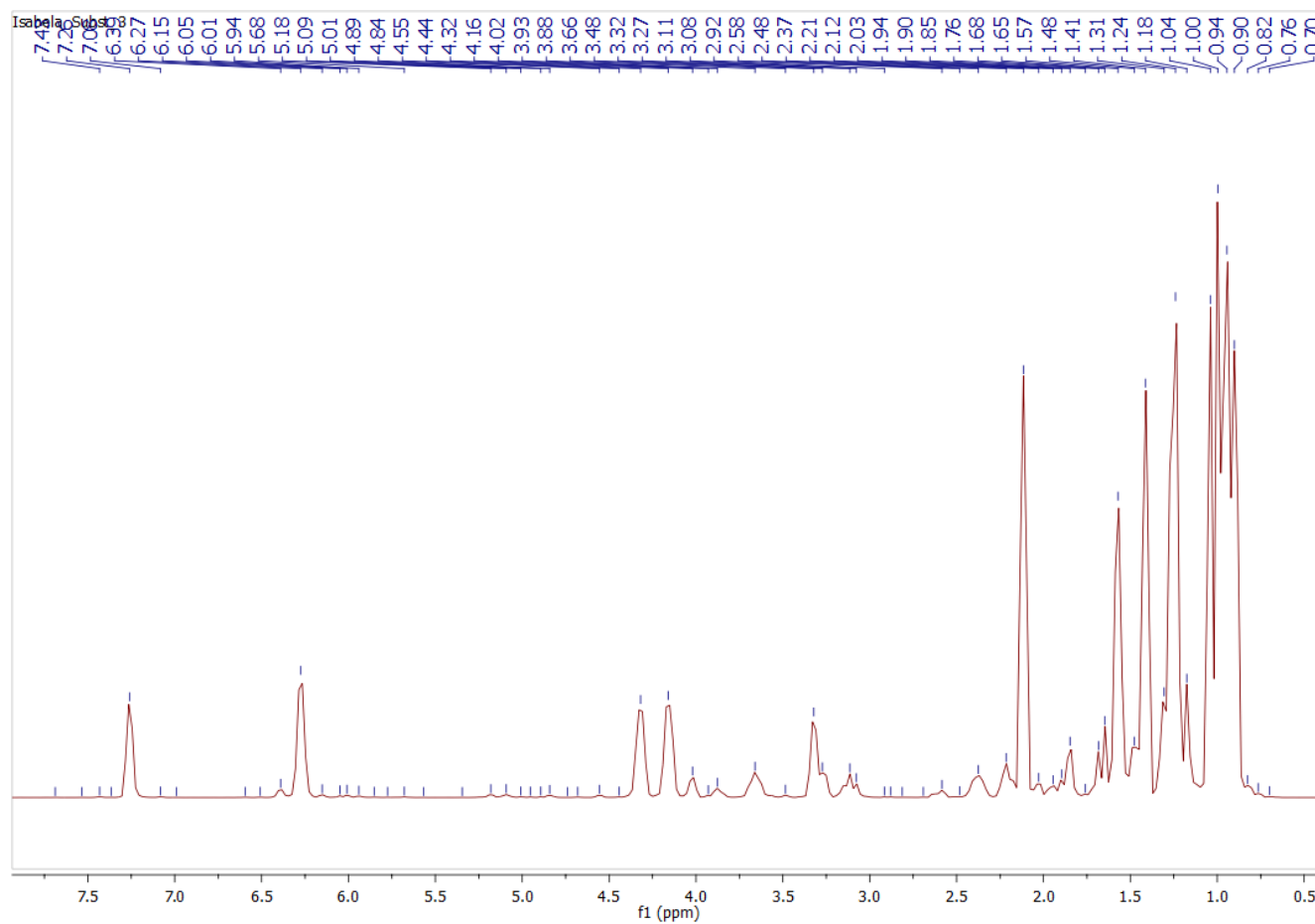
Apêndice 5 Espectro de RMN de ^1H da substância 2 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).



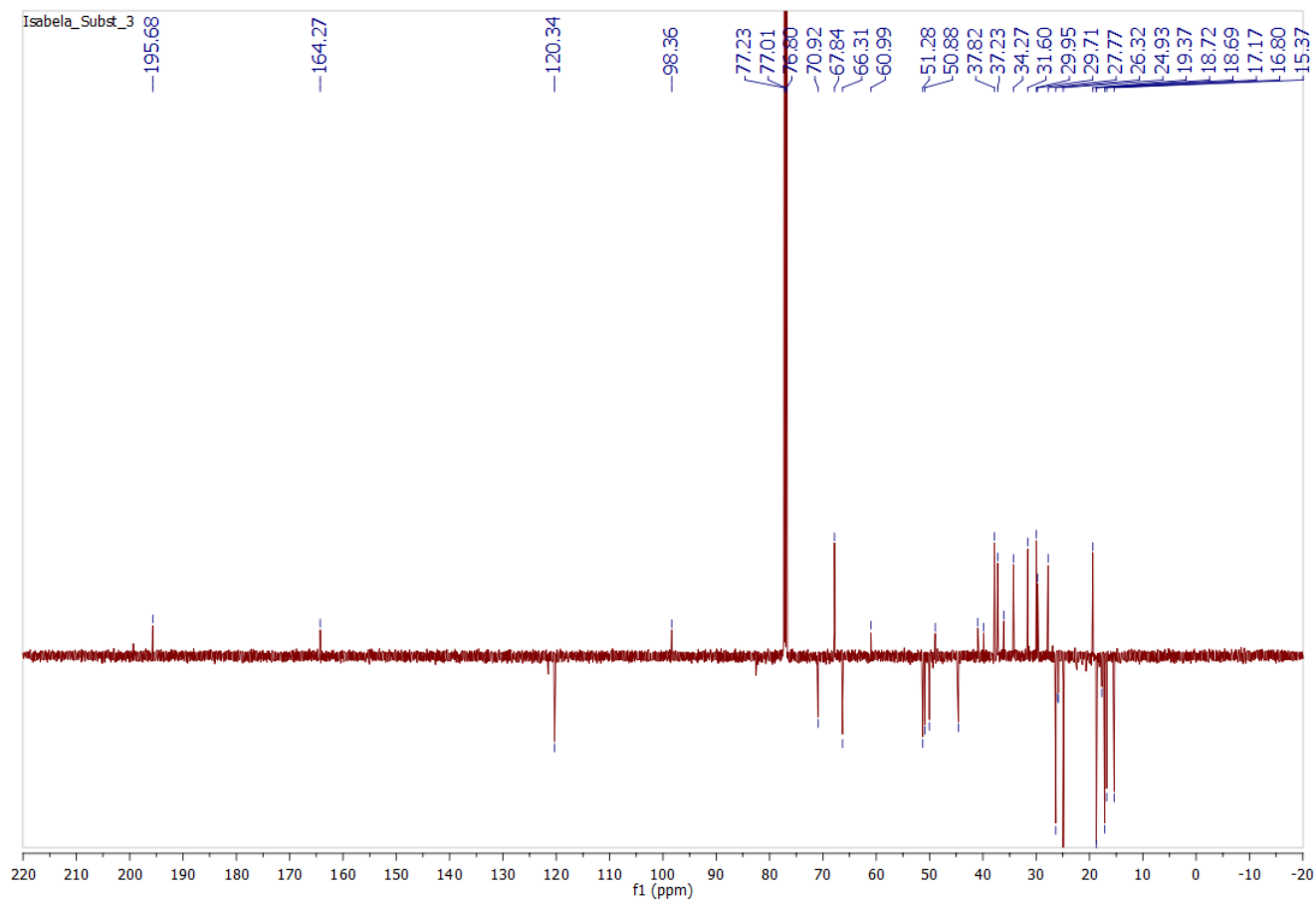
Apêndice 6 Espectro obtido com o experimento DEPT para a substância 2 em CDCl_3 (10 mg/mL).



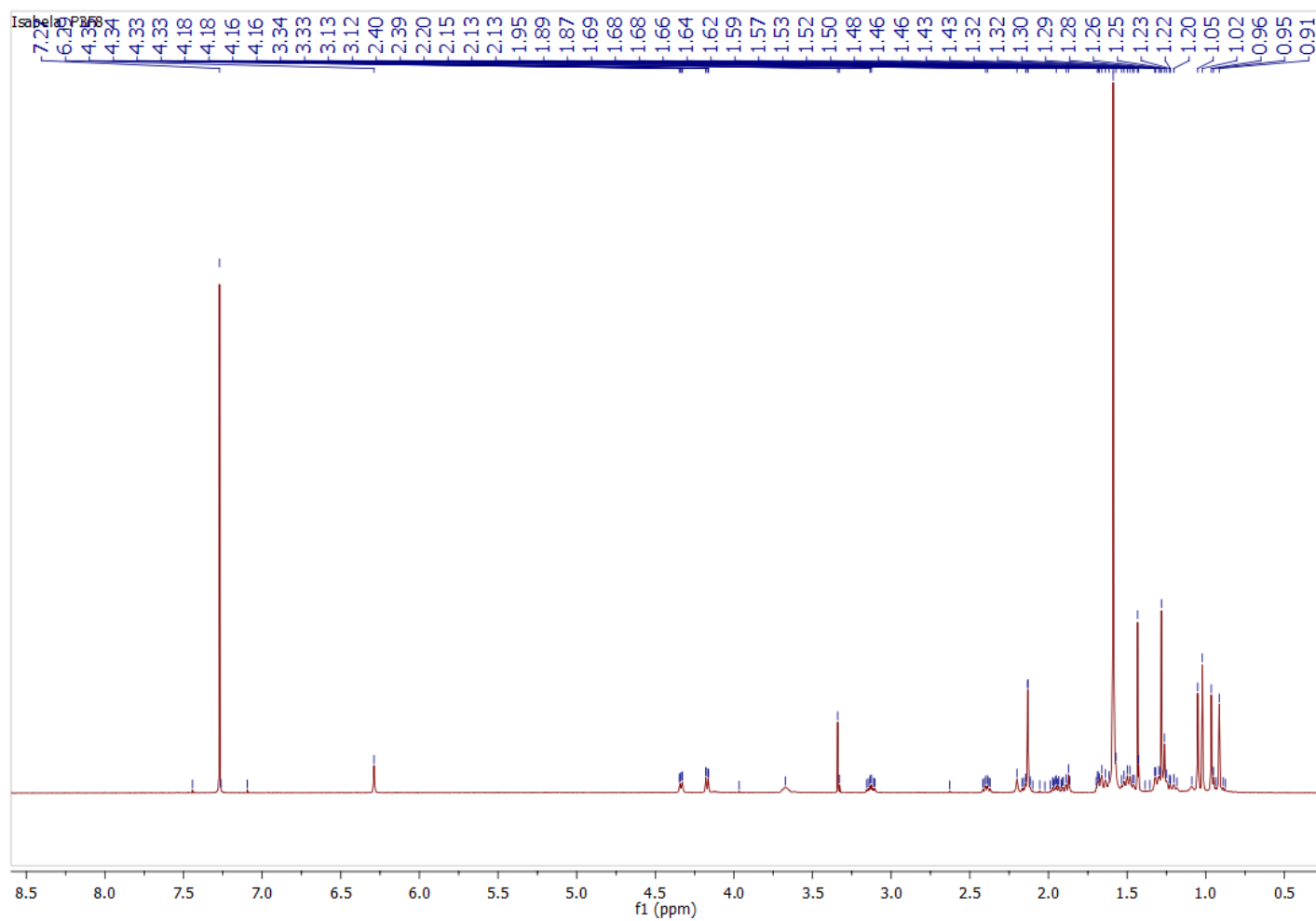
Apêndice 7 Espectro de RMN de ^1H da substancia 3 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).



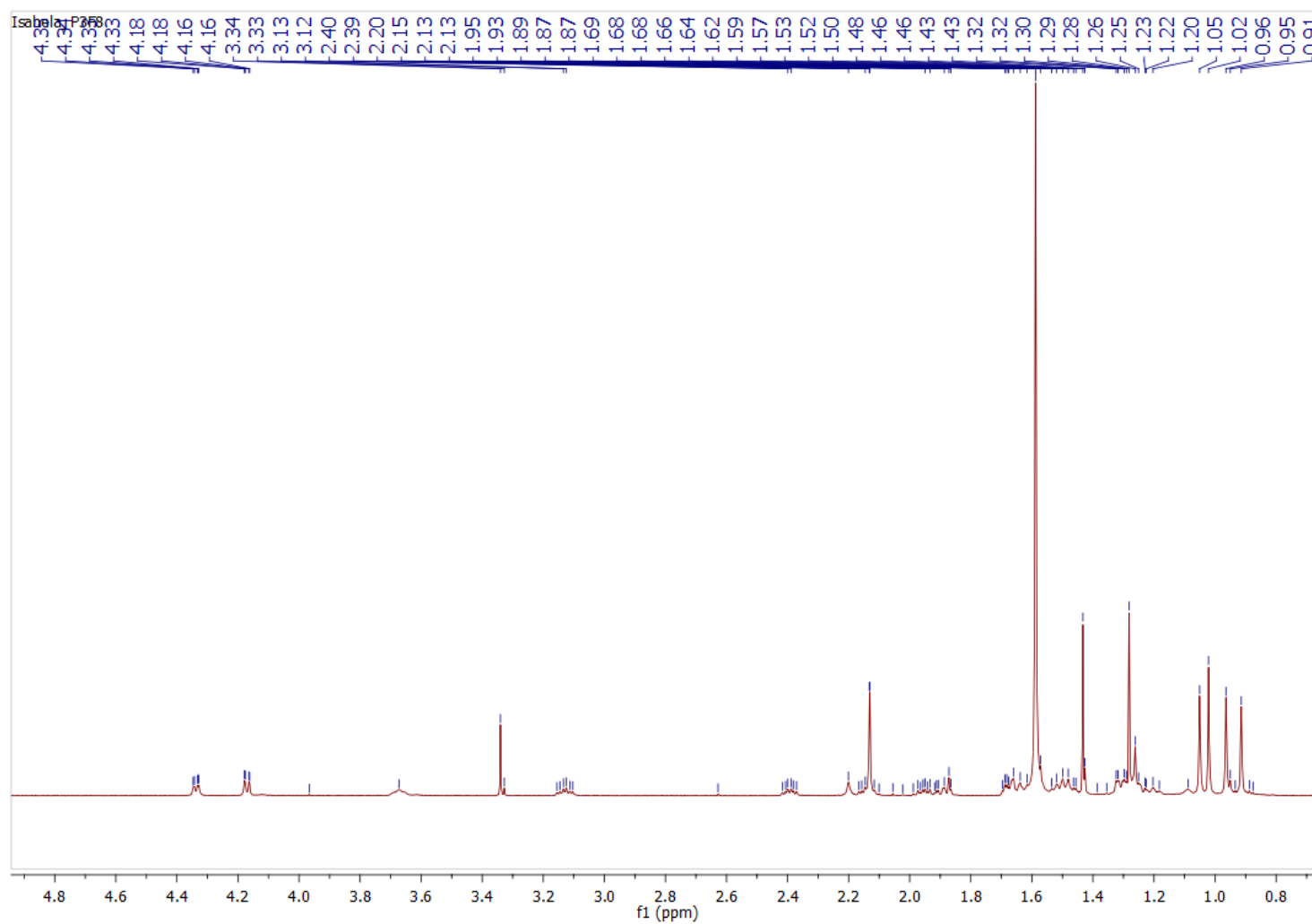
Apêndice 8 Espectro expandido de RMN de ^1H da substancia 3 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).



Apêndice 9 Espectro obtido com o experimento DEPT para a substancia 3 em CDCl_3 (10 mg/mL).



Apêndice 10 Espectro de RMN de ¹H da substancia 4 obtido a 300 MHz em CDCl₃ (10 mg/mL).



Apêndice 11 Espectro expandido de RMN de ^1H da substancia 4 obtido a 300 MHz em CDCl_3 (10 mg/mL).

