

AMANDA MARTINS VIEL

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIGLICANTE E CITOTÓXICA DE
EXTRATOS DE *Pyrostegia venusta* (KER GAWL.) MIERS E *Turnera ulmifolia* LINN E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE MICROENCAPSULAÇÃO COM
MALTODEXTRINA**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora
em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Márcio
Gonçalves da Silva

**ARARAQUARA
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA

V659a Viel, Amanda Martins
Atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica de extratos de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e *Turnera ulmifolia* Linn e desenvolvimento de método de microencapsulação com maltodextrina / Amanda Martins Viel. – Araraquara : [s.n.], 2021
106 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva

1. Antioxidantes. 2. Estresse oxidativo. 3. Flavonoides.
4. Plantas medicinais. 5. Polifenóis. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica de extratos de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e *Turnera ulmifolia* Linn e desenvolvimento de método de microencapsulação com maltodextrina.

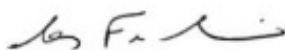
AUTORA: AMANDA MARTINS VIEL

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



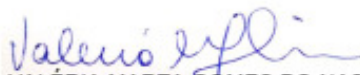
Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Prof. Dr. MARCOS FERREIRA MINICUCCI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina - Unesp - Botucatu



Profa. Dra. MONICA ROSA BERTAO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Profa. Dra. VALÉRIA MARTA GOMES DO NASCIMENTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências e Letras - UNESP - Assis



Prof.ª Dr.ª PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Campus Experimental de Registro / Universidade Estadual Paulista - UNESP - Registro

Araraquara, 29 de outubro de 2021

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Amanda Martins Viel

Nome em citações bibliográficas: VIEL, A. M.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Myrtes Spera Conceição, 301, Conjunto Nelson Marcondes. Assis - SP.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Graduação em Farmácia Bioquímica pela Universidade Paulista – UNIP (2011). Mestrado em Biociências pela Universidade Estadual Paulista – UNESP (2016). Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP (2021).

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Especialização em Formação em Educação a Distância pela Universidade Paulista – UNIP (2020). (Carga Horária: 400h).

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Professora Adj./ Profissional III na Universidade Paulista – UNIP.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

SANTOS, L.; **VIEL, A. M.**; TAROSSO, L. F.; MOMESSO, L. S.; PALMIERI, D. A.; SPERA, K. D. Medicinal plants of the brazilian cerrado: Knowing to preserve. Bioscience Journal, v. 36, p. 556-567, 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-42748>

VIEL, A. M.; SILVA, L. P.; MARTINS, G. R.; URTREMARI, B.; SEKIYA, A.; DOKKEDAL, A. L.; SOUZA, E. B.; CAMARGO, I. C. C.; SILVA, R. M. G. Toxicological, genotoxic and antioxidant potential of *Pyrostegia venusta*. Bioscience Journal, v. 35, p. 570-585, 2019. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-41790>

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos

PEDROSO, K. A.; **VIEL, A. M.** Potenciais interações medicamentosas em idosos residentes em um asilo de Maracaí-SP. In: XXII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNIP/PIBIC-CNPq, 2020, São Paulo. Anais do XXII ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNIP, 2020.

VIEL, A. M.; FIGUEIREDO, C. C. M.; GIMENIS, J. M.; SILVA, R. M. G. Atividade antioxidante do extrato microencapsulado de *Pyrostegia venusta*. In: BIOFITO - Congresso Internacional Online de Biocosméticos e Fitoprodutos, 2020. Anais do Congresso Internacional Online de Biocosméticos e Fitoprodutos - BIOFITO, 2020.

CARVALHO, L. M.; **VIEL, A. M.** Análise de potenciais interações medicamentosas em unidade de terapia intensiva do Hospital Regional de Assis - SP. In: XXI Encontro de Iniciação Científica UNIP/PIBIC-CNPq, 2019, São Paulo. Anais XXI Encontro de Iniciação Científica 2019.

SALATINI, K. A. M.; **VIEL, A. M.** Avaliação do tratamento farmacológico para dependentes de álcool no centro de atenção psicossocial de Maracaí - SP. In: XXI Encontro de Iniciação Científica UNIP/PIBIC-CNPq, 2019, São Paulo. Anais XXI Encontro de Iniciação Científica 2019.

SALATINI, K. A. M.; **VIEL, A. M.** Pharmacological treatment evaluation for alcohol dependents from the psychosocial care center (CAPS) in Maracaí - SP. In: XX Pharmaceutical Congress of São Paulo / XII Internacional Seminar of Pharmaceutical Sciences / Expofar 2019, 2019, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2019. p. 136-136.

CARVALHO, L. M.; **VIEL, A. M.** Potential drug interactions analysis in intensive therapy of Assis regional hospital - SP. In: XX Pharmaceutical Congress of São Paulo / XII Internacional Seminar of Pharmaceutical Sciences / Expofar 2019, 2019, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2019. p. 147-147.

FIGUEIREDO, C. C. M.; **VIEL, A. M.**; GOMES, A. C.; GIMENIS, J. M.; SILVA, R. M. G. Potencial antirradicalar e antiglicante de extrato de *Tribulus terrestris*. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil 2018, 2018.

VIEL, A. M.; FIGUEIREDO, C. C. M.; GIMENIS, J. M.; GOMES, A. C.; SILVA, R. M. G. Atividade antirradicalar do extrato hidroalcoólico de *Turnera ulmifolia*. In: XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018, São Paulo. Anais XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil 2018, 2018.

GIMENIS, J. M.; GOMES, A. C.; FIGUEIREDO, C. C. M.; **VIEL, A. M.**; SILVA, R. M. G. Determination of the content of polyphenols and total flavonoids and antioxidant activity evaluation of *Moringa oleifera* Lam. In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória / ES. Anais do Evento, 2017.

VIEL, A. M.; SILVA, L. P.; BRONZEL JUNIOR, J. L.; SILVA, R. M. G.; PEIXOTO, E. C. T. M. Physiological response, in vitro, of gastrointestinal helminths of sheep, exposed to *Psidium guajava* extract. In: 6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM, 2017, Vitória / ES. Anais do Evento, 2017.

PARTICIPAÇÃO EM BANCAS

Augusto Cesar Jeannine Rocha Junior. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2021).

Título: A interrelação do estresse oxidativo com a neuroinflamação na progressão da doença de Alzheimer sob a perspectiva de uma velhice energeticamente deprimida.

Orientador(a): Lucineia dos Santos

Amanda de Andrade Machado. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2020).

Título: Desenvolvimento de um fitocosmético enriquecido com *Caryocar Brasiliense* Camb.

Orientador(a): Lucineia dos Santos

Cíntia Gonçalves de Oliveira. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2020).

Título: Avaliação dos efeitos toxicológicos da formulação comercial do herbicida glifosato em sua forma original e encapsulada sobre a fertilidade e o sistema reprodutor de camundongos.

Orientador(a): Lucineia dos Santos

Andressa Rodrigues Martins da Quinta. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2019).

Título: Medicamentos alopáticos, fitoterápicos e plantas medicinais: uma análise comparativa.

Orientador(a): Lucineia dos Santos

Melina Prado. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2018).

Título: avaliação do potencial alelopático e pró-oxidativo de *Emilia Sonchifolia*: perfil inseticida e herbicida.

Orientador(a): Regildo Márcio Gonçalves da Silva

Nadine Mendes Nascimento. Graduação em Engenharia Biotecnológica. Universidade Estadual Paulista – UNESP (2018).

Título: desenvolvimento de um novo fitocosmético com propriedades antienvelhecimento a partir do extrato da *Agave Sisalana*.

Orientador(a): Lucineia dos Santos

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

I Congresso Online Nacional de Cosmetologia. 2021. (Congresso).

BIOFITO - Congresso Internacional Online de Biocosméticos e Fitoprodutos. 2020. (Congresso).

Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line (CONBRACIB). 2020. (Congresso).

I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB). 2020. (Congresso).

XX Congresso Farmacêutico de São Paulo, XII Seminário Internacional de Ciências Farmacêuticas e Expofar 2019. (Congresso).

XXI Encontro de Iniciação Científica UNIP/PIBIC-CNPq. 2019. (Encontro).

II Workshop do Departamento de Biotecnologia: Inovações biotecnológicas na área da saúde e suas aplicações. 2018. (Outra).

XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Atividade antirradicalar do extrato hidroalcoólico de *Turnera ulmifolia*. 2018. (Simpósio).

6th BCNP Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM. 2017. (Congresso).

I Workshop do Departamento de Biotecnologia. 2017. (Simpósio).

ORIENTAÇÕES

Karine Alves Pedroso. Potenciais interações medicamentosas em idosos residentes em um asilo de Maracaí - SP. 2020. Iniciação Científica. (Graduação em Farmácia) - Universidade Paulista – UNIP.

Larissa Moraes Carvalho. Análise de potenciais interações medicamentosas em Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Regional de Assis-SP. 2019. Iniciação Científica. (Graduação em Farmácia) - Universidade Paulista – UNIP. Bolsa Universidade Paulista - UNIP.

Karen Adriane Moreira Salatini. Avaliação do tratamento farmacológico para dependentes de álcool no Centro de Atenção Psicossocial de Maracaí-SP. 2019. Iniciação Científica. (Graduação em Farmácia) - Universidade Paulista – UNIP. Bolsa Santander.

*Dedico este trabalho à minha mãe Maria,
por todo amor e por ser minha maior
incentivadora, compartilhando comigo
todas as alegrias e aprendizados da vida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser tão presente em minha vida. Me sinto muito abençoada!

Aos meus pais Carlos e Maria, que são minha base e me impulsionam sempre a buscar meus objetivos.

Ao meu noivo, muito em breve marido, Gustavo, um grande companheiro desde à minha graduação, que sempre me apoiou com muito amor.

Ao meu orientador, Professor Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, por seus ensinamentos não somente como professor, mas também como um amigo. Minha gratidão pela oportunidade e por toda a atenção e disponibilidade que sempre teve.

Aos colegas de laboratório, pela convivência e por compartilharem comigo seus conhecimentos.

Aos meus amigos, pelas palavras de carinho, otimismo e incentivo.

Ao professor Dr. Valdecir Farias Ximenes, pela disponibilidade e auxílio nos testes de fluorescência.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Menezes Quintas e a Thais Miranda Godoy, pela colaboração nos testes de citotoxicidade.

Aos professores da banca que aceitaram prontamente o convite para participar dessa defesa.

Aos funcionários do Instituto de Química de Araraquara - UNESP, em especial aos funcionários da Seção Técnica de Pós-graduação em Biotecnologia, por toda a atenção e auxílio sempre que solicitado.

A todos os professores do Doutorado, que muito contribuíram para minha formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Entrega o teu caminho ao Senhor, confia
Nele, e Ele tudo fará”

(Salmo 37:5)

VIEL, A. M. Atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica de extratos de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e *Turnera ulmifolia* Linn e desenvolvimento de método de microencapsulação com maltodextrina, 2021. 106 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021.

RESUMO

Compostos com atividades antioxidante e antiglicante tornaram-se alvos de estudos, em busca de novos ativos que possam prevenir e combater os danos causados pelo estresse oxidativo e glicação de macromoléculas, eventos relacionados a diversos processos degenerativos e patológicos. Diante disso, compostos de origem vegetal do grupo dos polifenóis são fontes promissoras para tais estudos, pois atuam como inibidores naturais destes processos prejudiciais à saúde e, diferentes espécies vegetais vêm ganhando destaque em estudos científicos, como a *Pyrostegia venusta* e a *Turnera ulmifolia*, amplamente utilizadas na medicina popular. Somado a isso, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas, possibilitando ampliar suas ações com o emprego na liberação controlada, estabilização e liberação destes fitofármacos de forma mais eficiente. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica dos extratos brutos das flores de *Pyrostegia venusta* e partes aéreas de *Turnera ulmifolia*, assim como as microcápsulas produzidas com extrato dessas espécies. Os extratos foram analisados quanto à constituição de polifenóis e flavonoides totais, por HPLC/MS e CCDc. A atividade antioxidante foi realizada por meio dos testes de DPPH, FRAP, NO, ORAC-FL e inibição da hemólise oxidativa em eritrócitos humanos, e a atividade antiglicante por meio da determinação de grupos de aminas livres, inibição da formação de AGEs e MRE. As microcápsulas produzidas com os extratos em maltodextrina foram avaliadas quanto à eficiência e liberação de compostos polifenólicos, atividade antioxidante por DPPH e caracterização por MEV. Ambas as espécies selecionadas para esse estudo, *P. venusta* e *T. ulmifolia*, apresentaram alto teor de polifenóis e flavonoides totais, que foram caracterizados por HPLC/MS. Os extratos que apresentaram melhores resultados para as atividades antioxidante e antiglicante, foi obtido por maceração para a *P. venusta* e percolação para a *T. ulmifolia*. No teste de MTT foi possível verificar que *P. venusta* apresentou potencial citotóxico nas maiores concentrações analisadas, enquanto *T. ulmifolia* apresentou um resultado negativo para citotoxicidade. O método de microencapsulação por liofilização demonstrou eficiência de encapsulação, pois conferiu estabilidade ao conteúdo polifenólico dos extratos, verificada após a liberação dos compostos. As duas espécies apresentaram potencial promissor quanto à atividade antioxidante e antiglicante, os quais podem estar relacionados à sua constituição em polifenóis, principalmente em flavonoides.

Palavras-chave: AGEs, estresse oxidativo, flavonoides; plantas medicinais, polifenóis.

VIEL, A. M. Atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica de extratos e frações de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e *Turnera ulmifolia* Linn e desenvolvimento de método de microencapsulação com maltodextrina, 2021. 106 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2021.

ABSTRACT

Compounds with antioxidant and antiglycant activities have become targets of studies, in search of new actives that can prevent and combat the damage caused by oxidative stress and glycation of macromolecules, events related to several degenerative and pathological processes. Therefore, compounds of plant originate from the group of polyphenols are promising sources for such studies, as they act as natural inhibitors of these harmful processes to health, and different plant species have been gaining prominence in scientific studies, such as *Pyrostegia venusta* and *Turnera ulmifolia*, widely used in folk medicine. Added to this, there has been a great scientific advance involving chemical and pharmacological studies of medicinal plants, which aim to obtain new compounds with therapeutic properties, making it possible to expand their actions with the use of controlled release, Stabilization and release of these phytopharmaceuticals in a more efficient. This study aimed to evaluate the antioxidant, antiglycant and cytotoxic activity of crude extracts from *Pyrostegia venusta* flowers and aerial parts of *Turnera ulmifolia*, as well as the microcapsules produced with extracts of these species. The extracts were analyzed for the constitution of total polyphenols and flavonoids, by HPLC/MS and CCDc. Antioxidant activity was performed by testing DPPH, FRAP, NO, ORAC-FL and inhibition of oxidative hemolysis in human erythrocytes, and antiglycant activity by determining free amine groups, inhibiting the formation of AGEs and MRE. The microcapsules produced with maltodextrin extracts were evaluated for efficiency and release of polyphenolic compounds, antioxidant activity by DPPH and characterization by SEM. Both species selected for this study, *P. venusta* and *T. ulmifolia*, presented high content of total polyphenols and flavonoids, which were characterized by HPLC/MS. The extracts that the best results for antioxidant and antiglycant activities were obtained by maceration for *P. venusta* and percolation for *T. ulmifolia*. In the MTT test it was possible to verify that *P. venusta* presented cytotoxic potential at the highest analyzed concentrations, while *T. ulmifolia* presented a negative result for cytotoxicity. The freeze-drying microencapsulation method demonstrated encapsulation efficiency, as it provided stability to the polyphenolic content of the extracts, verified after the release of the compounds. Both may be related to their constitution in polyphenols, mainly in flavonoids.

Keywords: AGEs, oxidative stress, flavonoids; medicinal plants, polyphenols.

SUMÁRIO

	REFERENCIAL TEÓRICO	17
	OBJETIVOS	25
	Objetivo geral	25
	Objetivos específicos	25
	REFERÊNCIAS	26
	 CAPITULO 1	 34
1	INTRODUÇÃO	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Coleta e preparo dos extratos vegetais	37
2.1.1	Coleta do material vegetal	37
2.1.2	Preparo dos extratos brutos	38
2.1.2.1	Extrato hidroetanólico por maceração	38
2.1.2.2	Extrato hidroetanólico por percolação	38
2.1.2.3	Obtenção da fração flavonoídica	38
2.2	Análise fitoquímica dos extratos	39
2.2.1	Determinação de polifenóis totais	39
2.2.2	Determinação de flavonoides totais	39
2.2.3	Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDc)	39
2.3	Análise em HPLC/MS	40
2.4	Avaliação da atividade antioxidante	40
2.4.1	Atividade sequestradora do radical livre DPPH	40
2.4.2	Potencial redutor de ferro (FRAP)	41
2.4.3	Atividade sequestradora de óxido nítrico (NO)	41
2.4.4	Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)	41
2.4.5	Inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos	42
2.4.5.1	Obtenção de eritrócitos	42
2.4.5.2	Ensaio de hemólise oxidativa	42
2.5	Determinação da atividade antiglicante	43
2.5.1	Preparo da mistura reacional de glicação	43

2.5.2	Determinação de grupos de aminas livres	43
2.5.3	Inibição da formação de AGEs por fluorescência	43
2.5.4	Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)	44
2.6	Microencapsulação de extrato de <i>P. venusta</i> (EBPvm)	44
2.6.1	Microencapsulação utilizando Maltodextrina	44
2.6.2	Avaliação das microcápsulas	44
2.6.2.1	Ruptura e liberação	44
2.6.2.2	Eficiência de encapsulação	45
2.6.2.3	Caracterização morfológica de microcápsulas	45
2.7	Análise citotóxica por método de MTT	45
2.8	Análise Estatística	46
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1	Determinação de polifenóis e flavonoides totais	46
3.2	Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDc)	47
3.3	Análise fitoquímica por HPLC-PDA	48
3.4	Avaliação da atividade antioxidante	49
3.4.1	Avaliação da atividade antioxidante pelos testes de DPPH, FRAP e NO	49
3.4.2	Seleção do extrato de flores de <i>P. venusta</i> com maior atividade antioxidante	51
3.4.3	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC-FL	51
3.4.4	Avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos	52
3.5	Avaliação da atividade antiglicante	53
3.5.1	Determinação de grupo de aminas livres e inibição da formação de AGEs por fluorescência	53
3.5.2	Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)	53
3.6	Avaliação da microencapsulação do extrato de <i>P. venusta</i>	54
3.6.1	Determinação de polifenóis e avaliação da atividade antioxidante por DPPH	54
3.6.2	Avaliação da eficiência de encapsulação	55
3.6.3	Análise morfológica das microcápsulas	55
3.7	Análise citotóxica por método de MTT	57
3.8	Determinação de polifenóis e flavonoides totais e da atividade antioxidante por DPPH e FRAP, da fração flavonoídica	57

4	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	CAPÍTULO 2	64
1	Introduction	67
2	Materials and methods	68
2.1	Collection and preparation of <i>Turnera ulmifolia</i> crude extract	68
2.2	Phytochemical compounds	69
2.2.1	Total phenols and flavonoids content	69
2.2.2	HPLC-MS/MS analysis	69
2.3	Microencapsulation	70
2.3.1	Microencapsulation with Maltodextrin DE20	70
2.3.2	Morphological characterization of microcapsules	70
2.3.3	Particle size and Zeta potential	70
2.3.4	Release of the microcapsules	70
2.3.5	Encapsulation efficiency	71
2.4	Antiglycation activity	71
2.4.1	Preparation of glycation reaction mixture	71
2.4.2	Determination of free amino groups	71
2.4.3	Inhibition of AGEs formation	72
2.4.4	Relative Electrophoretic Mobility (REM)	72
2.5	Antioxidant activity	72
2.5.1	DPPH radical scavenging test	72
2.5.2	Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)	73
2.5.3	Nitric oxide scavenging activity	73
2.5.4	Oxygen radical absorption capacity (ORAC-FL)	73
2.6	Cytotoxicity analysis by MTT method	74
2.7	Statistical analysis	74
3	Results and Discussion	74
3.1	Phytochemical compounds	74
3.1.1	Total phenols and flavonoids content	74
3.1.2	Characterization of <i>T. ulmifolia</i> crude extract by HPLC-MS/MS	75
3.2	Microencapsulation	75

3.2.1	Morphological characterization of microcapsules	75
3.2.2	Particle size and Zeta potential	76
3.2.3	Encapsulation efficiency	76
3.3	Antiglycation activity	77
3.4	Antioxidant activity	77
3.4.1	DPPH, FRAP and NO	77
3.4.2	ORAC-FL	78
3.5	Cytotoxicity analysis by MTT method	78
4	Conclusion	79
	References	80
	 CONSIDERAÇÕES GERAIS	 89
	 ANEXO	 90

REFERENCIAL TEÓRICO

O estresse oxidativo pode gerar mudanças permanentes na estrutura do DNA, proteínas e lipídios (GEORGE e ABRAHAMSE, 2020; BIELECKA et al., 2021). Esse processo é gerado pela atuação dos radicais livres (RLs), que são capazes de reagir com esses componentes celulares, provocando além de danos, eventual apoptose celular (WANG et al., 2021). Os principais RLs envolvidos em processos patológicos são representados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (ERN) (HOU et al., 2020).

O desequilíbrio entre a produção de RLs e as defesas do organismo gera uma condição que provoca o estresse oxidativo, que pode promover desordens fisiológicas, contribuindo tanto no processo de envelhecimento, como também em complicações biológicas incluindo inflamação crônica (HU et al., 2020), fibromialgia (TOBORE, 2021), doenças degenerativas como o diabetes (HUANG et al., 2021), doenças cardiovasculares (DAIBER et al., 2017; HUANG et al., 2021), doenças pulmonares (HUANG et al., 2021; SHARMA et al., 2021), câncer (NILSSON e LIU, 2020) e doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (HU et al., 2020).

Outro importante processo que interfere na interrupção da homeostasia é a glicação, no qual açúcares redutores reagem com componentes celulares, principalmente proteínas, por meio de uma complexa reação conhecida como reação de Maillard (TAKAHASHI et al., 2021). Esse processo é gerado pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, com um grupamento amina presente em proteínas, ácidos nucleicos e aminofosfolipídeos, resultando nos produtos de Amadori (MEHTA e DEETH, 2016). Esses produtos possuem grupos reativos de carbonila, que se condensam com grupos aminas primárias acessíveis, dando origem aos produtos finais da glicação avançada denominados de AGEs (*Advanced Glycation end Products*) (Figura 1) (KELLOW e COUGHLAN, 2015).

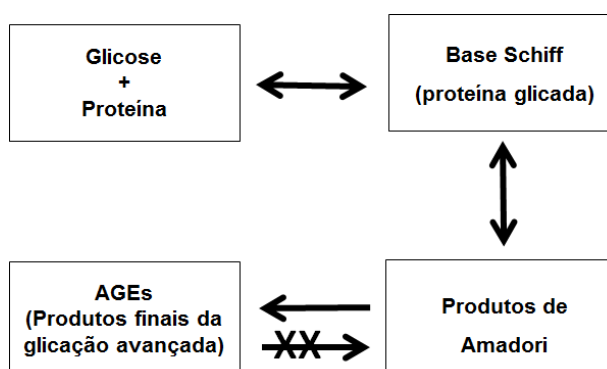


Figura 1. Reação de Maillard - Glicação proteica entre glicose e proteína. Fonte: Autor.

A interação celular dos AGEs desencadeia processos inflamatórios e o aumento do estresse oxidativo (TAKAHASHI et al., 2021; WU et al., 2021), por meio da geração de RLs, devido às ligações com proteínas e interações com receptores celulares, resultando assim em alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (TANAKA, 2011).

O acúmulo de AGEs é um processo predominantemente endógeno e natural do organismo, que aumenta lentamente com o envelhecimento, porém, o acúmulo anormal dessas substâncias pode ser induzido por fontes exógenas (Figura 2) (BIOTEC DERMOCOSMÉTICOS, 2016). Após sua formação, os AGEs podem interferir em diferentes reações, principalmente com citocinas, hormônios e no processo oxidativo, podendo desencadear patologias como o diabetes e suas complicações (ALGHAMDI et al., 2021; TAKAHASHI et al., 2021), aterosclerose (VLASSARA e URIBARRI, 2014; BASMAN et al., 2021), doença de Alzheimer (ALGHAMDI et al., 2021) e câncer (LIN et al., 2016; DARIYA e NAGARAJU, 2020), além de aumentar o risco de doença arterial coronariana (BASMAN et al., 2021).

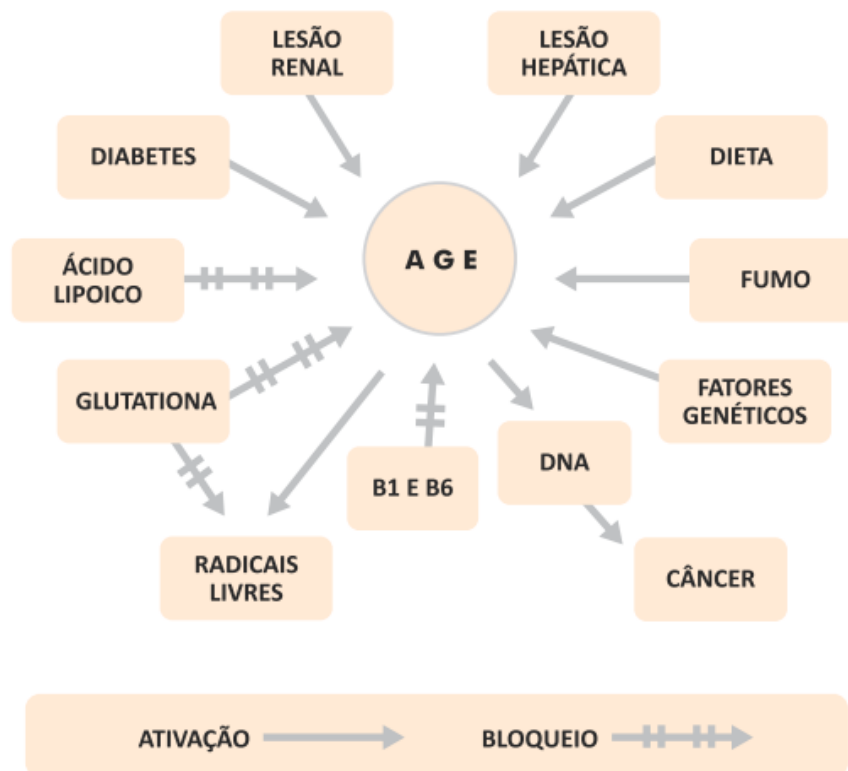


Figura 2. Causas, efeitos e inibição da formação de AGEs. Fonte: BIOTEC DERMOCOSMÉTICOS, 2016.

Os AGEs foram identificados como neurotoxinas e fatores pró-inflamatórios e apresentam receptores específicos no organismo denominados de RAGEs, uma proteína transmembrana pertencente à família de receptores de imunoglobulinas. A partir da interação AGE-RAGE ocorre estímulo das vias de sinalização relacionadas à inflamação intracelular como aumento do estresse oxidativo (Figura 3), além da sinalização em diversas patologias (ERUSALIMSKY, 2021; REN e YAN, 2021), relacionada ainda ao processo de envelhecimento precoce. A inibição da formação de AGEs reduz a interação AGE-RAGE e a supressão da expressão de RAGE pode ser uma estratégia potencial para o tratamento de patologias que são desencadeadas ou aceleradas por essa via de sinalização (WU et al., 2021).

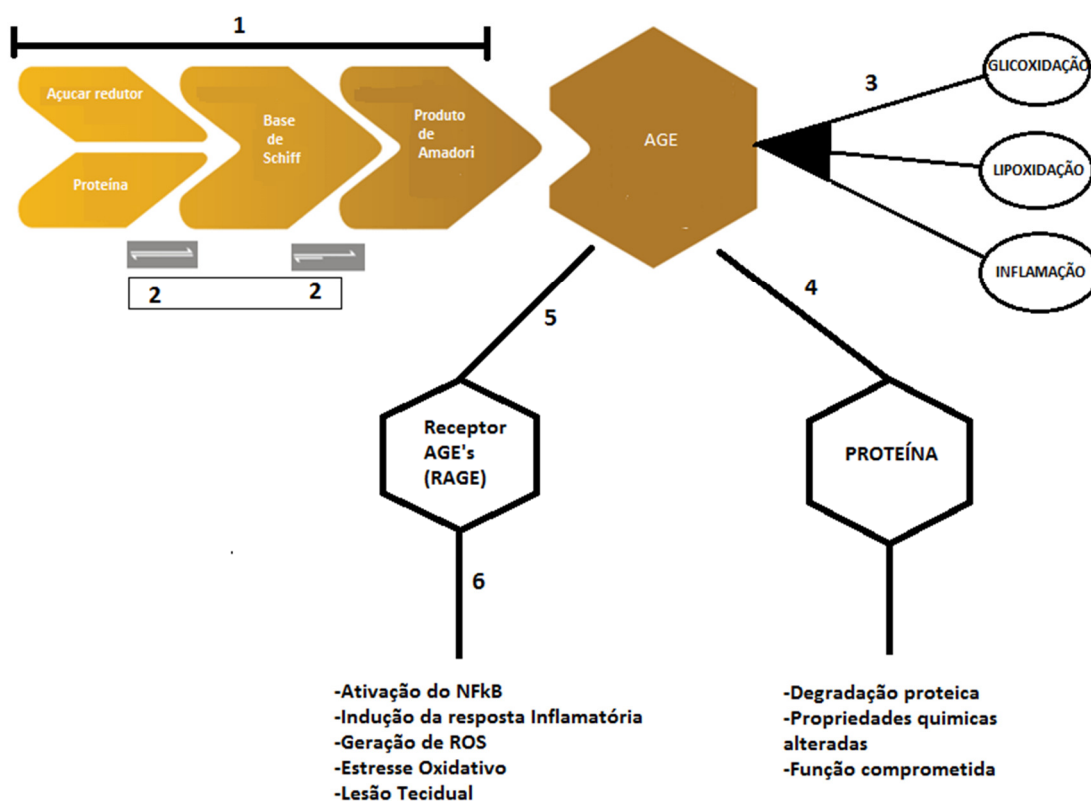


Figura 3. Formação e ação dos AGEs. Fonte: NÚCLEO DE INOVAÇÃO E PESQUISA, 2021.

O acúmulo progressivo de AGEs no organismo é resultado de uma combinação de AGEs provenientes da dieta e AGEs endógenos (WU et al., 2021). Compostos com atividades antioxidantes e antiglicantes têm sido estudados como candidatos para suprimir os prejuízos causados por RLs nos sistemas biológicos, assim como para bloquear o mecanismo envolvido na formação de AGEs (AMINJAFARI et al., 2016). Com isso, a busca por compostos naturais com atividades antioxidante e antiglicante se tornou alvo de estudos, para descoberta de

compostos ativos que possam prevenir e combater os danos causados pelo estresse oxidativo e glicação proteica (JIANG et al., 2016).

Ao longo dos anos, as plantas medicinais têm sido utilizadas para tratar diversas patologias, principalmente em países subdesenvolvidos, como alternativa mais rápida, prática e menos onerosa em comparação aos medicamentos convencionais (TAMANG et al., 2021). Diante disso, compostos de origem vegetal são fontes promissoras para tais estudos, como por exemplo os compostos fenólicos e, dentro deste grupo os flavonoides, que constituem a maior classe de fenólicos vegetais (BOUYAHYA et al., 2021; DAS et al., 2021), têm sido investigados como inibidores naturais de processos danosos ao organismo, além de contribuírem para elaboração de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentos funcionais (KALYNIUKOVA et al., 2021; ZAMAN et al., 2021).

Os polifenóis constituem um grupo diversificado de compostos fitoquímicos amplamente distribuídos nas plantas e podem se acumular em todas as partes da espécie vegetal como caules, folhas, flores, frutos e raízes (LIU et al., 2019). Muitos estudos têm sugerido que os polifenóis podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de danos promovidos pelo estresse oxidativo (JIAO et al., 2018) e, além disso, estudos demonstram sua ação sobre doenças coronárias, diabetes e câncer (DAS et al., 2021).

Diferentes espécies vegetais têm ganhado destaque em estudos científicos, por possuírem atividades importantes no controle dos danos oxidativos e dos fatores que intensificam e facilitam a ação prejudicial dos RLs. Entre estas espécies de interesse destacam-se a *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (ROY et al., 2012; COIMBRA et al., 2019) e a *Turnera ulmifolia* Linn (NASCIMENTO et al., 2006; BRITO et al., 2012), distintas quanto ao gênero e família e com características peculiares quanto ao seu desenvolvimento e abrangência.

Quanto a espécie *Pyrostegia venusta*, esta pertence à família Bignoniaceae, e é popularmente conhecida como flor ou cipó-de-são-joão, constitui-se por uma liana que multiplica rapidamente e é amplamente encontrada no Cerrado e Mata Atlântica brasileira, distribuindo-se em campos, orlas de matas, beiras de estradas e ao longo da costa no litoral (MAGALHÃES et al., 2010; ROSSATTO e KOLB, 2010). Essa espécie é nativa do Brasil (LORENZI, 1995) e apresenta expressiva dispersão em quase todo o sul e sudeste do Brasil (DUARTE e JURGENSEN, 2007) e, devido a sua inflorescência de cor laranja, é considerada como uma planta ornamental (SCALON et al., 2008; VELOSO et al., 2010) (Figura 4).



Figura 4. *Pyrostegia venusta*. Fonte: Autor.

Na medicina popular as flores de *P. venusta* são utilizadas em infusões e decocções (SCALON et al., 2008; VELOSO et al., 2010) para o tratamento de vitiligo, diarreia (RIBEIRO et al., 2017), infecções do sistema respiratório (CARDOSO et al., 2009), em infecções uterinas, icterícia, erisipela (CARDOZO et al., 2009; VELOSO et al., 2010), como antimicrobiana e cicatrizante (ROY et al., 2012). Em estudos realizados com extrato vegetal de *P. venusta* foi verificado a inexistência de toxicidade reprodutiva, efeitos genotóxico, carcinogênico e mutagênico (FERNANDES et al., 2011; VIEL et al., 2019).

No que diz respeito a composição fitoquímica da *P. venusta*, esta se apresenta como fonte de diversos compostos naturais e grande potencial relacionado as atividades biológicas com propriedades terapêuticas, que são desempenhadas por compostos fenólicos, principalmente flavonoides, identificados nas partes aéreas da planta (MAGALHÃES et al., 2010; VELOSO et al., 2010). Estudos fitoquímicos avaliando efeitos biológicos demonstraram que *P. venusta* apresenta efeitos anti-inflamatórios, antinociceptivos e anti-tumoral (VELOSO et al., 2014; FIGUEIREDO et al., 2014). Estudos ainda comprovam que as flores de *P. venusta* foram capazes de estimular a melanogênese no tratamento do vitiligo (MOREIRA et al., 2015). Na composição fitoquímica foram identificados a presença de alantoína, rutina, ácido caféico e derivados do ácido gálico, do ácido benzóico e do ácido p-cumárico (MOREIRA et al., 2012, COIMBRA et al., 2017).

A espécie *Turnera ulmifolia* pertencente à família Turneraceae, e popularmente conhecida como chanana, damiana, albina e saca-estepe é considerada uma erva daninha amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais na África e América do Sul (SZEWCZYK e ZIDORN, 2014). Essa espécie é nativa do México e da Índia Oriental e no Brasil é encontrada principalmente nas regiões norte e nordeste (ROIG, 1988). Atinge

aproximadamente 60 centímetros de altura e caracteriza-se por folhas aromáticas e flores constituídas de cinco pétalas brancas amareladas (ANTONIO; SOUZA BRITO, 1998) (Figura 5). Cresce em solos arenosos (HOSAMANI, 1993) e é adaptável a diferentes climas, podendo resistir a uma temperatura de até 85 °C em algumas ocasiões (SILVA et al., 2015).



Figura 5. *Turnera ulmifolia*. Fonte: Autor.

Na medicinal popular é utilizada como anti-inflamatória, para tratar sintomas de gripe e resfriado, atuando como expectorante, utilizada para desordens do sistema circulatório, na forma de chá para úlceras e distúrbios gastrointestinais como indigestão, constipação e diarreia (GRACIOSO et al., 2002; COUTINHO et al., 2009). As raízes de *T. ulmifolia* são preparadas por decocções para tratar inflamações uterinas (CARTAXO et al., 2010). As partes aéreas são utilizadas para o tratamento de prostatite e para diferentes tipos de câncer. No entanto, em algumas regiões esta espécie é utilizada como abortiva (GALVEZ et al., 2006).

No que diz respeito aos estudos científicos, estes demonstraram que esta espécie possui propriedades farmacológicas como anti-hiperglicêmica, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antifúngica, antioxidante, afrodisíaca e hipotensora (NASCIMENTO et al., 2006). Estudos fitoquímicos identificaram a presença de ácido clorogênico, ácido gálico, apigenina, rutina, quercetina, luteolina e diosmetina (BRITO et al., 2012; SZEWCZYK e ZIDORN, 2014).

Os estudos de extratos e compostos ativos naturais de origem vegetal, apesar de serem altamente difundidos, encontra limitações que podem interferir de maneira direta e indireta nos constituintes e na atividade biológica. Tais limitações constitui-se principalmente nas condições de preparo e formulações empregadas para produção dos extratos e compostos ativos, o que pode levar à alteração físico-química (pH, fotolabilidade, temperatura, entre outros) e assim alterar a atividade biológica esperada. Contudo, os avanços nas pesquisas de imobilização e

liberação de compostos ativos refletem uma tendência tecnológica mundial em todos os setores de produção, capaz de oferecer uma infinidade de benefícios e facilidades em todas as áreas de atuação, principalmente em sistemas mais eficientes para veicular e aumentar a eficácia de compostos ativos no organismo (MORA-HUERTASA et al., 2010). Somado a isso, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; EKALU, 2021; PRASATHKUMAR et al., 2021) e, entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destaca-se a encapsulação em diferentes estruturas como microcápsulas, lipossomas, microemulsões e nanopartículas poliméricas (HEINRICH et al., 2007).

O desenvolvimento de sistemas de imobilização e liberação com esses compostos vegetais na forma de microcápsulas é uma alternativa, para garantir a estabilidade do composto, facilitar a liberação de substâncias ativas e aumentar sua efetividade, uma vez que as microcápsulas conferem uma barreira física entre o composto presente no núcleo e os outros componentes da formulação (ALMEIDA et al., 2017).

A microencapsulação é uma técnica de revestimento amplamente difundida e que apresenta aplicação nas mais diversas áreas como farmacêutica, cosmética e alimentícia (NESTERENKO et al., 2013). Neste processo pequenas partículas do princípio ativo são rodeadas por um revestimento que formam pequenas cápsulas, cuja estrutura atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando sua exposição inadequada (JYOTHI et al., 2012) (Figura 5). As microcápsulas formadas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho em macropartículas ($\geq 5.000 \mu\text{m}$), micropartículas ($0,2$ a $5.000 \mu\text{m}$) ou nanopartículas ($\leq 0,2 \mu\text{m}$) (SILVA et al., 2014).

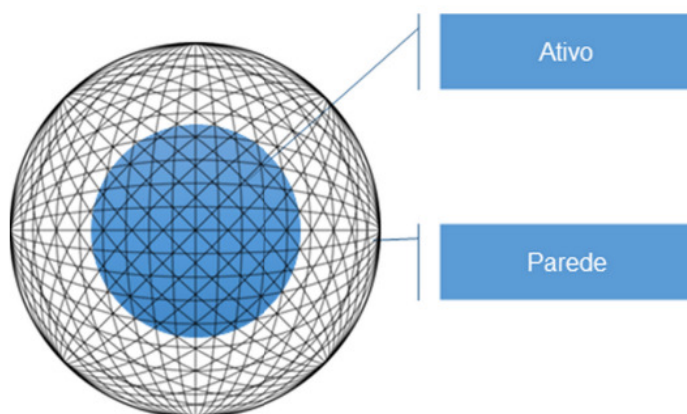


Figura 6. Morfologia da microcápsula. Fonte: PEREIRA et al. (2018).

Diferentes técnicas de microencapsulação podem ser empregadas para compostos bioativos e ingredientes alimentícios, e o que as diferenciam é o tipo de aprisionamento do material a ser encapsulado pelo agente encapsulante, que pode ser por secagem por spray, spray chilling, polimerização *in situ*, emulsificação e liofilização (TOLVE et al., 2016).

Existem diferentes compostos utilizados na microencapsulação e a seleção desse material é um requisito importante, pois influencia diretamente na eficiência da microencapsulação e na estabilidade do sistema (COSTA et al., 2015). Algumas características são desejáveis para o agente encapsulante de acordo com o método de encapsulamento selecionado, como as características das partículas desejadas incluindo tamanho, estabilidade, solubilidade e ainda liberação controlada, qual a aplicação pretendida do material encapsulado, a viabilidade e o custo do processo (SANTOS et al., 2021).

A maltodextrina é um polissacarídeo nutritivo, composto por cadeias de três a 20 unidades de D-glicose ligadas por cadeia α 1-4, que apresenta diferentes pesos moleculares (ELNAGGAR et al., 2010; BARRETO et al., 2015). Sua formação ocorre por meio da hidrólise do amido de milho, por ação ácida ou enzimática, que origina diferentes dextroses equivalentes (DE), indicando a extensão da hidrólise do amido equivalente e a massa molar. Apresenta boa aceitação na técnica de microencapsulação devido a sua baixa higroscopicidade, alta solubilidade, baixo custo e baixa viscosidade (COSTA et al., 2015; MAHDAVI et al., 2016).

Sendo assim, plantas medicinais como a *P. venusta* e a *T. ulmifolia* visam a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, possibilitando ampliar suas ações com o emprego da microencapsulação para estabilização de seus metabólitos. A possibilidade do desenvolvimento de ativos com capacidade para serem inseridos nas diferentes áreas da indústria farmacêutica, cosmética e até mesmo alimentícia, podem refletir diretamente na prevenção e tratamento do envelhecimento precoce, de doenças crônicas e degenerativas, das alterações morfofuncionais e do aumento da expressão de mediadores inflamatórios, devido ao seu potencial antioxidante e antiglicante.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica dos extratos brutos e frações das flores de *Pyrostegia venusta* e das partes aéreas de *Turnera ulmifolia* e desenvolver um método de microencapsulação dos extratos utilizando maltodextrina como material de parede.

Objetivos específicos

- 1- Determinar o conteúdo de compostos polifenólicos e flavonoides totais dos extratos das flores de *Pyrostegia venusta* e partes aéreas de *Turnera ulmifolia*;
2. Realizar o fracionamento direcionado para compostos flavonoídicos e caracterizar qualitativamente as frações, por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectro de massas (HPLC/MS);
3. Determinar a atividade antioxidante dos extratos pelos ensaios de DPPH, FRAP, NO, ORAC e inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos;
4. Determinar a atividade antiglicante dos extratos pelos ensaios de determinação do grupo de amins livres, inibição da formação de AGEs e mobilidade relativa em eletroforese;
5. Avaliar a citotoxicidade dos extratos por MTT em linhagem celular de fibroblastos;
6. Desenvolver um método de microencapsulação dos extratos avaliando a eficiência de encapsulação e liberação de compostos polifenólicos, avaliando também a atividade antioxidante por DPPH;
7. Analisar as microcápsulas formadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

REFERÊNCIAS

- ALGHAMDI, A.; FORBES, S.; BIRCH, D. J. S.; VYSHEMIRSKY, V.; ROLINSKI, O. J. Detecting beta-amyloid glycation by intrinsic fluorescence – Understanding the link between diabetes and Alzheimer's disease. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 704, p. 108886, 2021. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108886
- ALMEIDA, E. T. C.; SILVA, M. C. D.; OLIVEIRA, J. M. S.; KAMIYA, R. U.; ARRUDA, R. E. S.; VIEIRA, D. A.; SILVA, V. C.; ESCODRO, P. B.; BASÍLIO-JÚNIORA, I. D.; NASCIMENTO, T. C. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280-287, 2017. DOI: 10.1016/j.jpha.2017.03.004
- AMINJAFARI, A.; MIROLIAEI, M.; ANGELOVA, V. T.; EMAMZADEH, R.; DJUKIC, M. M.; DJURIC, A.; SASO, L. Antioxidant activity and protective role on protein glycation of synthetic aminocoumarins. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 24, p. 43-48, 2016. DOI: 10.1016/j.ejbt.2016.08.004
- ANTONIO, M. A.; SOUZA BRITO, A. R. M. Oral anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 3, p. 215-228, 1998. DOI: 10.1016/s0378-8741(98)00049-x
- BARRETO, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164-174, 2015. DOI: 0.5902/2179-460X197471
- BASMAN, C.; FISHMAN, S. L.; AVTANSKI, D.; RASHID, U.; KODRA, A.; CHEN, K.; JONAS, R.; STOFFELS, G. J.; LESSER, M.; INLALL, D.; ZISKOVICH, K.; SINGH, V.; PORETSKY, L. Glycosylated hemoglobin, but not advanced glycation end products, predicts severity of coronary artery disease in patients with or without diabetes. **Metabolism Open**, v. 7, p. 100050, 2020. DOI: 10.1016/j.metop.2020.100050
- BIELECKA, M.; CICHOSZ, G.; CZECZOT, H. Antioxidant, antimicrobial and anticarcinogenic activities of bovine milk proteins and their hydrolysates - a review. **International Dairy Journal**, p. 105208, Sept. 2021. DOI: 10.1016/j.idairyj.2021.105208
- BIOTEC DERMOCOSMÉTICOS. **Glycoxil**, 2016. 45 p.
- BOUYAHYA, A.; GUAOUGUAOU, F. E.; OMARI, N. E.; MENYIY, N. E.; BALAHBIB, A.; EL-SHAZLY, M.; BAKRI, Y. Anti-inflammatory and analgesic properties of Moroccan medicinal plants: Phytochemistry, in vitro and in vivo investigations, mechanism insights, clinical evidences and perspectives. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, Jul. 2021. DOI: 10.1016/j.jpha.2021.07.004
- BRITO, N. J. N.; LÓPEZ, J. A.; NASCIMENTO, M. A.; MACÊDO, J. B. M.; SILVA, G. A.; OLIVEIRA, C. N.; REZENDE, A. A.; BRANDÃO-NETO, J.; SCHWARZ, A.; ALMEIDA, M. G. Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 12, p. 4340-4347, 2012. DOI: 10.1016/j.fct.2012.08.003

CARDOSO, D. B. O. S.; FRANÇA, F.; NOVAIS, J. S.; FERREIRA, M. H. S.; SANTOS, R. M.; CARNEIRO, V. M. S.; GONÇALVES, J. M. Floristic composition and phytogeographical analysis of a semideciduous forest in Bahia State, Brazil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 1055-1076, 2009. DOI: 10.1590/2175-7860200960416

CARDOZO, N. P.; PARREIRA, M. C.; ALVES, P. L.; BIANCO, S. Área foliar de duas trepadeiras infestantes de cana-de-açúcar utilizando dimensões lineares de folhas. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 683-687, 2009. DOI: 10.1590/S0100-83582009000400006

CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326-342, 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2010.07.003

COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CASTRO, A. H. F. Influence of plant growth regulators and light on callus induction and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae). **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 55, p. 584-590, 2017.

COIMBRA, M. C.; CHAGAS, R. C. R.; VILELA, M. S. P.; CASTRO, A. H. F. Growth, morphology and bioactive phenolic compounds production in *Pyrostegia venusta* calli. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101036, 2019. DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101036

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: uma revisão abrangente sobre seus usos medicinais tradicionais, fitoquímicos, atividades farmacológicas, mecanismos de ação e toxicidade. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 662-691, 2018. DOI: 10.1016/j.arabjc.2016.01.004

COSTA, S. S.; MACHADO, B. A. S.; MARTINS, A. R.; BAGNARA, F.; RAGADALLI, S. A.; ALVES, A. R. C. Drying by spray drying in the food industry: micro-encapsulation, process parameters and main carriers used. **African Journal of Food Science**, v. 9, n. 9, p. 462-470, 2015. DOI: 10.5897/AJFS2015.1279

COUTINHO, H. D.; COSTA, J. G.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 13, 2009. DOI: 10.1186/1472-6882-9-13

DAIBER, A.; OELZE, M.; STEVEN, S.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; MÜNZEL, T. Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system. **Redox Biology**, v. 12, p. 35-49, 2017. DOI: 10.1016/j.redox.2017.02.001

DARIYA, B.; NAGARAJU, G. P. Advanced glycation end products in diabetes, cancer and phytochemical therapy. **Drug Discovery Today**, v. 25, n. 9, p. 1614-1623, 2020. DOI: 10.1016/j.drudis.2020.07.003

DAS, R.; MITRA, S.; TAREQ, A. M.; EMRAN, T. B.; HOSSAIN, M. J.; ALQAHTANI, A. M.; ALGHAZWANI, Y.; DHAMA, K.; SIMAL-GANDARA, J. Medicinal plants used against hepatic disorders in Bangladesh: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, p. 114588, Sept. 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114588

DUARTE, M. R.; JURGENSEN, I. Morpho-anatomical diagnosis of the leaf and stem of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, bignoniaceae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 70-75, 2007.

EKALU, A. Medicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities of *Mitracarpus* species (Rubiaceae): A review. **Scientific African**, v. 11, p. e00692, 2021. DOI: 10.1016/j.sciaf.2020.e00692

ELNAGGAR, Y. S. R.; EL-MASSIK, A. M.; ABDALLAH, O. Y.; EBIAN, A. E. R. Maltodextrin: a novel excipient used in sugar-based orally disintegrating tablets and phase transition process. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 11, n. 2, p. 645-651, 2010. DOI: 10.1208/s12249-010-9423-y

ERUSALIMSKY, J. D. The use of the soluble receptor for advanced glycation-end products (sRAGE) as a potential biomarker of disease risk and adverse outcomes. **Redox Biology**, v. 42, p. 101958, 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101958

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

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; PEREIRA, F. V.; RABAÇA, A. N.; FARIAS, C. F.; GIROLA, N.; MASSAOKA, M. H.; AZEVEDO, R. A.; SCUTTI, J. A. B.; ARRUDA, D. C.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, E. G.; LAGO, J. H. G.; TRAVASSOS, L. R.; SILVA, R. M. G. *Pyrostegia venusta* heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 38, p. S363-S376, 2014. DOI: 10.4103/0973-296.133284

GALVEZ, J.; DE SOUZA GRACIOSO, J.; CAMUESCO, D.; GALVEZ, J.; VILEGAS, W.; MONTEIRO SOUZA BRITO, A. R.; ZARZUELO, A. Intestinal antiinflammatory activity of a lyophilized infusion of *Turnera ulmifolia* in TNBS rat colitis. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7-8, p. 515-520, 2006. DOI: 10.1016/j.fitote.2006.05.029

GEORGE, S.; ABRAHAMSE, H. Redox Potential of Antioxidants in Cancer Progression and Prevention. **Antioxidants**, v. 9, n. 11, p. 1156, 2020. DOI: 10.3390/antiox9111156

GRACIOSO, J. S.; VILEGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R. Effects of Tea from *Turnera ulmifolia* L. on Mouse Gastric Mucosa Support the Turneraceae as a New Source of Antiulcerogenic Drugs. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 4, p. 487-491, 2002. DOI: 10.1248/bpb.25.487

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E. M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**, London: Elsevier, 2007.

HOSAMANI, K. M. Fatty acids in seed oil from *Turnera ulmifolia*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1363-1365, 1993. DOI: 10.1016/0031-9422(91)80030-5

HOU, J. T.; YU, K. K.; SUNWOO, K.; KIM, W. Y.; KOO, S.; WANG, J.; REN, W. X.; WANG, S.; YU, X. Q.; KIM, J. S. Fluorescent Imaging of Reactive Oxygen and Nitrogen Species Associated with Pathophysiological Processes. **Chem**, v. 6, n. 4, p. 832-866, 2020. DOI: 10.1016/j.chempr.2019.12.005

HU, K.; LIU, Y. L.; OLEINICK, A.; MIRKIN, M. V.; HUANG, W. H.; AMATORE, C. Nanoelectrodes for intracellular measurements of reactive oxygen and nitrogen species in single living cells. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 22, p. 44-50, 2020. DOI: 10.1016/j.coelec.2020.04.003

HUANG, X.; HE, D.; PAN, Z.; LUO, G.; DENG, J. Reactive-oxygen-species-scavenging nanomaterials for resolving inflammation. **Materials Today Bio**, v. 11, p. 100124, 2021. DOI: 10.1016/j.mtbio.2021.100124

JIANG, X.; KUANG, F.; KONG, F.; YAN, C. Prediction of the antiglycation activity of polysaccharides from *Benincasa hispida* using a response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 358-363, 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.05.079

JIAO, Y.; KILMARTIN, P. A.; FAN, M.; QUEK, S. Y. Assessment of phenolic contributors to antioxidant activity of new kiwifruit cultivars using cyclic voltammetry combined with HPLC. **Food Chemistry**, v. 268, p. 77-85, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.06.046

JYOTHI, S. S.; SEETHADEVI, A.; PRABHA, K. S.; MUTHPRASANNA, P.; PAVITRA, P. Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 3, n. 1, p. 509-531, 2012.

KALYNIUKOVA, A.; HOLUSA, J.; MUSIOLEK, D.; SEDLAKOVA-KADUKOVA, J.; PLOTKA-WASYLKA, J.; ANDRUCH, V. Application of deep eutectic solvents for separation and determination of bioactive compounds in medicinal plants. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114047, 2021. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.114047

KELLOW, N. J.; COUGHLAN, M. T. Effect of diet-derived advanced glycation end products on inflammation. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 11, p. 737-759, 2015. DOI: 10.1093/nutrit/nuv030

LIN, J. A.; WU, C. H.; LU, C. C.; HSIA, S. M.; YEN, G. C. Glycative stress from advanced glycation end products (AGEs) and dicarbonyls: an emerging biological factor in cancer onset and progression. **Molecular Nutrition Food Research**, v. 60, p. 1850-1864, 2016. DOI: 10.1002/mnfr.201500759

LIU, Y.; QI, Y.; CHEN, X.; HE, H.; LIU, Z.; ZHANG, Z.; REN, Y.; REN, X. Phenolic compounds and antioxidant activity in red- and in green-fleshed kiwifruits. **Food Research International**, v. 116, p. 291-301, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.08.038

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. 4. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum. 1995. 1088 p.

MAGALHÃES, E. A.; SILVA-JÚNIOR, G. J.; CAMPOS, T. A.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoniaceae, em medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 65-69, 2010. DOI: 10.1590/S0102-695X2010000100014

MAHDAVI, S. A.; JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; DEHNAD, D. Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 379-385, 2016. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.01.011

MEHTA, B. M.; DEETH, H. C. Blocked Lysine in Dairy Products: Formation, Occurrence, Analysis, and Nutritional Implications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, p. 206-218, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12178

MORA-HUERTASA, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.10.018

MOREIRA, C. G.; CARRENHO, L. Z. B.; PAWLOSKI, P. L.; SOLEY, B. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 315-325, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.080

MOREIRA, C. G.; HORINOUCI, C. D. S.; SOUZA-FILHO, C. S.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 1005-1011, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.03.047

NASCIMENTO, M. A., SILVA, A. K., FRANÇA, L. C. B., QUIGNARD, E. L. J., LOPEZ, J. A., ALMEIDA, M. G. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 12, p. 1387-1391, 2006. DOI: 10.1016/j.biortech.2005.07.009

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recente interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.06.035

NILSSON, R.; LIU, N. A. Nuclear DNA damages generated by reactive oxygen molecules (ROS) under oxidative stress and their relevance to human cancers, including ionizing radiation-induced neoplasia part I: Physical, chemical and molecular biology aspects. **Radiation Medicine and Protection**, v. 1, n. 3, p. 140-152, 2020. DOI: 10.1016/j.radmp.2020.09.002

NÚCLEO DE INOVAÇÃO E PESQUISA. **Reduza sinais e processos de envelhecimento com antigiticantes naturais**. Disponível em: <https://inovacao.farmaciaoartesanal.com/reduza-sinais-e-processos-de-envelhecimento-com-antigiticantes-naturais/>. Acesso em: 20 set. 2021.

PEREIRA, K. C.; FERREIRA, D. C. M.; ALVARENGA, G. F.; PEREIRA, M. S. S.; BARCELOS, M. C. S.; COSTA, J. M. G. Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. e2017083, 2018. DOI: 10.1590/1981-6723.08317

PRASATHKUMAR, P.; ANISHA, S.; DHRIYA, C.; BECKY, R.; SADHASIVAM, S. Therapeutic and pharmacological efficacy of selective Indian medicinal plants – A review. **Phytomedicine Plus**, v. 1, n. 2, p. 100029, 2021. DOI: 10.1016/j.phyplu.2021.100029

REN, L.; YAN, H. Targeting AGEs-RAGE pathway inhibits inflammation and presents neuroprotective effect against hepatic ischemia-reperfusion induced hippocampus damage. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, p. 101792, Aug. 2021. DOI: 10.1016/j.clinre.2021.101792

RIBEIRO, R. V.; BIESKI, I. G. C.; BALOGUN, S. O.; MARTINS, D. T. O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69-102. 2017. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.023

ROIG, J. T. **Plantas medicinales, aromaticas o venenosas de Cuba**. Havana: Editorial Científico-Técnica, 1988. Vol. 2.

ROSSATTO, D. R.; KOLB, R. M. Germinação de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), viabilidade de sementes e desenvolvimento pós-seminal. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 51-60, 2010. DOI: 10.1590/S0100-84042010000100006

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.008

SANTOS, P. D. F.; RUBIO, F. T. V.; SILVA, M. P.; PINHO, L. S.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of carotenoid-rich materials: A review. **Food Research International**, v. 147, p. 110571, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110571

SCALON, S. P. Q.; VIEIRA, M. C.; LIMA, A. A.; SOUZA, C. M.; MUSSURY, R. M. Tratamentos pré-germinativos e temperaturas de incubação na germinação de cipó-de-São-João [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers] - Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, n. 4, p. 37-42, 2008.

SHARMA, A.; TEWARI, D.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M.; HABTEMARIAM, H. Reactive oxygen species modulators in pulmonary medicine. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 57, p. 157-164, 2021. DOI: 10.1016/j.coph.2021.02.005

SILVA, A. E. P.; MOURA, J. W. M.; LÚCIO NETO, M. P. Evaluation toxicity, cytotoxic, genotoxic and mutagenic of *Turnera ulmifolia* L. (chanana) in eukaryotic cells. **Revista Saúde em Foco**, v. 2, n. 1, p. 25-48, 2015.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014. DOI: 10.1590/0103-8478cr20130971

SZEWCZYK, K.; ZIDORN, C. Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, n. 3, p. 424-443, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2014.01.019

TAKAHASHI M.; SUZUKI K.; IKEDA Y.; TANIGUCHI N. Glycation in Disease. **Comprehensive Glycoscience**, v. 5, p. 119-132, 2021. DOI: 10.1016/B978-0-12-819475-1.00057-2

TAMANG, S.; SINGH, A.; BUSSMANN, R. W.; SHUKLA, V.; NAUTIYAL, M. C. Ethno-medicinal plants of tribal people: A case study in Pakyong subdivision of East Sikkim, India. **Acta Ecologica Sinica**, Sep. 2021. DOI: 10.1016/j.chnaes.2021.08.013

TANAKA, K.; TANI, Y.; ASAI, J.; NEMOTO, F.; KUSANO, Y.; SUZUKI, H.; HAYASHI, Y.; ASAH, K.; KATOH, T.; MIYATA, T.; WATANABE, T. Skin autofluorescence is associated with renal function and cardiovascular diseases in pre-dialysis chronic kidney disease patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 26, p. 214-220, 2011. DOI: 10.1093/ndt/gfq369

TOBORE, T. O. Towards a Comprehensive Theory of Non-Cancer Acute and Chronic Pain Management: The Critical Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pain, and Opioid Dependence, Addiction, Hyperalgesia, and Tolerance. **Advances in Redox Research**, v. 2, p. 100003, 2021. DOI: 10.1016/j.arres.2021.100003

TOLVE, R.; GALGANO, F.; CARUSO, M. C.; TCHUENBOU-MAGAIA, F. L.; CONDELLI, N.; FAVATI, F.; ZHANG, Z. Encapsulation of health-promoting ingredients: applications in foodstuffs. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 8, p. 888-918, 2016. DOI: 10.1080/09637486.2016.1205552

VELOSO, C. C.; BITENCOURT, A. D.; CABRAL, L. D. M.; FRANQUI, L. S.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 355-358, 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2010.07.053

VELOSO, C. C.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, C. C.; RODRIGUES, V. G.; GIUSTI-PAIVA, A.; TEIXEIRA, M. M.; DUARTE, I. D.; FERREIRA, A. V. M.; PEREZ, A. C. Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 722-728, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.046

VIEL, A. M.; SILVA, L. P.; MARTINS, G. F.; URTREMARI, B.; SEKIYA, A.; DOKKEDAL, A. L.; SOUZA, E. B.; CAMARGO, I. C. C.; SILVA, R. M. G. Toxicological, genotoxic and antioxidant potential of *Pyrostegia venusta*. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 2, p. 570-585, 2019. DOI: 10.14393/BJ-v35n2a2019-41790

VLASSARA, H.; URIBARRI, J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? **Current Diabetes Reports**, v. 14, n. 1, p. 453, 2014. DOI: 10.1007/s11892-013-0453-1

WANG, X. Q.; WANG, W.; PENG, M.; ZHANG, X. Z. Free radicals for cancer theranostics. **Biomaterials**, v. 266, p. 120474, 2021. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120474

WU, X. Q.; ZHANG, D. D.; WANG, Y. N.; TAN, Y. Q.; YU, X. Y.; ZHAO, Y. Y. AGE/RAGE in diabetic kidney disease and ageing kidney. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 171, p. 260-271, 2021. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.025

ZAMAN, W.; YE, J.; SAQIB, S.; LIU, Y.; SHAN, Z.; HAO, D.; CHEN, Z.; XIAO, P. Predizendo plantas medicinais potenciais com topologia filogenética: inspiração da pesquisa da medicina tradicional chinesa. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 281, p. 114515, 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114515

CAPÍTULO 1

Atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica do extrato e fração de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers e desenvolvimento de método de microencapsulação

RESUMO

Pyrostegia venusta (Ker-Gawl.) Miers, pertence a família Bignoniaceae e é popularmente conhecida como flor ou cipó-de-são-jão, uma espécie nativa do cerrado brasileiro. Na medicina popular é amplamente utilizada para tratamento de vitiligo e como anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-tumoral. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de compostos fenólicos em sua composição, o que torna essa espécie alvo de interesse para estudos que buscam compostos vegetais, que possam ser empregados na prevenção e tratamento de processos danosos ao organismo, como o estresse oxidativo e a glicação proteica, ambos associados à doenças degenerativas. O presente estudo teve como objetivo avaliar o extrato bruto de flores de *P. venusta* quanto ao teor de polifenóis e flavonoides totais e determinar o perfil cromatográfico de seus constituintes por HPLC/MS e CCDc. Objetivou avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica, além de desenvolver um método de microencapsulação do extrato em maltodextrina. Os resultados obtidos demonstraram que o extrato bruto de *P. venusta* obtido por maceração (EBPvm) na concentração de 10 mg/mL apresentou maior presença de compostos polifenólicos (1060,4 µg equivalente ácido gálico/g de extrato) e flavonoides totais (1063,0 µg equivalente rutina/g de extrato), comparado ao extrato bruto de *P. venusta* obtido por percolação (EBPvp). Na concentração de 1000 µg/mL o EBPvm apresentou 82,5%, enquanto o EBPvp obteve 72,6% de atividade antioxidante sequestradora do radical livre DPPH, com efeito concentração dependente. A atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP demonstrou maior potencial redutor do extrato na concentração de 1000 µg/mL para EBPvm (1244,0 µM ET/g de extrato seco) comparado ao EBPvp (966,3 µM ET/g de extrato seco), resultados semelhantes ao teste de NO, no qual o EBPvm também apresentou melhor resultado comparado ao EBPvp com 5,8 e 5,5 µM/mL de nitrito para EBPvm e EBPvp, respectivamente. A capacidade antioxidante verificada nos testes ORAC-FL e inibição da hemólise oxidativa apresentou comportamento dose dependente de concentração. Na atividade antiglicante o EBPvm na concentração de 10 mg/mL apresentou 68,45% de grupos amino livres, 77,00% de inibição da formação de AGEs e inibição da glicação da proteína por MRE. O extrato das flores de *P. venusta* apresentou redução da viabilidade celular por MTT nas maiores concentrações. Na análise das microcápsulas foi verificada maior eficiência de encapsulação para o EBPvm encapsulado com 5,0 gramas de maltodextrina, avaliada por encapsulação e liberação de compostos polifenólicos. Com os resultados obtidos foi possível verificar potencial antioxidante e antiglicante para o extrato das flores de *P. venusta*, possivelmente associadas ao teor de compostos polifenólicos, principalmente flavonoides, identificados em sua composição. Além disso, foi possível constatar eficácia no método de microencapsulação realizado por liofilização com maltodextrina.

Palavras chave: AGEs; estresse oxidativo; glicação; flavonoides; polifenóis.

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são compostos químicos, geralmente originados do metabolismo secundário vegetal, e que fazem parte de diferentes classes químicas, sendo responsáveis por diversas atividades biológicas (ZHANG et al., 2013). Neste contexto, a classe dos compostos fenólicos tornou-se alvo de interesse científico, devido as suas propriedades benéficas a saúde, pois apresentam significativa atividade antioxidante, com capacidade de reduzir os riscos de doenças degenerativas, cardiovasculares e câncer, além de apresentar atividade inibitória da glicação proteica e formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) (WU et al., 2019).

Os compostos antioxidantes naturais, encontrados em diferentes espécies vegetais, são representados principalmente por dois grupos, os ácidos fenólicos e os flavonoides, capazes de sequestrar e inativar os radicais livres atuando na prevenção do estresse oxidativo (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015; CHANG et al., 2016). Além da ação do acúmulo de radicais livres no estresse oxidativo, outro processo fisiológico atua nesse desequilíbrio, proporcionada pela glicação de biomoléculas, uma reação não enzimática. Este processo está associado ao aumento da produção de compostos oxidantes altamente reativos, que promovem a formação dos AGEs, alterando a estrutura e funções das biomoléculas, tais como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (KALUDERCIC e DI LISA, 2020).

A busca de novos ativos naturais com atividade antioxidante e antiglicante tem sido cada vez mais alvo de pesquisas, pois diminuição e/ou eliminação do estresse oxidativo e formação de AGEs promovem a estabilidade fisiológica em diferentes tipos de doenças e comorbidades. Assim as plantas medicinais, geralmente utilizadas de forma empírica e por populações específicas, representam importante fonte de novos antioxidantes e antiglicantes (AHMAD e AHMED, 2006) e entre as diferentes espécies potencialmente antioxidante destaca-se a *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (FERREIRA et al., 2019).

Esta espécie pertencente à família Bignoniaceae que abrange aproximadamente 113 gêneros e 800 espécies, constitui-se por uma liana conhecida popularmente como flor ou cipó-de-são-joão, com ampla distribuição principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil (ROSSATTO e KOLB, 2010). Estudos fitoquímicos comprovam a presença de compostos polifenólicos, principalmente flavonoides, que conferem as atividades biológicas demonstradas por essa espécie, como atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e anti-tumoral, além de estimular a melanogênese no tratamento do vitiligo (CARDOSO et al., 2009; VELOSO et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2014; VELOSO et al., 2014).

Compostos bioativos naturais são quimicamente instáveis e suscetíveis à degradação oxidativa, entretanto, quando expostos a fatores ambientais e à técnica de encapsulação é uma tecnologia adequada para garantir a estabilidade e controlar a liberação desses compostos, preservando a bioatividade de diferentes compostos naturais e garantindo sua funcionalidade benéfica à saúde, na prevenção e tratamento de doenças (NIKMARAM et al., 2017).

Com sua ampla aplicação, o processo de encapsulação tem atraído cada vez mais o interesse das indústrias farmacêuticas, alimentícia e de cosméticos (CUI et al., 2021). A microencapsulação é uma ferramenta cada vez mais utilizada, pois conserva a capacidade antioxidante e preserva a estabilidade térmica dos flavonoides, protegendo esses compostos sensíveis a ação extrínseca (ROSA et al., 2013).

Existem diferentes métodos de preparação e obtenção de microcápsulas, sendo que o método por liofilização proporciona uma eficiente proteção dos compostos bioativos, utilizando principalmente a Maltodextrina como material de parede encapsulador, pois a mesma apresenta alta solubilidade, boa biocompatibilidade, viscosidade e segurança para o encapsulamento de compostos bioativos (TOLUN et al., 2016; MAR et al., 2020).

Diante do exposto o presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante, antiglicante e citotóxica dos extratos brutos e frações das flores de *Pyrostegia venusta*, assim como desenvolver um método de microencapsulação dos extratos utilizando maltodextrina como material de parede.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparo dos extratos vegetais

2.1.1 Coleta do material vegetal

As flores de *P. venusta* foram coletadas de espécime de vegetação remanescente próximo ao campus da UNESP / Assis, SP, Brasil (22 ° 32'26"S e 50°22'31"N e 22 ° 32'18"S; 50 ° 22'47"N) e uma cópia foi taxonomicamente identificada no Herbário do Instituto Florestal de Assis, São Paulo, Brasil (espécime voucher: SPSF - 40207). A coleta foi feita de forma sustentável e sem causar impacto ambiental à espécie coletada.

O material vegetal (flores) coletado foi levado ao laboratório de Fitoterápicos e Produtos Naturais do Departamento de Biotecnologia da UNESP, onde foi selecionado e seco em estufa de ar forçado em temperatura média de 40 °C, até obtenção de peso constante. Logo após, foi realizada a pulverização em moinho de facas para obtenção de pó fino para preparação dos extratos.

2.1.2 Preparo dos extratos brutos

2.1.2.1 Extrato hidroetanólico por Maceração

O extrato hidroetanólico (70%) foi preparado na proporção de 1:10 (p/v), submetido à agitação mecânica por um período de 24 horas em temperatura ambiente. Após esse período a mistura foi filtrada a vácuo, nos quais os resíduos vegetais foram extraídos novamente por duas vezes. Os volumes resultantes das três extrações foram reunidos e levados ao rotaevaporador sobre pressão reduzida, para eliminação completa do álcool. O extrato aquoso resultante foi congelado e posteriormente liofilizado. O extrato seco de *P. venusta* (EBPvm) obtido foi utilizado na caracterização fitoquímica e nos bioensaios.

2.1.2.2 Extrato hidroetanólico por Percolação

O extrato hidroetanólico foi obtido por percolação do pó com solução de etanol (70%). O pó (500 g) foi previamente intumescido com 2 litros de solução hidroetanólica durante 2 horas em béquer. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó+etanol+água), sendo o empacotamento feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo alocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu à proporção 5:1, referente ao volume do percolador e do material vegetal, em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi entre 1-2,0 mL/min/Kg de material vegetal e após este período o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador sobre pressão reduzida, para eliminação completa do álcool. O extrato aquoso resultante foi congelado e posteriormente liofilizado. O extrato seco de *P. venusta* (EBPvp) obtido foi utilizado na caracterização fitoquímica e nos bioensaios.

2.1.2.3 Obtenção da fração flavonoídica

O fracionamento direcionado à obtenção de fração concentrada em flavonoides, utilizou a metodologia proposta por Costa et al. (2011), com pequenas adaptações. O fracionamento direcionado foi realizado com o extrato que apresentasse maior atividade antioxidante. Para tanto, 2 g de extrato hidroetanólico seco de *P. venusta* (EBPvm) foi diluído em 300 mL de água destilada e, em seguida a mistura foi submetida a extração líquido-líquido com n-butanol (4x150 mL) resultando em 600 mL de fração n-butanólica. Após a remoção do solvente em rotaevaporador, a fração foi ressuspensa em metanol e eluída em coluna cromatográfica preenchida com sílica gel para coluna (60 mesh), na proporção de 25:25:5 (fração extrato:sílica:metanol; m/m/v). Em sequência, a sílica foi filtrada e os compostos adsorvidos extraídos com metanol (2x200 mL), resultando em 400 mL de fração enriquecida em

flavonoides. O metanol foi eliminado em rotaevaporador e a secagem final da fração de *P. venusta* foi realizada por liofilização.

2.2 Análise fitoquímica dos extratos

2.2.1 Determinação de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado com o extrato diluído em álcool etílico absoluto em diferentes concentrações, de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965), utilizando ácido gálico como padrão de referência. Inicialmente foi adicionado 0,1 mL das amostras a 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. No tubo branco foram misturados 5,1 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Os tubos com as misturas reacionais foram mantidos à temperatura ambiente por 3 minutos e, em seguida foi adicionado 1,4 mL de solução de carbonato de sódio 25% e 3 mL de água destilada. A mistura foi agitada e permaneceu por 1 hora à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A absorbância foi mensurada a 765 nm em espectrofotômetro UV-visível e o teor de polifenóis totais foi determinado a partir de uma curva de calibração de ácido gálico e expressos como mg equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato seco. As análises foram realizadas em triplicada.

2.2.2 Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides totais foram mensurados pelo método de ensaio colorimétrico (CHRIST e MUELLER, 1960). Foi misturado 1 mL das amostras de extrato diluído em álcool etílico absoluto em diferentes concentrações, com 4 mL de etanol a 70% e 0,5 mL de solução de NaNO_2 a 5%. Após 6 minutos foram adicionados 0,5 mL de solução AlCl_3 a 10%; 3 mL de solução NaOH 1M e 1 mL de água destilada. A mistura foi agitada e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo submetida posteriormente à leitura em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 510 nm. Os flavonoides foram calculados a partir da curva de calibração de rutina e expressos como mg equivalente rutina (ER) por grama de extrato seco. As análises foram realizadas em triplicada.

2.2.3 Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDc)

A cromatografia em camada delgada comparativa (CCDc) foi realizada como método qualitativo para a avaliação de flavonoides. Nesta análise foram utilizados os extratos brutos na concentração de 10 mg/mL dissolvidos em metanol. As cromatografias foram desenvolvidas em cromatofolha sílica gel 60 GF254 (Merck®) e como fase móvel para a visualização de

flavonoides foram utilizados clorofórmio:metanol:água (75:23:12 v/v/v). Para a visualização de flavonoides foi borrifada uma solução de 2-aminoetil difenilborinato (1,0% p/v) em metanol, seguido por uma solução de polietilenoglicol 400 (5% p/v) em metanol (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984). As placas foram visualizadas sob luz UV366 e fotografadas.

2.3 Análise em HPLC/MS

O “fingerprint” do EBPvm foi analisado usando HPLC-ESI-IT-MS (Accela High Speed LC da Thermo Scientific®, acoplado a um Accela Thermo Scientific® LCQ Fleet com Ion Trap 3D e ionização por eletropulverização (Coluna Phenomenex® Luna C18 (2)). As condições para HPLC foram em uma coluna de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm; uma fase móvel com água ultra-pura + ácido fórmico 0,1% (A) e metanol + ácido fórmico 0,1 % (B); um gradiente de 25% de A a 100% de B em 80 min; um volume de injeção de 20,0 µL; uma temperatura de coluna de 25 °C; uma razão de fluxo de 0,8 mL/min, $\lambda = 254$ nm FIA-ESI-IT-MSn realizado no modo negativo.

2.4 Avaliação da atividade antioxidante

2.4.1 Atividade sequestradora do radical livre DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante no sequestro do radical livre DPPH foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) com modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato (100 mM, pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução etanólica de DPPH (500 µM) e 50 µL dos extratos diluídos em álcool etílico absoluto em diferentes concentrações foi agitada em vórtex e permaneceu em repouso por um período de 30 minutos, em ambiente de pouca luminosidade. O DPPH apresenta máxima absorbância à 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H⁺, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. As absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. A atividade sequestradora do radical DPPH foi expressa em porcentagem sendo calculada de acordo com a seguinte equação: Atividade antioxidante (%) = $[(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controle}}] \times 100$. Onde, A_{controle} é a absorbância do controle (contendo tudo exceto a amostra) e A_{amostra} é a absorbância da mistura reacional com a amostra após 30 minutos. O ácido gálico foi utilizado como controle positivo. Para o cálculo do EC₅₀ foi plotado o gráfico da porcentagem de atividade antioxidante pela concentração de extrato em µg/mL e realizada a regressão linear onde foi obtido a equação da reta ($y = 23,771x - 11,835$ e $R^2 = 0,9852$) para o cálculo do EC₅₀. As análises foram realizadas em triplicada.

2.4.2 Potencial redutor de ferro (FRAP)

Para a determinação da capacidade antioxidante por meio do teste *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) foi utilizada a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), baseada na capacidade do composto antioxidante em reduzir o Fe (III) em Fe (II). No escuro o reagente FRAP foi preparado com 25 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6); 2,5 mL de TPTZ (10 mM) em solução de HCl (40 mM) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM). Foram misturados 90 µL das amostras diluídas em álcool etílico absoluto em diferentes concentrações, com 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Em seguida, foram agitados em vórtex e mantidos em banho-maria por 30 minutos a 37 °C. Depois de resfriadas, as amostras foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro UV-visível. Uma curva de calibração padrão foi construída utilizando-se Trolox e os resultados foram expressos em µM equivalente de Trolox (ET) por g de extrato seco. As análises foram realizadas em triplicada.

2.4.3 Atividade sequestradora de óxido nítrico (NO)

Para a avaliação da capacidade sequestradora de NO foi utilizada a metodologia descrita por Marcocci et al. (1994) com modificações. O NO foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato salino (PBS) e quantificado pela reação colorimétrica de Griess, onde ocorre a formação de um cromóforo róseo durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino (GREEN et al., 1982). Uma mistura reacional contendo 320 µL de solução dos extratos diluídos em diferentes concentrações, 360 µL NPS (25 mM/PBS, pH 7,4) e 215 µL de reagente de Griess foi adicionada em tubos de ensaio e incubada em banho-maria 37 °C por 2 horas, na ausência de luz. A absorbância do teste foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados obtidos foram colocados em uma equação da reta, obtida pela regressão linear de uma curva de calibração de nitrito de sódio, gerada sob as mesmas condições do teste e os resultados expressos em quantidade de nitrito formado (µM/mL). As análises foram realizadas em triplicada.

2.4.4 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC-FL)

O ensaio ORAC-FL foi realizado como previamente descrito por Dávalos et al. (2004), no qual radicais peroxil foram gerados pela decomposição do AAPH a 37 °C. A fluoresceína foi utilizada como sonda fluorescente, onde a perda da fluorescência indica dano a fluoresceína pela reação com radicais peroxil. Para o volume final de 200 µL, para cada amostra (trolox, amostras) foram adicionados 130 µL de fluoresceína 100 nM (concentração final de 65 nM),

20 µL da amostra/trolox (concentração final de 10 µM) e 50 µL de AAPH 80 mM (concentração final de 20 mM), utilizando microplacas para análise de fluorescência. As medidas foram realizadas no fluorímetro adaptado para microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, USA) em $\lambda_{\text{ex}} = 470 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$, 37 °C, em intervalos de 5 minutos por 2 h. A sensibilidade do equipamento foi ajustada para 100. Os cálculos foram realizados utilizando seguinte equação: $\text{ORAC} = (\text{área da curva da amostra} - \text{área da curva do controle}) \times (\text{mols de trolox}) / (\text{área da curva do trolox} - \text{área da curva do controle}) \times (\text{mols da amostra})$. Os resultados foram expressos em micromols de trolox/mg de extrato. A análise de fluorescência foi realizada sob a supervisão do professor Dr. Valdecir Farias Ximenes, no Laboratório de Eletroquímica, na Faculdade de Ciência e Letras da UNESP – Campus Bauru. As análises foram realizadas em triplicada.

2.4.5 Inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos

2.4.5.1 Obtenção de eritrócitos

Todos os procedimentos realizados neste protocolo de estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista - UNESP - Campus Assis/SP (Processo nº 833.386, aprovado em 16/09/2014). O sangue foi coletado em tubos com EDTA de um voluntário sadio por punção venosa. Logo após o mesmo foi centrifugado a 2500 rpm/ 5 minutos a temperatura ambiente, para obtenção da fração correspondente aos eritrócitos. Os eritrócitos foram lavados três vezes em solução tampão PBS (pH 7,2) por meio do processo de centrifugação (2500 rpm/ 5 minutos). Posteriormente foi preparada a diluição para a obtenção da suspensão de eritrócitos a 10% em tampão PBS.

2.4.5.2 Ensaio de hemólise oxidativa

Para o ensaio de hemólise oxidativa foi utilizado o método descrito por Yang et al. (2006) e Banerjee et al. (2008), com modificações. Uma suspensão de eritrócitos a 10% foi incubada com AAPH (50 mM) na presença ou ausência dos extratos em diferentes concentrações por 6 horas, em banho-maria a 37 °C. A cada 60 minutos alíquotas de 400 µL foram retiradas, transferidas para tubos eppendorf, centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, seguido de leitura espectrofotométrica do sobrenadante. A hemólise foi determinada pela leitura da absorbância de hemoglobina a 540 nm e calculada de acordo com a equação: $\text{Hemólise (\%)} = [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle negativo}}) / (A_{\text{controle positivo}} - A_{\text{controle negativo}})] \times 100$. Onde, A_{amostra} é a absorbância do teste na presença do extrato; $A_{\text{controle positivo}}$ é a absorbância do controle positivo (suspensão de eritrócitos 10% + AAPH 50 mM) e representa 100% de hemólise e $A_{\text{controle negativo}}$ é a

absorbância do controle negativo (suspensão de eritrócitos 10% + tampão PBS) e representa ausência de hemólise. Os resultados foram expressos em porcentagem de hemólise. As análises foram realizadas em triplicada.

2.5 Determinação da atividade antiglicante

2.5.1 Preparo da mistura reacional de glicação

Para a avaliação da atividade antiglicante foram preparadas misturas reacionais de glicação. Em tubos de ensaio com tampa, foram adicionados BSA (2 mg/mL) em tampão fosfato PBS (10 mM / pH 8,0) e Ribose (1M) na presença ou na ausência dos extratos (10 mg/mL) e controle cloridrato de aminoguanidina (40 Mm) e conservante azida de sódio 0,02%.

Para o teste de determinação de grupo amino livres uma alíquota da reação foi incubada em banho-maria 60 °C/30 minutos e após esse período, dialisadas no mesmo tampão por 24h e congeladas até análise. Para a análise de fluorescência de AGEs e mobilidade relativa em eletroforese, foram incubadas alíquotas em estufa 37 °C por 7 dias (MRE) e 15 dias (AGEs), sem diálise.

2.5.2 Determinação de grupos de aminos livres

Os grupos de aminos livres das amostras glicadas foram determinados pelo método de orto-ftaldialdeído (OPA) (LEDESMA-OSUNA et al., 2008). O reagente OPA foi preparado com 25 mL de borato de sódio 0,1 M; 2,5 mL de SDS a 20%; 100 µL de 2-mercaptoetanol; 40 mg de OPA (dissolvidos em 1 mL de metanol) e ajustado a um volume de 50 mL com água destilada. Uma alíquota de cada amostra, depois de aquecidas, e dialisadas por 24 horas contendo 50 µg de proteína foi misturada com 200 µL de reagente OPA, incubada durante 2 minutos em microplacas à temperatura 37 °C. Em seguida, mensurou-se a fluorescência das reações, sob a supervisão do professor Dr. Valdecir Farias Ximenes, no Laboratório de Eletroquímica, na Faculdade de Ciência e Letras da UNESP – Campus Bauru. As análises foram realizadas em triplicada.

2.5.3 Inibição da formação de AGEs por fluorescência

A mistura reacional foi incubada em estufa a 37 °C por 15 dias. A formação de AGEs foi determinada pela medida de suas características fluorescentes utilizando a excitação e emissão máxima de 360 e 460 nm, respectivamente, em espectrofluorímetro, sob a supervisão do professor Dr. Valdecir Farias Ximenes, no Laboratório de Eletroquímica, na Faculdade de

Ciência e Letras da UNESP – Campus Bauru. A leitura foi realizada em duplicata e os resultados expressos por porcentagem de inibição de formação de AGEs.

2.5.4 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)

Alíquotas de 15µL das reações de glicação foram analisadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (PAGE), corrente inicial de 30 mA e voltagem 80V e após sair do gel de empacotamento, com corrente 60 mA e voltagem 100V, por aproximadamente 3 horas. As amostras foram carregadas sem desnaturação e após a separação, as bandas de proteína foram visualizadas por coloração do gel com Coomassie-Blue (R-250). As alterações na posição e migração das bandas de BSA foram comparadas (WIJETUNGE e PERERA, 2014).

2.6 Microencapsulação de extrato de *P. venusta* (EBPvm)

2.6.1 Microencapsulação utilizando Maltodextrina

A metodologia utilizada na microencapsulação do extrato padronizado e enriquecido contendo o extrato de *P. venusta* foi realizada de acordo com a proposta por Sousdaleff et al. (2013) com adaptações laboratoriais. Foram preparadas soluções contendo 0,1 g de extrato dissolvido em 5 mL de etanol. Em seguida, foram pesadas as quantidades de 5, 10 e 20 g de maltodextrina DE20 (MDE20), dissolvida em 80 mL de água destilada a 60 °C. Após a dissolução completa da maltodextrina, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, sendo adicionada a solução contendo o extrato. A solução foi agitada separadamente em agitador mecânico por um período de 30 minutos a 2500 rpm. Após o período de agitação, a solução contendo as microcápsulas foi concentrada em rotaevaporador. Cada uma das soluções, obtidas com as respectivas proporções, de ambos os extratos, foi previamente congelada e submetida a processo de secagem em liofilizador. Após o período de secagem, obteve-se um pó seco e fino, por meio de moagem do liofilizado. Os pós de maltodextrina com as microcápsulas foram avaliados por meio dos testes de determinação de polifenóis e flavonoides totais e avaliação antioxidante da atividade sequestradora do radical livre DPPH e FRAP e as análises foram realizadas em triplicada.

2.6.2 Avaliação das microcápsulas

2.6.2.1 Ruptura e liberação

Para a liberação dos ativos das microcápsulas produzidas com MDE20, sua estrutura de revestimento foi completamente rompida de acordo com método proposto por Robert et al.

(2010), com adaptações. As microcápsulas foram dispersas em 1 mL de solução de etanol, ácido acético e água (50:8:42 v/v/v). Esta dispersão foi agitada utilizando-se o vórtex por 1 minuto e, em seguida, sonicada com frequência de 50Hz, duas vezes por 20 minutos, com intervalo de 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 G durante 5 minutos e, em seguida, filtrado em filtro Millipore (0,45 µm). As soluções resultantes da liberação das microcápsulas foram avaliadas por meio dos testes de determinação de polifenóis e avaliação antioxidante da atividade sequestradora do radical livre DPPH.

2.6.2.2 Eficiência de encapsulação

Foi considerada como eficiência de encapsulação a relação existente entre a quantidade de compostos fenólicos não encapsulados, presentes na superfície das micropartículas, e o total de compostos fenólicos microencapsulado (ROBERT et al., 2010). O experimento para determinar a eficiência da encapsulação foi dividido em duas partes, sendo a primeira a de extração dos compostos fenólicos que não foram microencapsulados, e a segunda, após a ruptura e liberação das micropartículas, para quantificação dos compostos fenólicos nelas contidos. A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando-se a seguinte equação: $\text{Eficiência de encapsulação (\%)} = (\text{FR} - \text{FE}) / \text{FN} \times 100$, onde FN (polifenóis totais após a ruptura) é a quantidade de compostos polifenólicos de uma quantidade conhecida de microcápsulas e FE (compostos polifenólicos da superfície) é a quantidade de compostos fenólicos contida na mesma quantidade de microcápsulas.

2.6.2.3 Caracterização morfológica de microcápsulas

A morfologia das microcápsulas obtidas por liofilização foi observada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) [Marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software operacional PC-SEM v. 2.1.0.3 equipado com detectores de elétrons secundários, retroespalhamento e análise química (espectroscopia de energia dispersiva - EDS) da Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software operacional NSS 2.3]. As microcápsulas foram fixadas em fita adesiva condutora de cobre e, a seguir, revestidas com ouro. As observações foram feitas usando SEM a tensão de aceleração de 10 kV (ROSENBERG et al., 1985; DEWI et al., 2016).

2.7 Análise citotóxica por método de MTT

Amostra do EBPvm foi acondicionada em eppendorfs com 20 mg, sendo armazenado em solução estoque de 20 mg/mL em PBS e a partir dessa, foram realizadas diluições seriadas para que fossem obtidas as seguintes concentrações finais do extrato: 1 mg/mL extrato; 0,5

mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL; 0,03125 mg/mL; 0,015625 mg/mL. No primeiro dia as células foram semeadas com a linha celular humana HFF1 (fibroblastos), aproximadamente $0,5 \times 10^4$ células / poço em 200 μ L de meio / poço (3 ensaios) e 1×10^4 células / poço em 200 μ L de meio / poço. O meio utilizado foi DMEM 15% FBS + 1% L-Glutamina contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). No quarto dia, foi realizado o tratamento, onde as células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^4$) e mantidas em cultivo por 72 horas até atingir a confluência adequada, após o qual foram tratadas. O ensaio que apresentou densidade celular de 1×10^4 recebeu o tratamento após 48 horas. No sexto dia, no fluxo laminar, foram adicionados 20 μ L da solução de MTT (5 mg/mL) e deixados por 4 horas na estufa ao abrigo da luz. Após 4 horas, todo o conteúdo foi removido de cada poço, 200 μ L de DMSO foram adicionados e o leitor Tecan Sunrise foi lido em um comprimento de onda de 492 nm. Os valores foram gerados pelo programa Magellan e analisados pelo programa Prism. A análise foi realizada com os valores subtraídos do branco (sem extrato e sem célula) e do branco-extrato (com extrato e sem célula). Esta análise foi realizada em colaboração com o professor Dr. Luis Eduardo M. Quintas, no Laboratory of Biochemical and Molecular Pharmacology, no Institute of Biomedical Sciences da Universidade Federal do Rio de Janeiro

2.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey como post hoc teste. O nível de significância foi estabelecido para $p < 0,05$ (Software BioEstat 5.3).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de polifenóis e flavonoides totais

Para avaliação da composição fitoquímica do extrato de *P. venusta* foram determinados os compostos polifenólicos e flavonoides totais, na concentração de 10 mg/mL dos extratos preparados por maceração e percolação (Tabela 1). O extrato obtido por maceração apresentou maior presença de compostos polifenólicos e flavonoides totais. Na análise de polifenóis foram identificados nos EBPvm e EBPvp a presença de 1060,4 μ g/mL e 481,9 μ g/mL equivalente a ácido gálico por grama de extrato seco, respectivamente e, para flavonoides totais foram de 1063,00 μ g/mL e 975,2 μ g/mL equivalente a rutina por grama de extrato seco, respectivamente.

Tabela 1. Avaliação de compostos polifenólicos e flavonoides totais dos extratos brutos hidroetanólicos (EBPvm e EBPvp) de flores de *P. venusta*.

Extrato	Concentração (mg/mL)	Polifenóis totais ¹	Flavonoides totais ²
EBPvm	10	1060,4 ± 24,4	1063,0 ± 7,7
EBPvp		481,9 ± 14,7	975,2 ± 18,5

EBPvm= Extrato bruto de *P. venusta* por maceração, EBPvp= Extrato bruto de *P. venusta* por percolação. ¹µg equivalente ácido gálico/g de extrato. ²µg equivalente rutina/g de extrato.

Os resultados obtidos nos testes de determinação de polifenóis e flavonoides totais observados para os diferentes extratos das flores de *P. venusta* são semelhantes aos encontrados por Figueiredo et al. (2014) e Moreira et al. (2015), onde ficou evidenciado presença de flavonoides nos extratos obtidos de flores desta espécie.

3.2 Análise qualitativa por Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDc)

No cromatograma em CCDc revelado com o reagente NP/PEG submetido à luz ultravioleta, foram aplicadas e eluídas as amostras dos extratos brutos hidroetanólicos, obtidos por maceração (EBPvm = P1) e percolação e (EBPvp = P2) de flores de *P. venusta*, e os padrões: ácido gálico, quercetina e rutina. A análise em CCDc resultou em um perfil bandas definidas, no entanto diferindo dos padrões em cor (Figura 1). Os valores de Rfs obtidos nos padrões ácido gálico e quercetina foram de 0,24 e 0,67 cm respectivamente e, para o padrão rutina o Rf foi de 0,13. É possível observar em ambos extratos de *P. venusta* os Rfs se aproximam de 0,24 cm, valores estes iguais ao encontrado no padrão ácido gálico.

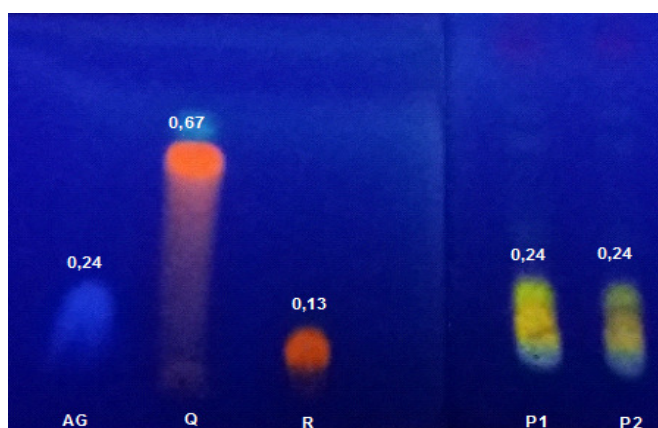


Figura 1. Cromatograma dos padrões Ácido Gálico (AG), Quercetina (Q), Rutina (R), extratos brutos hidroetanólicos de flores de *P. venusta* (EBPvm = P1; EBPvp = P2), com sistema eluente clorofórmio-metanol-água (75:23:2) e revelador NP/PEG, para identificação de compostos flavonoídicos. Identificação das zonas cromatográficas com seus respectivos valores de Rf (cm).

Pesquisas realizada por Moreira et al. (2015) demonstraram a presença de compostos fenólicos na espécie *P. venusta*. Nos diferentes extratos avaliados neste estudo verifica-se similaridade entre o Rf do padrão ácido gálico (0,24) com os extratos brutos de *P. venusta*, porém as colorações diferem entre si e, de acordo com Wagner e Bladt (2001) a coloração amarela sugere glicosídeos de flavonóis.

3.3 Análise fitoquímica por HPLC-PDA

A análise do cromatograma HPLC-PDA de EBPvm (Figura 2) mostrou dois picos principais em 4,11 min e 31,37 min. Com base nos valores m/z, espectros de UV e comparação com a literatura (ROY et al., 2011), foi identificado que o pico 2 é correspondente ao ácido quínico e o pico 3 ao diglicosídeo flavonoide. Além disso, o pico 1 é um derivado de mio-inositol (3) (Tabela 2).

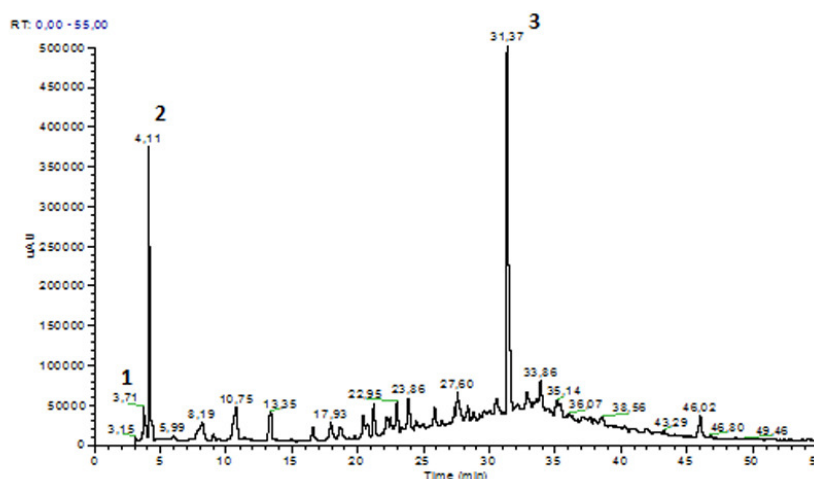


Figura 2. Cromatograma analítico de HPLC-PDA a 254 nm de EBPvm.

Tabela 2. Identificação e sugestão de compostos de EBPvm por dados de LC-PDA, LC-MS e MS/MS.

Pico	Rt(min)	UV ($\lambda_{\text{máx.}}$)	[M-H] ⁻	MS/MS ions	Compostos sugeridos
1	3.71	257	179	225, 195	derivado de mio-inositol
2	4.11	269	191	173, 127, 85	ácido quínico
3	31.37	331, 249	623	461	flavonoide diglicosídeo

A análise fitoquímica por HPLC-PAD do EBPvm, nas condições cromatográficas realizadas, indicou a provável presença de ácido quínico, um flavonoide diglicosídeo e mio-inositol. Da mesma forma, Roy et al. (2011) identificaram essas mesmas classes de compostos

em extratos de flores e raízes de *P. venusta*, e também confirmaram o potencial antioxidante desses compostos.

3.4 Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1 Avaliação da atividade antioxidante pelos testes de DPPH, FRAP e NO

As avaliações da atividade antioxidante dos EBPvm (Tabela 3) e EBPvp (Tabela 4) foram realizadas pelos testes de DPPH, FRAP e NO. Na análise pelo método de sequestro do radical DPPH[•] o EBPvm na concentração de 1000 µg/mL apresentou a maior atividade antioxidante, com valor de 82,5%. Semelhantemente o EBPvp também apresentou maior atividade para a concentração de 1000 µg/mL (72,6%). Os valores de ambos os extratos na concentração de 1000 µg/mL não diferiram significativamente em comparação ao controle positivo (ácido gálico= 87,0%) e apresentaram um perfil concentração dependente. Os valores de EC₅₀ obtidos foram de 2,6 para EBPvm e de 3,49 para EBPvp.

Na análise do potencial redutor de ferro pelo método FRAP, o EBPvm apresentou o melhor resultado na concentração de 1000 µg/mL com 1244,0 µM ET/g de extrato seco, sendo que o EBPvp na mesma concentração apresentou 966,3 µM ET/g de extrato seco. Para o método do sequestro do óxido nítrico (NO) a concentração de 100 µg/mL apresentou os melhores resultados, com 5,8 e 5,5 µM/mL de nitrito, para EBPvm e EBPvp, respectivamente.

Tabela 3. Atividade antioxidante do EBPvm e controle positivo Ácido Gálico e Trolox, por meio dos testes de DPPH, FRAP e NO

Extrato	Concentração (µg/mL)	DPPH ¹	FRAP ²	NO ³
EBPvm	100	9,0 ± 1,6a	107,1 ± 3,1a	5,8 ± 0,4a
	250	37,9 ± 2,8b	338,7 ± 11,9b	7,1 ± 0,5b
	500	63,5 ± 3,3c	688,4 ± 7,0c	12,2 ± 1,1c
	750	79,7 ± 1,4d	909,3 ± 10,6d	-
	1000	82,5 ± 0,2d	1244,0 ± 38,3e	18,0 ± 0,9c
Ácido gálico	100	87,0 ± 0,2d	-	-
Trolox	1000	-	-	8,0 ± 0,0b

EBPvm= Extrato bruto de *P. venusta* por maceração. ¹%Atividade Antioxidante, ²µM equivalente trolox/g de extrato, ³nitrito (µM/mL). Teste Tukey (valores expressos como média ±desvio padrão). Letras diferentes (p<0,05).

Tabela 4. Atividade antioxidante do EBPvp e controle positivo Ácido Gálico e Trolox, por meio dos testes de DPPH, FRAP e NO

Extrato	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH ¹	FRAP ²	NO ³
EBPvp	100	$6,7 \pm 1,3a$	$94,8 \pm 1,7a$	$5,5 \pm 0,2a$
	250	$31,9 \pm 1,0b$	$198,2 \pm 8,0b$	$7,7 \pm 0,3b$
	500	$33,3 \pm 3,8b$	$491,8 \pm 11,1c$	$12,0 \pm 0,1c$
	750	$57,3 \pm 2,3c$	$717,2 \pm 9,5d$	-
	1000	$72,6 \pm 1,7d$	$966,3 \pm 26,1e$	$20,3 \pm 0,5d$
Ácido gálico	100	$87,0 \pm 0,2d$	-	
Trolox	1000	-	-	$8,0 \pm 0,0b$

EBPvp= Extrato bruto de *P. venusta* por percolação. ¹%Atividade Antioxidante, ² μM equivalente trolox/g de extrato, ³nitrito ($\mu\text{M/mL}$). Teste Tukey (valores expressos como média $\pm$ desvio padrão). Letras diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados da atividade antioxidante obtidas neste estudo estão de acordo com aqueles observados por Pereira et al. (2014), os quais demonstraram que o extrato bruto de *P. venusta* provou ser um agente antioxidante promissor, pois foi capaz de reduzir DPPH tão efetivamente quanto a rutina, utilizada como controle positivo no ensaio. Quanto aos resultados de EC_{50} , um extrato que apresenta alto potencial em sequestrar radicais livres, possui baixo valor de EC_{50} , ou seja, inibe a oxidação do radical em 50%, conforme Roesler et al. (2007) e, neste estudo, foi possível comprovar por meio dessa análise os potenciais antioxidantes dos extratos.

A atividade antioxidante avaliada pelo teste FRAP demonstrou maior potencial redutor dos extratos na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados encontrados com *P. venusta* são semelhantes aos observados por Roy et al. (2012), onde foi verificado que extratos metanólicos de *P. venusta* apresentaram atividade antioxidante *in vitro* pelo potencial redutor de ferro (FRAP).

Os resultados obtidos pelo teste de sequestro de óxido nítrico (NO) demonstraram que os extratos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram capacidade de inibir a formação de nitrito. De acordo com Dalgê (2014) existem poucos dados na literatura que avaliam a inibição de NO por extratos vegetais e, o autor afirma ainda que essa inibição não é dose-dependente, assim como pode ser observado nos resultados do presente estudo.

3.4.2 Seleção do extrato de flores de *P. venusta* com maior atividade antioxidante

Após os testes antioxidantes o EBPvm foi selecionado para a avaliação do potencial antioxidante pelo método de ORAC-FL e hemólise oxidativa, atividade antiglicante, desenvolvimento do método de microencapsulação do extrato por maltodextrina e fracionamento direcionado para obtenção de fração flavonoídica

3.4.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de ORAC-FL

A capacidade de absorção do radical oxigênio gerado pela decomposição do AAPH a 37 °C pode ser comparado entre o padrão Trolox e o EBPvm, em duas diferentes concentrações. A Figura 3 apresenta a curva de decaimento da perda da fluorescência, que apresenta o dano causado à fluoresceína pela reação com radicais peroxil, comprovando o potencial antioxidante desse extrato, pois comparado ao controle Trolox, a intensidade de fluorescência permaneceu por mais tempo, na concentração de 100 µg/mL.

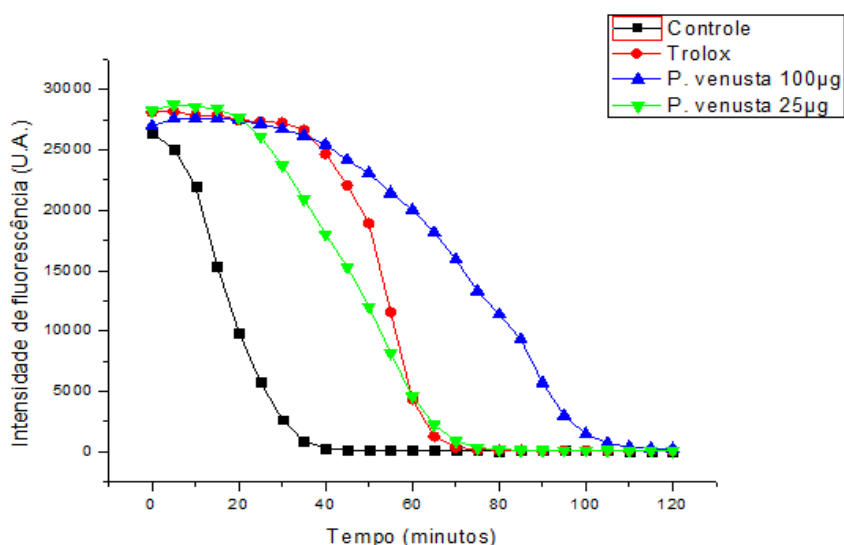


Figura 3. Curva cinética do ensaio ORAC-FL na presença de EBPvm.

A atividade antioxidante do extrato de flores de *P. venusta* pelo método ORAC foi relatado pela primeira vez no presente estudo, não podendo ser comparado com a literatura atual. Gonçalves (2008) demonstrou que existe uma correlação positiva entre a capacidade antioxidante pelo método ORAC com a constituição de compostos fenólicos dos extratos vegetais. Assim como foi comprovada a presença destes compostos no presente estudo.

3.4.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição de hemólise oxidativa em eritrócitos humanos

Na Figura 4 é possível verificar os resultados da atividade anti-hemolítica do extrato de *P. venusta* em diferentes concentrações. O EBPvm apresentou capacidade antioxidante ao inibir a hemólise induzida pelo AAPH e apresentou comportamento concentração dependente.

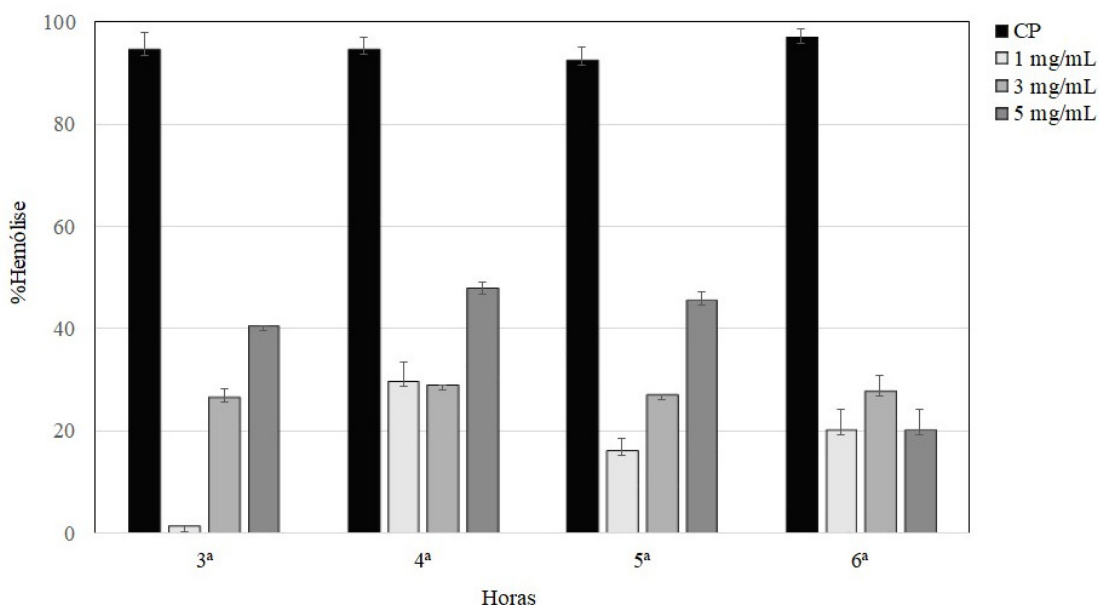


Figura 4. Atividade antioxidante pelo método de inibição de hemólise do EBPvm durante 6 horas de incubação e mensurada a 540 nm em espectrofotômetro. Resultados expressos em média de porcentagem de hemólise.

A capacidade anti-hemolítica apresentada para EBPvm é corroborada por Erlejman et al. (2004), seja pela estrutura quanto pela atividade desempenhada pelos flavonoides, onde a atividade antioxidante está diretamente relacionada ao número e localização de hidroxilas presentes em sua cadeia principal, o que confere maior atividade antioxidante. Kitagawa et al. (2004) comprovaram que o flavonoide quercetina e seus glicosídeos foram capazes de retardar a hemólise com efeito dose-dependente, em eritrócitos bovinos na presença de AAPH. No entanto está metodologia de avaliação da atividade antioxidante por via anti-hemolítica, promovida por extrato ou compostos ativos de *P. venusta*, não apresenta dados na literatura científica para fim de comparação.

3.5 Avaliação da atividade antiglicante

3.5.1 Determinação de grupos de aminos livres e inibição da formação de AGEs por fluorescência

Para a determinação de grupos amino livres, o BSA foi associado à ribose e tratado com aminoguanidina ou EBPvm. O BSA tratado com EBPvm em solução na concentração de 10 mg/mL apresentou 68,45% de grupos amino livres. Este valor foi superior ao BSA tratado com aminoguanidina, que resultou em 22,57% de grupos amino livres.

Na determinação da inibição da formação de AGEs, o tratamento de BSA com EBPvm na concentração de 10 mg/mL resultou 77,00% de inibição da formação de AGEs, porém este valor não diferiu significativamente quando comparado ao tratamento com aminoguanidina que apresentou 77,80% de inibição da formação de AGEs.

3.5.2 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)

Na Figura 5 estão apresentados os perfis eletroforéticos do BSA glicado com Ribose e tratado com EBPvm ou o antiglicante da aminoguanidina. É possível observar que o EBPvm apresentou atividade antiglicante mantendo perfil eletroforético semelhante ao BSA padrão e em comparação com o perfil do BSA glicado com ribose, onde é nítida a degradação da proteína.

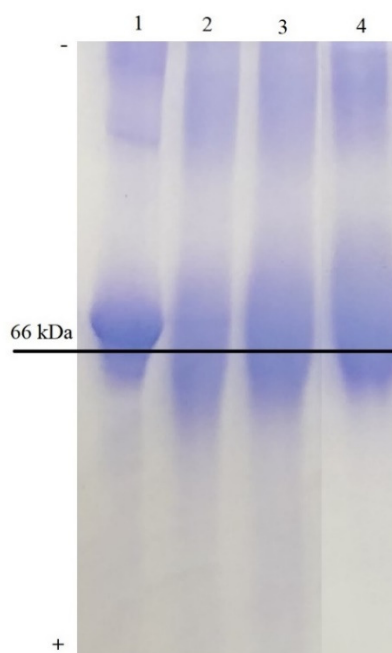


Figura 5. Teste de mobilidade relativa em eletroforese para avaliação da capacidade antiglicante. 1= BSA, 2= BSA+Ribose, 3= BSA+Ribose+Aminoguanidina, 4= BSA+Ribose+EBPvm. Onde BSA=Albumina sérica bovina.

Os resultados evidenciam que a glicação foi inibida pelo tratamento com o extrato, por meio dos métodos de determinação de grupos de amins livres, inibição da formação de AGEs e MRE. Os efeitos de plantas medicinais sobre a formação de AGEs *in vitro* têm inibido sua formação e o processo de glicação avançada, conforme estudo realizado por Harris et al. (2011).

A atividade antioxidante está relacionada a capacidade antiglicante de compostos naturais, capazes de inibir a formação de AGEs, mecanismo que se deve a proteção exercida pelos antioxidantes aos radicais livres derivados da glicação, enquanto os quelantes evitam a auto-oxidação da glicose e dos produtos de Amadori, removendo os metais de transição (NAKAGAWA et al., 2002). Compostos que apresentam capacidade antioxidante e antiglicante, além de prevenirem a formação de AGEs, ainda são capazes de reduzir a toxicidade promovida pelos radicais livres no organismo, como afirmam Ahmad e Ahmed (2006).

3.6 Avaliação da microencapsulação do extrato de *P. venusta*

3.6.1 Determinação de polifenóis e avaliação da atividade antioxidante por DPPH

Na Tabela 5 estão expressos os resultados do teor de compostos polifenólicos do EBPvm encapsulados antes e após a liberação das microcápsulas. Foi possível constatar que os extratos encapsulados demonstraram baixa ou ausência de compostos polifenólicos no produto da encapsulação, enquanto após processo de liberação as microcápsulas, a solução apresentou considerável aumento da concentração de polifenóis, o que revela a eficácia do método de encapsulação, com destaque para a encapsulação realizada com os EBPvm em 5,0 gramas de maltodextrina. Os resultados do presente estudo corroboram com Pang et al. (2014), que demonstraram que os compostos fenólicos do extrato de *Orthosiphon stamineus* foram preservados com a microencapsulação em maltodextrina, utilizando a técnica de *spray dryer*. GUO et al. (2020) em estudo comparativo dos métodos de microencapsulação por *spray drying* e liofilização, constataram a eficiência do método de microencapsulação de curcumina por liofilização, no qual o composto manteve estabilidade.

Na Tabela 6 estão demonstrados os resultados do potencial de atividade antioxidante pelo teste de DPPH, do EBPvm encapsulado e após sua liberação. É possível constatar que a atividade antioxidante do extrato após a liberação dos compostos foi maior comparado a antes liberação. A concentração 5 gramas de maltodextrina apresentou a maior atividade antioxidante, com valor de 90,5%. É possível observar que a atividade antioxidante das microcápsulas foi menor com o aumento na concentração de maltodextrina, corroborando com Mishra et al. (2014).

Tabela 5. Avaliação da encapsulação do EBPvm, obtida por meio da dosagem dos compostos polifenólicos totais encapsulado e após a liberação das microcápsulas, em diferentes diluições de maltodextrina

EBPvm (200 µg/mL) + MDE20 (g)	Polifenóis totais ¹	
	Encapsulado	Liberado
0,1 + 5	8,7 ± 1,52	366,3 ± 9,0
0,1 + 10	0 ± 0	145,9 ± 9,4
0,1 + 20	0 ± 0	87,81 ± 0,6
0 + 10	-	0

EBPvm= Extrato bruto de *P. venusta* por maceração. ¹µg equivalente rutina.

Tabela 6. Determinação da atividade antioxidante por meio do sequestro do radical livre DPPH do EBPvm encapsulado e após a liberação das microcápsulas

EBPvm (200 µg/mL) + MDE20 (g)	DPPH ¹	
	Encapsulado	Liberado
0,1 + 5,0	2,6 ± 1,0	90,5 ± 0,2
0,1 + 10,0	1,5 ± 0,2	89,5 ± 0,2
0,1 + 20,0	0,1 ± 0,1	66,7 ± 1,8
0 + 10,0	-	0
Ácido gálico* (100 µg/mL)	87,0±0,2	

EBPvm= Extrato bruto de *P. venusta* por maceração. ¹%Atividade antioxidante. Valores apresentados como média±desvio padrão. *Padrão utilizado como referência no teste do DPPH.

3.6.2 Avaliação da eficiência de encapsulação

Na Tabela 7 estão apresentados os valores da eficiência de encapsulação do EBPvm. A maior eficiência observada foi de 90,82 para a preparação de microcápsulas como 0,1 gramas de EBPvm e 5 gramas de maltodextrina. Resultados semelhantes foram obtidos por Sousdaleff et al. (2013) que relataram a eficiência e a estabilidade de microcápsulas de maltodextrina contendo diferentes produtos de origem vegetal (terpenos, flavonóides e taninos).

Tabela 7. Eficiência de encapsulação do EBPvm por determinação de polifenóis totais

Extrato	(g) + MD20 (g)	Fenois totais			ME %
		FN	FE	FR	
EBPvm	0,1 + 5		25,22 ± 15,2	366,33 ± 9,0	90,82
	0,1 + 10	375,59 ± 10,08	-	145,67 ± 9,4	38,78
	0,1 + 20		-	39,22 ± 0,6	10,44
MD20	0,0 + 10	-	-	-	-

MD20 = maltodextrina DE20; FN = compostos fenólicos não encapsulados antes da liofilização; FE = compostos fenólicos encapsulados em microcápsulas após liofilização; FR = compostos fenólicos após liberação; ME = eficiência de microencapsulação.

3.6.3 Análise morfológica das microcápsulas

A Figura 6 corresponde a imagem da micropartícula obtida após encapsulação do EBPvm com maltodextrina, obtida em microscopia de varredura utilizando espectros de absorção óptica e frequência de modulação da luz fixada em 25Hz.

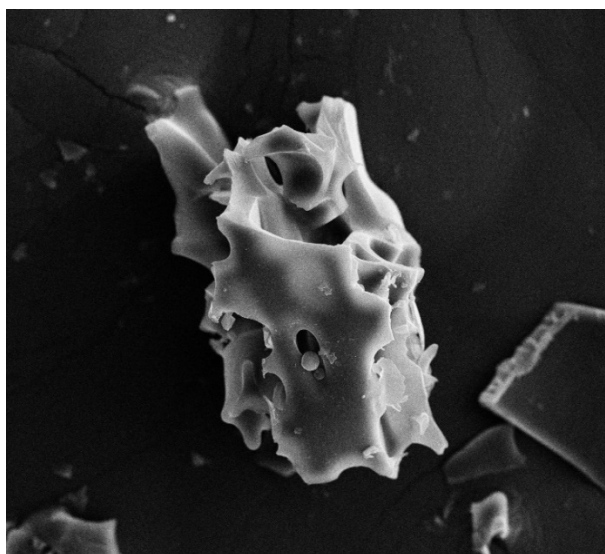


Figura 6. Micrografia eletrônica de microcápsulas de maltodextrina DE20 contendo EBPvm (aumento de 1000x).

As microcápsulas observadas em microscopia eletrônica de varredura apresentaram formato esférico, depressões irregulares, superfície dentada, sem trincas ou rupturas. Estas são características fundamentais para garantir uma maior proteção e retenção do extrato encapsulado. Não foi observada uniformidade e os tamanhos variaram de 10 µm a 100 µm,

características também identificadas por Siemons et al. (2020), que observaram microcápsulas formadas por maltodextrina contendo compostos naturais.

3.7 Análise citotóxica por método de MTT

A análise citotóxica evidenciou que o EBPvm induziu alteração significativa da viabilidade em células HFF1 nas concentrações analisadas. O extrato das flores de *Pyrostegia venusta* reduziu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 1 e 0,5 mg/mL, enquanto que concentrações menores foram inócuas (Figura 7).

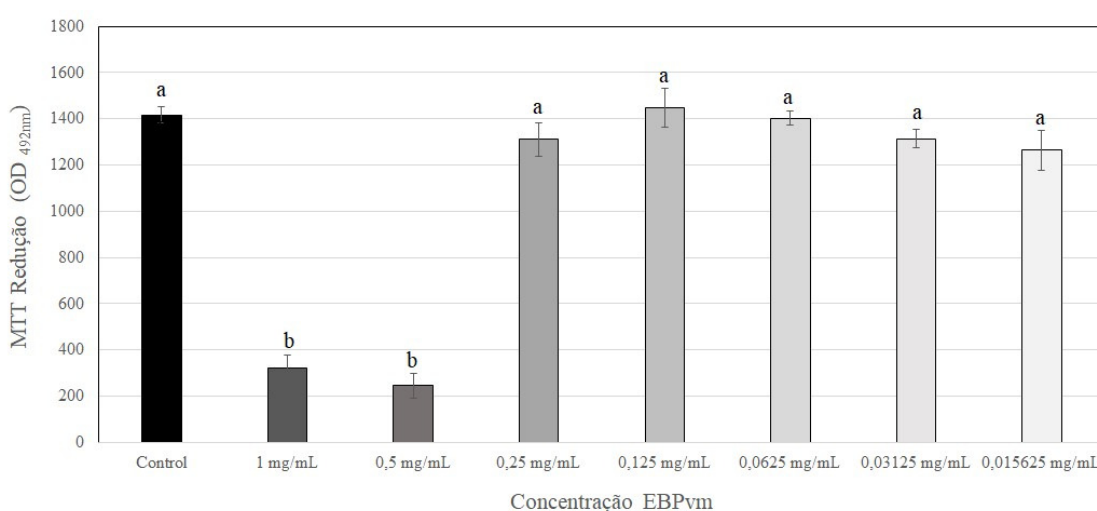


Figura 7. Atividade citotóxica do extrato bruto de EBPvm em diferentes concentrações (1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0624; 0,03125 e 0,015625 mg mL⁻¹). Cada barra representa a redução de MTT (OD 492 nm). Resultados com letras iguais não diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$).

O EBPvm apresentou redução da viabilidade celular em fibroblastos HFF1, corroborando Figueiredo et al. (2014), no qual o extrato de flores de *P. venusta* apresentou efeito citotóxico em células de melanoma murino, promovendo apoptose de células tumorais. A atividade do extrato das flores de *P. venusta* foi também analisada por Daneluzzi et al. (2014), quanto ao potencial fitotóxico e citotóxico em sementes e plântulas de alface, e que constataram que o extrato promoveu interferência nos índices de germinação, no crescimento radicular e no índice mitótico de células de raízes de alface.

3.8 Determinação de polifenóis e flavonoides totais e da atividade antioxidante por DPPH e FRAP, da fração flavonoídica

A determinação dos polifenóis, flavonoides totais e da atividade antioxidante pelos testes de DPPH e FRAP, estão apresentados na Tabela 8. A fração flavonoídica na maior

concentração (7,5 mg/mL), apresentou maior presença de polifenóis e flavonoides totais. Já no teste de DPPH a concentração de 2,5 mg/mL apresentou a maior atividade antioxidante, com valor de 96,9%, sendo que os valores não diferiram significativamente entre si e em comparação ao controle positivo ácido gálico (87,0%). Na análise do potencial redutor de ferro pelo método FRAP, a maior concentração (7,5 mg/mL) apresentou o melhor resultado 717,0 μ M ET/g de extrato seco, no entanto os valores observados nas diferentes concentrações não diferiram estatisticamente entre si.

Tabela 8. Determinação de compostos polifenólicos e flavonoides totais e atividade antioxidante da FrPvm por meio dos testes de DPPH e FRAP

Extrato	Concentração (mg/mL)	Polifenóis totais ¹	Flavonoides totais ²	DPPH ³	FRAP ⁴
FrPvm	2,5	491,1 $\pm$ 13,9a	250,2 $\pm$ 3,0a	96,9 $\pm$ 1,77a	710,9 $\pm$ 2,3a
	5,0	953,3 $\pm$ 1,7b	494,2 $\pm$ 1,0b	94,5 $\pm$ 4,0a	716,4 $\pm$ 5,4a
	7,5	1133,0 $\pm$ 2,2c	713,2 $\pm$ 2,0c	92,9 $\pm$ 0,6a	717,0 $\pm$ 7,2a
Ácido gálico	0,1	-	-	87,0 $\pm$ 0,2a	-

FrPvm= Fração flavonoídica de flores de *P. venusta* do EBPvm. ¹ μ g equivalente ácido gálico/g de extrato. ² μ g equivalente rutina/g de extrato. ³%Atividade Antioxidante. ⁴ μ M equivalente trolox/g de extrato.

4 CONCLUSÃO

O extrato das flores de *P. venusta* apresenta importante atividade biológica, com potencial antioxidante, antiglicante e citotóxico, os quais podem ser atribuídas à presença dos flavonoides identificados nesta espécie. A metodologia de microencapsulação do extrato utilizando maltodextrina como material encapsulador foi efetiva para encapsular e liberar o extrato de flores de *P. venusta*. No entanto, novos estudos serão necessários para elucidar os compostos ativos específicos e os responsáveis por diferentes atividades e sua possível aplicação farmacêutica, cosmética e/ou alimentícia.

Declaração de interesse conflitante

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimento

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, M. S.; AHMED, N. Antglycation Properties of Aged Garlic Extract: Possible Role in Prevention of Diabetic Complications. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 3, p. 796S-799S, 2006. DOI: 10.1093/jn/136.3.796S
- BANERJEE, A.; KUNWAR, A.; MISHRA, B.; PRIYADARSINI, K. I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin: Studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, n. 2, p. 134-39, 2008. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.05.009
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.
- CARDOSO, D. B. O. S.; FRANÇA, F.; NOVAIS, J. S.; FERREIRA, M. H. S.; SANTOS, R. M.; CARNEIRO, V. M. S.; GONÇALVES, J. M. Floristic composition and phytogeographical analysis of a semideciduous forest in Bahia State, Brazil. **Rodriguésia**, v. 60, n. 4, p. 1055-1076, 2009. DOI: 10.1590/2175-7860200960416
- CHANG, S. K.; ALASALVAR, C.; SHAHIDI, F. Review of dried fruits: Phytochemicals, antioxidant efficacies, and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 21, 113-132, 2016. DOI: 10.1016/j.jff.2015.11.034
- CHRIST, B.; MUELLER, K. H. On the serial determination of the content of flavonol derivatives in drugs. **Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft**, v. 293, n. 65, p. 1033-1042, 1960. DOI: 10.1002/ardp.19602931202
- COSTA, G. M.; ORTMANN, C. F.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096-1102, 2011. DOI: 10.1590/S0103-50532011000600014
- CUI, T.; CHEN, C.; JIA, A.; LI, D.; SHI, Y.; ZHANG, M.; BAI, X.; LIU, X.; LIU, C. Characterization and human microfold cell assay of fish oil microcapsules: Effect of spray drying and freeze-drying using konjac glucomannan (KGM)-soybean protein isolate (SPI) as wall materials. **Journal of Functional Foods**, v. 83, p. 104542, 2021. DOI: 10.1016/j.jff.2021.104542.

DALGÊ, J. J. **Estudo da capacidade antioxidante, antimicrobiana e anti-hemolítica do gengibre (*Zingiber officinale*)**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

DANELUZZI, G. S.; SANTOS, V. H. M.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. G. Evaluation of phytotoxic and cytotoxic potential of *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (*Bignoniaceae*). **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, p. 1231-1240, 2014.

DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVES, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004. DOI: 10.1021/jf0305231

DEWI, E. N.; PURNAMAYATI, L.; KURNIASIH, R. A. Antioxidant activities of phycocyanin microcapsules using maltodextrin and carrageenan as coating materials. **Jurnal Teknologi**, v. 78, n. 4-2, 45-50, 2016. DOI: 10.11113/jt.v78.8151

ERLEJMAN, A. G.; VERSTRAETEN, S. V.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. **Free Radical Research**, v. 38, n. 12, p. 1311-1320, 2004. DOI: 10.1080/10715760400016105

FERREIRA, N. S. O.; ROSSETA, M.; LIMA, G.; CAMPELO, P. M. S.; MACEDO, R. E. F. Effect of adding *Brosimum gaudichaudii* and *Pyrostegia venusta* hydroalcoholic extracts on the oxidative stability of beef burgers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 145-152, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.041

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; PEREIRA, F. V.; RABAÇA, A. N.; FARIAS, C. F.; GIROLA, N.; MASSAOKA, M. H.; AZEVEDO, R. A.; SCUTTI, J. A. B.; ARRUDA, D. C.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, E. G.; LAGO, J. H. G.; TRAVASSOS, L. R.; SILVA, R. M. G. *Pyrostegia venusta* heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 10, n. 38, p. S363-S376, 2014. DOI: 10.4103/0973-296.133284

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C**. 2008. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Universidade de São Paulo, 2008.

GUO, J.; LI, P.; KONG, L.; XU, B. Microencapsulation of curcumin by spray drying and freeze drying. **LWT**, v. 132, p. 109892, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109892

HARRIS, C. S.; BEAULIEU, L. P.; FRASER, M. H.; MCINTYRE, K. L.; OWEN, P. L.; MARTINEAU, L. C.; CUERRIER, A.; JOHNS, T.; HADDAD, P. S.; BENNETT, S. A.; ARNASON, J. T. Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. **Planta Medica**, v. 77, n. 2, p. 196-204, 2011. DOI: 10.1055/s-0030-1250161

KALUDERCIC, N.; DI LISA, F. Mitochondrial ROS formation in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 18, n. 7, p. 12, 2020. DOI: 10.3389/fcvm.2020.00012

KITAGAWA, S.; SAKAMOTO, H.; TANO, H. Inhibitory effects of flavonoids on free radical-induced hemolysis and their oxidative effects on hemoglobin. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 8, p. 999-1001, 2004. DOI: 10.1248/cpb.52.999

LEDESMA-OSUNA, A. I., RAMOS-CLAMONT, G., VÁZQUEZ-MORENO, L. Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. **Acta Biochimica Polonica**, v. 55, n. 3, p. 491-497, 2008. DOI: 10.18388/abp.2008_3054

MAR, M. J.; SILVA, L. S.; RABELO, M. S.; MUNIZ, M. P.; NUNOMURA, S. M.; CORREA, R. F.; KINUPP, V. F.; CAMPELO, P. H.; BEZERRA, J. A.; SANCHES, E. A. Encapsulation of Amazonian Blueberry juices: Evaluation of bioactive compounds and stability. **LWT**, v. 124, p. 109152, 2020. Doi: 10.1016/j.lwt.2020.109152

MARCOCCI, L.; MAGUIER, J. J.; DROYLEFAIX, M. T.; PACKER, L. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 2, p. 748-755, 1994. DOI: 10.1006/bbrc.1994.1764

MISHRA, P.; MISHRA, S.; MAHANTA, C. L. Effect of maltodextrin concentration and inlet temperature during spray drying on physicochemical and antioxidant properties of amla (*Embllica officinalis*) juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, p. 252-258, 2014. DOI: 10.1016/j.fbp.2013.08.003

MOREIRA, C. G.; CARRENHO, L. Z. B.; PAWLOSKI, P. L.; SOLEY, B. S.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 315-325, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.080

NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T.; TERASAWA, K.; SHU, S.; JUNEJA, L. R. Protective activity of green tea against free radical- and glucose-mediated protein damage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2418-2422, 2002. DOI: 10.1021/jf011339n

NIKMARAM, N.; ROOHINEJAD, S.; HASHEMI, S.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; ABBASPOURRAD, A.; GREINER, R. Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, n. 46, p. 28951-28964, 2017. DOI: 10.1039/C7RA00179G

PEREIRA, A. M.; HERNANDES, C.; PEREIRA, S. I. V.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; TALEB-CONTINI, S. H. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 136-141, 2014. DOI: 10.1016/j.cbi.2014.10.023

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*punica granatum*) by spray drying. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 7, p. 1386-1394, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x

ROESLER, L. G.; MALTA, L. C.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S., PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007. DOI: 10.1590/S0101-20612007000100010

ROSA, C. G.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; NUNES, M. R.; BENVENUTTI, E. V.; LUZ, S. R.; D'AVILA, R. F.; J. Microencapsulation of gallic acid in chitosan, b-cyclodextrin and xanthan. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 138e146, 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2012.12.053

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I. J.; TALMON, Y. A scanning electron microscopy study of microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 139-144, 1985. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1985.tb13295.x

ROSSATTO, D. R.; KOLB, R. M. Germinação de *Pyrostegia venusta* (Bignoniaceae), viabilidade de sementes e desenvolvimento pós-seminal. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 1, p. 51-60, 2010. DOI: 10.1590/S0100-84042010000100006

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, V. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 69-77, 2011. DOI: 10.1186/1472-6882-11-69

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012. DOI: 10.1016/j.jep.2012.01.008

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820-897, 2015. DOI: 10.1016/j.jff.2015.06.018

SIEMONS, I.; POLITIEK, R. G. A.; BOOM, R. M.; VAN DER SMAN, R. G. M.; SCHUTYSER, M. A. I. Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. **Food Research International**, v. 131, p. 108988, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.108988

SINGLETON, V.; ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolic Compounds with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUSDALEFF, M.; BAESSO, M. L.; MEDINA NETO, A.; NOGUEIRA, A. C.; MARCOLINO, V. A.; MATIOLI, D. Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: Stability, solubility and food application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 4, 655-965, 2013. DOI: 10.1021/jf304047g

TOLUN, A.; ALTINTAS, Z.; ARTIK, N. Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: development and characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 239, p. 23-33, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.10.001

VELOSO, C. C.; BITENCOURT, A. D.; CABRAL, L. D. M.; FRANQUI, L. S.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; GIUSTI-PAIVA, A. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 355-358, 2010. DOI: 10.1016/j.jep.2010.07.053

VELOSO, C. C.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, C. C.; RODRIGUES, V. G.; GIUSTI-PAIVA, A.; TEIXEIRA, M. M.; DUARTE, I. D.; FERREIRA, A. V. M.; PEREZ, A. C. Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 722-728, 2014. DOI: 10.1016/j.jep.2013.11.046

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis**: A thin layer chromatography atlas. Editora Springer, 2. ed. Berlim, 2001, 368 p.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis**: A Thin Layer Chromatography Atlas. Berlin: Springer Verlag, 1984.

WIJETUNGE, D. C. R.; PERERA, H. K. I. A novel in vitro method to identify protein glycation inhibitors. **Asian Journal Medicine Science**, v. 5, n. 3, p. 15-21, 2014. DOI: 10.3126/ajms.v5i3.8670

WU, G.; CHANG, C.; HONG, C.; ZHANG, H.; HUANG, J.; JIN, Q.; WANG, X. Phenolic compounds as stabilizers of oils and antioxidative mechanisms under frying conditions: A comprehensive review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 92, p. 33-45, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.07.043

YANG, H. L.; CHEN, S. C.; CHANG, N. W.; CHANG, J. M.; LEE, M. L.; TSAI, P. C.; FU, H. H.; KAO, W. W.; CHIANG, H. C.; WANG, H. H.; HSEU, Y. C. Protection from oxidative damage using *Bidens pilosa* extracts in normal human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 9, p. 1513-1521, 2006. DOI: 10.1016/j.fct.2006.04.006

ZHANG, Y. F.; XIAO, S.; SUN, L. J.; CHENG, Y. Y. Rapid screening of bioactive compounds from natural products by integrating 5-channel parallel. **Analytica Chimica Acta**, v. 777, p. 49-56, 2013. DOI: 10.1016/j.aca.2013.03.028

CAPÍTULO 2

Antiglycation, antioxidant and cytotoxicity activities of crude extract of *Turnera ulmifolia* L. before and after microencapsulation process

Amanda Martins Viel¹, Célia Cristina Malaguti Figueiredo¹, Filipe Oliveira Granero¹, Luciana Pereira Silva², Valdecir Farias Ximenes³, Thais Miranda Godoy⁴, Luis Eduardo Menezes Quintas⁴, Regildo Márcio Gonçalves da Silva^{1,5*}

¹ São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara, São Paulo, Brazil.

² Fundação Educacional do Município de Assis (FEMA), Assis, São Paulo, Brazil.

³ São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Department of Chemistry, Bauru, Brazil.

⁴ Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Institute of Biomedical Sciences, Laboratory of Biochemical and Molecular Pharmacology, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵ São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Department of Biotechnology, Laboratory of Phytotherapeutic and Natural Products, Assis, São Paulo, Brazil.

*Corresponding Author

Regildo Márcio Gonçalves da Silva

São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Department of Biotechnology, Laboratory of Phytotherapeutic and Natural Products, Dom Antonio Avenue 2100, 19806-900, Assis, São Paulo, Brazil.

Tel.: +55 18 33025800;

E-mail: regildos@yahoo.com.br

ORCID: 0000-0002-0300-0247

ABSTRACT

Turnera ulmifolia L. is used in folk medicine and it is known to have anti-hyperglycemic effect on the organism in order to reduce complications in diabetic patients. Glycation process is directly related to oxidative stress, acting as an important endogenous source, inducing the production of free radicals, and thus increasing the production of reactive oxygen species. The encapsulation technology on natural compounds can minimize and even mitigate the risk of loss of biological activity in order to maintain their activities against oxidative stress and glycation. The present study aimed to evaluate the antiglycation, antioxidant and cytotoxicity activities of *T. ulmifolia* crude extract before and after encapsulation. This study presents important information about the biological activities, highlighting antioxidant, antiglycation and no cytotoxicity potential of *Turnera ulmifolia* crude extract, a species of genus *Turnera*, an Turneraceae family that has been poorly studied. *T. ulmifolia* crude extract presented flavonoids as main active compounds. The results showed a promising activity in scavenging free and peroxy radicals, chelating iron ions and inhibiting BSA glycation. In addition, this study showed the possible encapsulation of bioactive compounds using maltodextrin as wall material.

Keywords: AGEs, Flavonoids, Microcapsules, MTT, Oxidative stress, Protein glycation.

1 Introduction

Glycation is a process that involves non-enzymatic addition of reducing sugars and/or their reactive degradation products to free amino groups of proteins, lipids or nucleic acids (Ding et al., 2020; Khan et al., 2020). The non-enzymatic glycation of biomolecules may alter their structures, affecting biological and functional activities and possibly leading to cell damage and cell death (Song et al., 2021).

This process can occur under physiological and pathological conditions by the formation of advanced glycation end-products (AGEs). AGEs are potentially toxic molecules that can affect human health, acting in the development of degenerative diseases such as diabetes, Parkinson's and Alzheimer's diseases, (Byun et al., 2017) and atherosclerosis (Song et al., 2021). In addition, it has been elucidated that AGEs in diet contribute to their endogenous accumulation and that restriction of ingestion of these molecules reduces serum levels of AGEs as well as inflammation and oxidative stress markers. Therefore, a relation between AGEs and health has been receiving increasing attention in food and pharmaceutical industries (Rowan, Bejarano, & Taylor, 2018).

Glycation process is directly related to oxidative stress, acting as an important endogenous source, inducing the production of free radicals, and thus increasing the production of reactive oxygen species (ROS). This process can promote molecular damage and result in alterations in activities of cells, tissues and organs, which can cause different degenerative and progressive diseases, and enhance the production of ROS that can potentiate DNA damage and elevate risk of mutagenesis and cancer (Song et al., 2021). The prevention of the pathogenic effects of glycation associated with oxidative stress requires the activities of endogenous detoxifying enzymes and exogenous antioxidants (Irrazabal et al., 2021) and antiglycations (Franco et al., 2020), highlighting the importance of a diversified and balanced diets, and also a healthy environment. Consequently, the investigation of natural products with both antioxidant and antiglycation properties offers a potential source of prevention of molecular and physiological damage (Ramos et al., 2019).

Studies indicate that natural compounds from plants such as polyphenols (phenolic acids and flavonoids) and terpenes are able to reduce non-enzymatic glycation (Song et al., 2021) and scavenge free radicals (Khosravi, & Razavi, 2020). Antiglycation compounds may inhibit the AGEs formation by interfering with metals, blocking AGEs, or reducing cellular changes induced by these molecules (Behl et al., 2021). Polyphenols, mainly flavonoids, have the ability to scavenge ROS, activate antioxidant enzymes, chelate metal, inhibit nitrite formation, reduce

α -tocopheryl radicals, inhibit oxidases and mitigate oxidative stress (Ansaria, & Ahmada; Haqqia, 2020; Behl et al., 2021).

The biological activity of natural compounds can be reduced or lost depending on processing and storage conditions, exposure to light and air, and large temperature variations. These conditions can cause degradation by oxidation, isomerization, and dehydrogenation. Studies have demonstrated that the encapsulation technology on natural compounds can minimize and even mitigate the risk of loss of biological activity, in addition to enable a controlled release of compounds in sites of interest, which makes this technology (micro or nano) one of the most effective methods of ensuring and maintaining the activity of natural compound (Giaconia et al., 2020).

Plants extracts have showed the ability to protect against non-enzymatic glycation and oxidative stress due to the presence of compounds with antiglycation and antioxidant action (Franco et al., 2020). Studies demonstrated that species of Turneraceae family and genus *Turnera* present different pharmacological activities such as anti-hyperglycemic, anti-inflammatory, antiulcerogenic and aphrodisiac (Brito et al., 2012; Lucio-Gutiérrez et al., 2019). The species *Turnera ulmifolia* L. is highlighted by its anti-inflammatory and antioxidant activities, which are correlated to the presence of polyphenols. (Nascimento et al., 2006; Brito et al., 2012). This species is used in folk medicine and it is known to have anti-hyperglycemic effect on the organism in order to reduce complications in diabetic patients; however, there is no data in current scientific literature to prove the activity of compounds and crude extracts of *T. ulmifolia* against the damage caused by hyperglycemia. In this context, the present study aimed to evaluate the antiglycation and antioxidant activities of crude extract of *T. ulmifolia* before and after encapsulation.

2 Materials and methods

2.1 Collection and preparation of *Turnera ulmifolia* crude extract

Branches, leaves and flowers of *T. ulmifolia* were obtained from plants growing at the São Paulo State University (UNESP-Assis, Brazil). Detailed information on the plant species can be obtained from the deposited voucher with accession number HASSI/UNESP-Assis subnumber 127 in the herbarium of UNESP. Plant parts were washed, dried by air-forced oven (40°C) and then grounded to obtain a powder. Hidroethanolic solution (70%) was used to extract secondary metabolites from the plant powder by percolation (Pista; Alves; Morgado, 1995). The extract was filtered, concentrated in a rotatory evaporator (<50 °C), and the resulting aqueous solution was frozen and lyophilized to obtain the crude dry extract (CETu).

2.2 Phytochemical compounds

2.2.1 Total phenols and flavonoids content

The total phenols and flavonoids content of the *T. ulmifolia* crude extract were determined. For total phenols, Folin-Ciocalteu method was employed (Stagos et al., 2012). To 0.5 mL extract, 5 mL distilled water and 0.25 mL Folin-Ciocalteu reagent were added. 3 min after incubation, 1 mL 10% Na₂CO₃ solution was added, and the mixture was incubated for 1 hour. Absorbance was measured at 725 nm by a spectrophotometer. A standard curve was plotted using gallic acid and total polyphenol content was expressed as miligram gallic acid equivalent per gram dry weight (mg GAE g⁻¹ DW).

Total flavonoid content was quantified following method described by Zhishen et al. (1999). 250 µL extract was mixed with 1.25 mL distilled water and 75 µL 5% NaNO₂ solution. Then, 150 µL 10% AlCl₃ solution was added after 6 minutes. Subsequently, 0.5 mL 1 M NaOH solution was added, and the total volume was adjusted to 2.5 mL with distilled water. The resulting solution was mixed and absorbance was measured at 510 nm. Rutin was used to plot a standard calibration curve and total flavonoid content was expressed as miligram rutin equivalent per gram dry weight (mg RE g⁻¹ DW).

2.2.2 HPLC-MS/MS analysis

An HPLC-MS/MS apparatus (Waters, LC-MS/MS System, USA) was connected with ACQUITY TQ Detector. Acetonitrile (MeCN) plus water with 0.005% formic acid was used as solvent A; acetonitrile and glacial acetic acid as solvent B. At the beginning, linear gradient from 4% to 33% B was employed for 35 min and then gradient was increased to 100% B for another 5 min. 4% B was used to re-equilibrate for final 5 min. Mass analysis of polyphenol compounds was performed using both positive and negative ion modes [ESI(+ve) & ESI(-Ve)]. The spray voltage was 5000 V and the capillary temperature was maintained at 280°C. Nitrogen gas at the flow rate of 40 U was used as the covering agent. Collision-induced dissociation (CID-MSn) method was used to induce fragmentation of the molecular ions, and the obtained fragments were analyzed using mass spectrometry. Helium gas was used as the collision agent at 0.8 mTorr. Collision energies of 15 and 30 eV were used to investigate the neutral loss and product ions, and scanning was performed at the mass range of 50-1000 m/z. Previous published data from literature were used for the identification of polyphenol compounds such as flavonoids and phenolic acids (Saravanan et al., 2018).

2.3 Microencapsulation

2.3.1 Microencapsulation with Maltodextrin DE20

Methodology used in the microencapsulation of *T. ulmifolia* crude extract was performed according to Robert et al. (2010) and Sousdaleff et al. (2013). The amounts of 5, 10 and 20 g of maltodextrin DE20 were dissolved in 80 mL distilled water at 60°C. The obtained solution was mixed with a solution containing 0.1 g extract dissolved in 5 mL ethanol and centrifuged at 2500 rpm for 30 min. The solution containing the microcapsules was concentrated in rotary evaporator and freeze-dried. A fine powder containing the microcapsules was obtained and it was used to evaluate stability (efficiency of encapsulation, rupture and release of the microcapsules), characterization (Scanning Electron Microscopy (SEM)) and antioxidant activity (DPPH test).

2.3.2 Morphological characterization of microcapsules

The morphology of the microcapsules obtained by freeze-drying was observed by Scanning Electron Microscopy (SEM) [Brand JEOL, model JSM-7500F, with PC-SEM operating software v. 2.1.0.3 equipped with secondary electron detectors, backscatter and chemical analysis (energy dispersive spectroscopy - EDS) from Thermo Scientific, Ultra Dry model, with NSS 2.3 operating software]. Microcapsules were fixed on stubs using copper-conducting adhesive tape and then coated with gold. Observations were made using SEM at acceleration voltage of 10 kV (Rosenberg et al., 1985; Dewi, Purnamayati, & Kurniasih, 2016).

2.3.3 Particle size and Zeta potential

Determination of particle diameter and polydispersity index (PDI) was performed using Zeta Plus Analyzer by photon correlation spectroscopy according to Gomes (2011). The particles diameters were calculated from statistical means and expressed as D [4,3] (mean diameter of De Brouckere), which indicates the center point around which the volume frequency of the distribution rotates. The Zeta potential of samples was obtained by measuring electrophoretic mobility at 25°C. The solubility in water was calculated by the difference of mass and results were expressed as percentage of solubility according to Cano-Chauca et al. (2005).

2.3.4 Release of the microcapsules

The release of microcapsules was performed according to Sousdaleff et al. (2013). Microcapsules were dispersed in 1 mL ethanol, acetic acid and water (50:8:42, v/v/v) solution.

This dispersion was stirred for 1 min and then sonicated twice at 50Hz frequency for 20 min (with a 5 min interval). The resulting solution from the microcapsules release was used to determine encapsulation efficiency and antioxidant activity (DPPH).

2.3.5 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency was performed according to Robert et al. (2010) with adaptations. The amount of phenolic compounds was quantified as described above, divided into three steps. In the first one, determination of non-encapsulated phenolic compounds before freeze-drying (FN) was performed. In the second step, the phenolic compounds encapsulated in microcapsules after freeze-drying (FE) and, in the third, these compounds released from the microcapsules after rupture (FR) were determined.

2.4 Antiglycation activity

2.4.1 Preparation of glycation reaction mixture

For the evaluation of antiglycation activity, glycation reaction mixtures were prepared. In test tubes with lids, Bovine Serum Albumin (BSA) (2 mg mL^{-1}) in Phosphate-Buffered Solution (PBS) (10 mM, pH 8.0) and Ribose (1 M) were added in presence or absence of extracts, (10 mg mL^{-1}) or Aminoguanidine (AMG) (40 Mm).

For the free amino group determination, an aliquot of the glycation reaction was incubated in a water bath at 60°C for 30 min and after this period, samples were dialyzed in the PBS for 24 h and frozen until analysis. For the analysis of AGEs fluorescence and relative electrophoretic mobility (REM), aliquots were incubated at 37°C for 7 days (REM) and 15 days (AGEs) without dialysis.

2.4.2 Determination of free amino groups

The free amino groups of glycated samples were determined by the orthophthaldialdehyde (OPA) method (Ledesma-Osuna, Ramos-Clamont, & Vázquez-Moreno, 2008). The OPA reagent was prepared with 25 mL 0.1 M sodium borate, 2.5 mL 20% SDS, 100 μL 2-mercaptoethanol, 40 mg OPA (dissolved in 1 mL methanol) and adjusted to 50 mL with distilled water. An aliquot of each glycated reaction mixture was mixed with 200 μL OPA reagent and incubated for 2 min in microplates at 37°C ; then, absorbance was measured at 340 nm. Untreated BSA (negative control) was assumed to present 100% free amino groups.

2.4.3 Inhibition of AGEs formation

Inhibition of AGEs formation was determined by OPA method (Ledesma-Osuna, Ramos-Clamont, & Vázquez-Moreno, 2008). An aliquot of each glycated reaction mixture was adjusted to 1 mL with OPA reagent (prepared as described above), incubated for 2 min at 37°C. The AGEs formation was determined by measuring its fluorescent characteristics in a spectrofluorimeter using excitation and emission at 360 and 460 nm, respectively. Results were expressed by the percentage of inhibition of AGEs formation.

2.4.4 Relative Electrophoretic Mobility (REM)

REM was evaluated according to the methodology described by Miura et al. (1994). SDS-PAGE was performed with 5% stacking gel and 8% separation gel. An aliquot of glycated BSA solution was mixed with an equal volume of Sodium dodecylbenzene sulfonate (SDS - Labsynth, Brazil) sample buffer (20 mg mL⁻¹ SDS, 30% glycine (Sigma-Aldrich, Brazil), 0.25 M Tris-HCl buffer, pH 6.8) and boiled for 3 min. From the mixed solution, 15 µL was applied to the stacking gel, and the separation gel was run in a constant flow of 30 mA, for approximately 3 h. After the electrophoresis process, the gel was fixed with acetic acid and then stained with Coomassie-Blue (R-250) (Sigma-Aldrich, Brazil). The results were observed in the REM using native BSA. Final concentrations of AMG (1 mM) and BSA (0.3 mg mL⁻¹, without extract) were used as positive and negative controls, respectively.

2.5 Antioxidant activity

2.5.1 DPPH radical scavenging test

Antioxidant activity was measured by DPPH method described by Rufino et al. (2010). Experiments were performed in triplicate for statistical purposes. Solutions containing 1 mL acetate buffer (100 mM, pH 5.5), 1.25 mL ethanol, 250 µL DPPH solution (500 µM) and 50 µL of samples were prepared. *T. ulmifolia* crude extract and solution of microcapsules reacted with DPPH for 30 min in dark and were measured in spectrophotometer (UV-Vis spectrophotometer - BelPhotonics Brazil) at 517 nm. Antioxidant activity was calculated according to the formula: Antioxidant activity (%) = [(Control-Samples)/Control] x 100, where Control is the absorbance of solution without samples and Samples is the absorbance of solution with samples. Gallic acid was used as positive control at 100 µg mL⁻¹. Concentrations of evaluated crude extract were 100, 250, 500, 750 and 1000 µg mL⁻¹. Microcapsules and microcapsules release products were 5.0 mg mL⁻¹.

2.5.2 Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP)

FRAP test was performed according to Guimarães et al. (2010). FRAP reagent was obtained mixing Acetate buffer (300 mM, pH 3.6), TPTZ (10 mM in 40 mM HCl) and $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) were mixed at the ratio of 10:1:1 (v/v/v). 2.7 mL of this reagent, 270 μL ultrapure water and 90 μL sample (crude extract) were mixed. The mixture was heated for 30 min at 37°C . Absorbance was measured at 593 nm and results were expressed in μM Trolox equivalent per grams of dry weight ($\mu\text{M TE g}^{-1}\text{ DW}$). *T. ulmifolia* crude extract concentrations were 100, 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5.3 Nitric oxide scavenging activity

Evaluation of nitric oxide (NO) sequestering capacity was performed according to Marcocci et al. (1994). A mixture of 320 μL of sample of *T. ulmifolia* crude extract was diluted at concentrations of 100, 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 360 μL Sodium Nitroprusside (NPS) (25 mM in PBS, pH 7.4) and 215 μL Griess reagent were incubated at 37°C for 2 h in dark. The sample absorbance was determined at 540 nm. The values were submitted to an equation obtained by linear regression of a calibration curve of sodium nitrite previously performed in the same test conditions and the results were expressed as concentration of nitrite formed ($\mu\text{M mL}^{-1}$ nitrite formed).

2.5.4 Oxygen radical absorption capacity (ORAC-FL)

The ORAC-FL test was performed as previously described by Dávalos, Gómez-Cordovés, and Bartolomé (2004), in which peroxy radicals were generated by decomposition of AAPH at 37°C . Fluorescein was used as a fluorescent probe, where loss of fluorescence indicates damage to fluorescein by reaction with peroxy radicals. 130 μL 100 nM fluorescein, 20 μL samples and 50 μL AAPH were added to microplates for fluorescence analysis. Measurements were performed using a fluorometer adapted for microplates (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, USA) at $\lambda_{\text{ex}} = 470\text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 520\text{ nm}$, 37°C , at intervals of 5 min for 2 h. The sensitivity of the equipment was adjusted to 100. ORAC values were based on the difference between an area under the fluorescence decay curve of the samples and the blank (AUCliquid), and linear regression equations between AUCliquid and concentrations were calculated for all samples. Results were expressed as $\mu\text{mol Trolox Equivalent per mg dry weight}$ ($\mu\text{mol TE mg}^{-1}\text{ DW}$).

2.6 Cytotoxicity analysis by MTT method

20 mg *T. ulmifolia* crude extract were stored in a stock solution of 20 mg mL⁻¹ in sterile PBS and from this solution, serial dilutions were prepared in the following final concentrations of 1 mg mL⁻¹; 0.5 mg mL⁻¹; 0.25 mg mL⁻¹; 0.125 mg mL⁻¹; 0.0625 mg mL⁻¹; 0.03125 mg mL⁻¹; 0.015625 mg mL⁻¹. On the first day, cells were plated with human cell line HFF1 (fibroblasts), approximately 0.5×10⁴ cell well⁻¹ in 200 µL medium well⁻¹ (triplicate) and 1×10⁴ cell well⁻¹ in 200 µL medium well⁻¹ (1 trial). The medium used was DMEM 15% FBS + 1% L-Glutamine containing penicillin (100 U mL⁻¹) and streptomycin (100 mg mL⁻¹). On the fourth day, the treatment was carried out where the cells were plated (0.5×10⁴) and kept in culture for 72 h to reach adequate confluence, after which they were treated. The assay that presented the cell density of 1×10⁴ received the treatment after 48 h. On the sixth day, in the laminar flow, 20 µL MTT solution (5 mg mL⁻¹) was added and kept for 4 h in the oven protected from light. After 4 h, the entire content was removed from each well, 200 µL DMSO was added and the Tecan Sunrise reader was read at a wavelength of 492 nm. Values were generated by the Magellan program and analyzed by the Prism program. The analysis was performed with the values subtracted from the blank (without extract and without cell) and from the blank-extract (with extract and without cell).

2.7 Statistical analysis

The data and graphs obtained were evaluated using the Origin® 2018 software, through Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Tukey test post hoc ($p \leq 0.05$).

3 Results and Discussion

3.1 Phytochemical compounds

3.1.1 Total phenols and flavonoids content

The total phenols and flavonoids content were determined at different concentrations (1, 3, 5, 7 and 10 mg mL⁻¹) of *T. ulmifolia* crude extract. Results showed dose-dependent response and the highest content of total phenols and flavonoids were observed at the concentration of 10 mg mL⁻¹ (604.80 mg GAE g⁻¹ DW and 876.20 mg RE g⁻¹ DW, respectively) (Table 1).

Table 1

The present study evaluated and showed the presence of polyphenols and flavonoids in *T. ulmifolia* crude extract. The observed values are similar and corroborate with different studies carried out with *T. ulmifolia* and other species of the same genus. Nascimento et al. (2006) performed preliminary studies, which correlated diversity and quantity of phenolic compounds in *T. ulmifolia*, extract with antioxidant activity. Similarly, study performed by Szewczyk, and Zidorn (2014) reported that extracts of plants of genus *Turnera* have high amounts of polyphenols, and they represent a rich source of natural antioxidants.

3.1.2 Characterization of *T. ulmifolia* crude extract by HPLC-MS/MS

The method developed by HPLC-DAD-MS/MS provided a rapid analysis of *T. ulmifolia* crude extract (CETu). The conditions used led to peaks separation and spectral determination of mass in solution, identifying the major presence of flavonoids from quercetin and rutin classes. Retention time (Rt), name of compounds (NCs), molecular formula (MF), molecular weight (MW), peak area (PA%) of compounds of CETu are presented in Table 2.

Table 2

Different flavonoids identified in CETu corroborate to previous studies carried out by Brito et al. (2012) that also evaluated the composition of *T. ulmifolia* extracts of different plant parts and identified the same flavonoids class. The presence of kaempferol and rutinoides have also been reported by Saravanan et al. (2018) and Willer et al. (2019) that evaluated other species of genus *Turnera*.

3.2 Microencapsulation

3.2.1 Morphological characterization of microcapsules

Figure 1 shows the images corresponding to microcapsules produced with maltodextrin DE20 containing CETu. The microcapsules presented irregular surface shapes with spacing between them, which is characteristic particles produced by freeze-drying process. The microcapsules size varied between 10 μm and 100 μm examined at 2000x magnification with scanning electron microscopy.

Figure 1

The microcapsules showed morphological similarity presenting spherical shape, irregular depressions, concavities, a dentate surface, and no cracks or ruptures. These are fundamental characteristics to guarantee greater protection and retention of encapsulated CETu. No uniformity was observed and sizes ranged from 10 μm and 100 μm , which was also identified by Neha et al. (2019) and Siemons et al. (2020) that observed microcapsules formed by maltodextrin containing natural compounds.

3.2.2 Particle size and Zeta potential

The particle size of microcapsules presented average diameters of 3.85. Microcapsules presented monomodal size distribution, showing no uniform distribution of particles and better stability of microcapsules. Mean particle diameters were calculated from statistical means and expressed as D [4,3] (mean diameter of De Brouckere), which indicates the center point around which the volume distribution frequency rotates. The particles showed PDI values close to 1.33. PDI is a dimensionless measure of the broadness of particles size, where values lower than 0.1 indicate a monodisperse (homogeneous system) and values higher than 0.1 indicate an heterogeneous (polydisperse system) (Zigoneanu et al., 2008). Particles presented negative Zeta potential (-0.21 mV), which indicates that the residual charge present in the wall material is negative. The microcapsule samples presented significant differences in Zeta potential by the Tukey test. According to Mishra et al. (2009), in order to obtain a physically stable Zeta potential, values should be higher than 30 mV (absolute value), although values ranged from -5 mV to +5mV indicate fast aggregation.

3.2.3 Encapsulation efficiency

Table 3 shows the values of encapsulation efficiency of CETu. The greater efficiency observed was 49.9% for microcapsules formulated with 0.1 g CETu and 5 g maltodextrin. Similar results were obtained in studies performed by Sousdaleff et al. (2013) that studied the efficiency and stability of maltodextrin microcapsules containing different products from plant sources (terpenes, flavonoids and tannins).

Table 3

3.3 Antiglycation activity

In determination of free amino groups, BSA treated with CETu at 10 mg mL^{-1} presented 40.58% free amino groups, which is the highest value observed and it presented significant difference with BSA treated with AMG (77.43% free amino groups).

In determination of inhibition of AGEs formation, BSA treated with AMG presented 77.80% inhibition and this value did not differ significantly when compared to the treatment with CETu at 10 mg mL^{-1} that resulted in 76% inhibition of AGEs formation.

In REM test, it is possible to observe in Figure 2 the electrophoretic profiles of BSA (1), Ribose (2), treatments with AMG (3) and CETu (4). It can be observed that the extract showed antiglycation potential against protein glycation promoted by ribose in BSA. BSA treated with CETu exhibited electrophoretic profile similar to BSA treated with AMG (3). BSA with ribose (2) showed an electrophoretic profile of protein degradation.

Figure 2

The present study showed that CETu present electrophoretic profile similar to AMG, evidencing the antiglycation activity against BSA glycation. These results correlate to antioxidant activity and corroborate to study performed by Akhter et al. (2021) that reported that oxidation reactions play a major role in increasing the rate of AGEs formation. Also, AGEs have the propensity to generate reactive oxygen species (ROS) and stimulate auto-oxidation reactions that result in formation of free radicals and other reactive intermediates. In addition, studies performed by Ramkissoon et al. (2013) and Eze, and Tolac (2020) demonstrated that protein glycation inhibitors decrease production and release of free radicals, as well as antioxidants protect against oxidative stress derived from glycation and thus these compounds have been reported as therapeutic agents for the treatment of many diseases.

3.4 Antioxidant activity

3.4.1 DPPH, FRAP and NO

Table 4 shows results of the different antioxidant in vitro tests (DPPH, FRAP and NO). For DPPH radical scavenging test, the highest antioxidant activity was presented at 1.00 mg mL^{-1} (70.60%). Results revealed a dose-dependent response and showed statistical difference in comparison with each other and with positive control (gallic acid). FRAP test showed the highest reducing potential at 0.75 mg mL^{-1} ($712.30 \text{ } \mu\text{M TE g}^{-1} \text{ DW}$); however, it did not differ statistically from treatment with the concentration of 1.00 mg mL^{-1} ($628.00 \text{ } \mu\text{M TE g}^{-1} \text{ DW}$).

For NO test, the highest NO scavenging activity was presented at 1.00 mg mL^{-1} ($34.10 \text{ } \mu\text{M mL}^{-1}$ nitrite formed).

Table 4

Results of antioxidant activity showed that CETu present a potential to scavenge DPPH and NO, and chelate iron ion. Previous studies performed by Patra, and Bhatnagar (2016) showed antioxidant activity of different *T. ulmifolia* extracts evaluated by the same assays. Kalimuthu et al. (2016) also observed the action of *T. ulmifolia* extracts in scavenging DPPH free radical and chelating iron ion.

3.4.2 ORAC-FL

A fluorescence-evaluated ORAC decay curve of Trolox pattern and different concentrations of *T. ulmifolia* extract is showed in Figure 3. In the time range of 0 to 120 minutes, the decay curve of CETu at concentration of $100 \text{ } \mu\text{g}$ did not present difference in comparison to Trolox curve. CETu at $25 \text{ } \mu\text{g}$ showed less activity in comparison to CETu at $100 \text{ } \mu\text{g}$ and Trolox; however, its decay curve also showed antioxidant activity by ORAC test.

Figure 3

This results are in accordance to studies performed by Szewczyk, and Zidorn (2014), Soriano-Melgar et al. (2014), Reyes-Becerril et al. (2020), and Saravanan et al. (2020) that demonstrated antioxidant potential of different extracts from various plant parts of species of genus *Turnera*, mainly attributed to the presence of different flavonoids. Preliminary studies carried out by Kalimuthu et al. (2016) demonstrated antioxidant activity of *T. ulmifolia* extract evaluated by DPPH and FRAP tests. This study showed for the first time the antioxidant activity of *T. ulmifolia* extract by ORAC test and thus there are no reports in the current scientific literature to compare. However, a review performed by Prior (2015) demonstrated the application and efficiency of ORAC test for the evaluation of natural compounds (flavonoids) obtained from diet.

3.5 Cytotoxicity analysis by MTT method

The results of cytotoxic activity of the *T. ulmifolia* crude extract at different concentrations on the human fibroblast cell line (HFF1) are showed in Figure 4. The HFF1 cells

were treated for 48 h at 37°C, in a humid atmosphere and with 5% CO₂ and cell viability was evaluated by the MTT assay. Each bar represents the reduction of MTT (OD_{492nm}) where treatments did not differ significantly compared to the control, which demonstrates the absence of cytotoxicity of the evaluated extract.

Figure 4

The absence of cytotoxicity demonstrated in present study corroborate with study performed by Rodríguez-Rodríguez et al. (2021) that used extract of species of genus *Turnera* in fibroblast cell. The significant antioxidant and antiglycation potential of CETu demonstrated in the present study may be correlated to the absence of cytotoxic activity, as studies performed by Mojarrab et al. (2016), Kim et al. (2019), Pisoschi et al. (2020) and Valentová (2020) demonstrated that natural antioxidants promote a cytoprotective action, inhibiting damage caused by free radicals, as well as inhibiting protein glycation and reducing AGEs formation, which could indirectly increase oxidative stress.

4 Conclusion

This study presents important information about the biological activities, highlighting antioxidant, antiglycation and no cytotoxicity potential of *Turnera ulmifolia* crude extract, a species of genus *Turnera*, an Turneraceae family that has been poorly studied. *T. ulmifolia* crude extract presented flavonoids as main active compounds. The results showed a promising activity in scavenging free and peroxy radicals, chelating iron ions and inhibiting BSA glycation. In addition, this study showed the possible encapsulation of bioactive compounds using maltodextrin as wall material. However, further studies are needed to elucidate the active compounds and evaluate their possible pharmaceutical and/or cosmetic application.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES).

References

- Akhter F., Chen D., Akhter A., Yan S.F., & Yan S.S. (2021). Age-dependent accumulation of dicarbonyls and advanced glycation endproducts (AGEs) associates with mitochondrial stress. *Free Radical Biology and Medicine* 164, 429-438. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.021>
- Ansaria M.Y., Ahmada N., & Haqqia T.M. (2020). Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 129, 110452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110452>
- Báez-Parra K.M., Soto-Beltrán M., López-Cuevas O., Basilio Heredia J., Alcaraz-Meléndez L., & Angulo-Escalante M.A. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity of Methanolic and Hexanic Extracts of *Turnera diffusa* Against Common Urinary Pathogens. *Revista Bio Ciencias* 6(2), e670. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.nesp.e670>
- Behl T., Kumar K., Singh S., Sehgal A., Sachdeva M., Bhatia S., Al-Harrasi A., Buhas C., Judea-Pusta C.T., Negrut N., Munteanu M.A., Brisc C., & Bungau S. (2021). Unveiling the role of polyphenols in diabetic retinopathy. *Journal of Functional Foods* 85, 104608. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104608>
- Bezerra A.G., Negri G., Duarte-Almeida J.M., Smaili S.S., & Carlini E.A. (2016). Phytochemical analysis of hydroethanolic extract of *Turnera diffusa* Willd and evaluation of its effects on astrocyte cell death. *Einstein (São Paulo)* 14(1), 56-63. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016AO3386>
- Brito N.J.N., López J.A., Nascimento M.A., Macêdo J.B.M., Silva G.A., Oliveira C.N., Rezende A.A., Brandão-Neto J., Schwarz A., & Almeida M.G. (2012). Antioxidant activity and protective effect of *Turnera ulmifolia* Linn. var. *elegans* against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50(12), 4340-4347. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.003>
- Byun K., Yoo I.C., Son M., Lee J., Jeong G.B., Park Y.M., Salekdeh G.H., & Lee B. (2017). Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases. *Pharmacology & Therapeutics* 177, 44-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.030>
- Cano-Chauca M., Stringheta P.C., Ramos A.M., & Cal-Vidal J. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6(4), 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>
- Chandrasekhar N., & Vinay S.P. (2017). Yellow colored blooms of *Argemone mexicana* and *Turnera ulmifolia* mediated synthesis of silver nanoparticles and study of their antibacterial and antioxidant activity. *Applied Nanoscience* 7, 851-861. <https://doi.org/10.1007/s13204-017-0624-5>
- Dávalos A., Gómez-Cordovés C., & Bartolomé B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(1), 48-54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>

- Dewi E.N., Purnamayati L., & Kurniasih R.A. (2016). Antioxidant activities of phycocyanin microcapsules using maltodextrin and carrageenan as coating materials. *Jurnal Teknologi* 78(4-2), 45-50. <https://doi.org/10.11113/jt.v78.8151>
- Ding H., Ni M., Zhang G., Liao Y., Hu X., Zhang Y., & Gong D. (2020). The inhibition of oleanolic acid on protein non-enzymatic glycation. *LWT - Food Science and Technology* 125, 109253. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109253>
- Estrada-Reyes R., Ortiz-López P., Gutiérrez-Ortíz J., & Martínez-Mota L. (2009). *Turnera diffusa* Wild (Turneraceae) recovers sexual behavior in sexually exhausted males. *Journal of Ethnopharmacology* 123(3), 423-429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.032>
- Eze F.N., & Tola A.J. (2020). Protein glycation and oxidation inhibitory activity of *Centella asiatica* phenolics (CAP) in glucose-mediated bovine serum albumin glycooxidation. *Food Chemistry* 332, 127302. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127302>
- Franco R.R., Zabisky L.F.R., Lima Júnior J.P., Alves V.H.M., Justino A.B., Saraiva A.L., Goulart L.R., & Espindola F.S. (2020). Antidiabetic effects of *Syzygium cumini* leaves: A non-hemolytic plant with potential against process of oxidation, glycation, inflammation and digestive enzymes catalysis. *Journal of Ethnopharmacology* 261, 113132. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113132>
- Giaconia M.A., Ramos S.P., Pereira C.F., Lemes A.C., Rosso V.V., & Braga A.R.C. (2020). Overcoming restrictions of bioactive compounds biological effects in food using nanometer-sized structures. *Food Hydrocolloids* 107, 105939. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105939>
- Gomes G.V.L. (2011). Microstructural production and characterization of solid micro- and nanoparticulate lipid systems used in the encapsulation of beta-carotene. 121 f. Dissertation (Master in Food Engineering) Pirassununga: University of São Paulo, Brazil.
- Guimarães A.G., Oliveira G.F., Melo M.S., Cavalcanti S.C.H., Antonioli A.R., Bonjardim L.R., Silva F.A., Santos J.P.A., Rocha R.F., Moreira J.C.F., Araújo A.A.S., Gelain D.P., & Quintans-Júnior L.J. (2010). Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 107(6), 949-957. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00609.x>
- Irrazabal T., Thakur B.K., Croitoru K., & Martin A. (2021). Preventing Colitis-Associated Colon Cancer With Antioxidants: A Systematic Review. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 11(4), 1177-1197. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.12.013>
- Kalimuthu K., Chinnadurai V., Prabakaran R., Subramaniam P., & Sarmila Juliet Y. (2016). Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activities of *Turnera ulmifolia* (Yellow Alder) Callus. *British Journal of Pharmaceutical Research* 9(5), 1-12. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/21920>
- Khan M., Liu H., Wang J., & Sun B. (2020). Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. *Food Research International* 130, 108933. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>

- Khosravi A., & Razavi S.H. (2020). The role of bioconversion processes to enhance bioaccessibility of polyphenols in rice. *Food Bioscience* 35, 100605. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100605>
- Kim E., Han S.Y., Hwang K., Kim D., Kim E., Hossain M.A., Kim J., & Cho J.Y. (2019). Antioxidant and Cytoprotective Effects of (–)-Epigallocatechin-3-(3’-O-methyl) Gallate. *International Journal of Molecular Sciences* 20(16), 3993. <https://doi.org/10.3390/ijms20163993>
- Ledesma-Osuna A.I., Ramos-Clamont G., & Vázquez-Moreno L. (2008). Characterization of bovine serum albumin glycated with glucose, galactose and lactose. *Acta Biochimica Polonica* 55(3), 491-497. https://doi.org/10.18388/abp.2008_3054
- Lucio-Gutiérrez J.R., Delgado-Montemayor C., Coello-Bonilla J., Waksman-Minskya N., & Saucedo A.L. (2019). Selective 1D-TOCSY and chemometrics to evaluate authenticity of *Turnera diffusa* and related botanical extracts. *Phytochemistry Letters* 30, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.01.011>
- Marcocci L., Maguire J.J., Droylefaix M.T., & Packer L. (1994). The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201(2), 748-755. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.1764>
- Mishra P.R., Shaal L.A., Müller R.H., & Keck C.M. (2009). Production and characterization of Hesperetin nanosuspensions for dermal delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 371(1-2), 182-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.12.030>
- Miura S., Watanabe J., Tomita T., Sano M., & Tomita I. (1994). The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 17(12), 1567-1572. <https://doi.org/10.1248/bpb.17.1567>
- Mojarrab M., Nasseri S., Hosseinzadeh L., & Farahani F. (2016). Evaluation of antioxidant and cytoprotective activities of *Artemisia ciniformis* extracts on PC12 cells. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 19(4), 430-438.
- Nascimento M.A., Silva A.K., França L.C.B., Quignard E.L.J., López J.A., & Almeida M.G. (2006). *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): preliminary study of its antioxidant activity. *Bioresource Technology* 97(12), 1387-1391. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.07.009>
- Neha K., Haider M.R., Pathak A., & Yar M.S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry* 178, 687-704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Patra S., & Bhatnagar S. (2016). Phytochemical, Antioxidant and Cytotoxic Activity of Leaf Extracts of *Turnera ulmifolia*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research* 7(2), 349-358.
- Pisoschi A.M., Pop A., Iordache F., Stanca L., Predoi G., & Serban A.I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - an overview on their chemistry and influences on health status.

European Journal of Medicinal Chemistry 209, 112891.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>

Prior R.L. (2015). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods* 18(Part B), 797-810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Ramkissoon J.S., Mahomoodally M.F., Ahmed N., & Subratty A.H. (2013). Antioxidant and anti-glycation activities correlates with phenolic composition of tropical medicinal herbs. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 6(7), 561-569. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60097-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60097-8)

Ramos A.S., Mar J.M., Silva L.S., Acho L.D.R., Silva B.J.P., Lima E.S., Campelo P.H., Sanches E.A., Bezerra J.A., Chaves F.C.M., Campos F.R., & Machado M.B. (2019). Pedraume caá fruit: An Amazon cherry rich in phenolic compounds with antiglycant and antioxidant properties. *Food Research International* 123, 674–683. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.042>

Reyes-Becerril M., Gínera P., Silva-Jara J., Macías A., Velázquez-Carriles C., Alcaraz-Meléndez L., & Angulo C. (2020). Assessment of chemical, biological and immunological properties of “Damiana de California” *Turnera diffusa* Willd extracts in Longfin yellowtail (*Seriola rivoliana*) leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 100, 418-426. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.045>

Robert P., Gorena T., Romero N., Sepulveda E., Chavez J., & Saenz C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology* 45(7), 1386-1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>

Rodríguez-Rodríguez D.R., Lozano-Sepulveda S.A., Delgado-Montemayor C., Waksman N., Cordero-Perez P., & Rivas-Estilla A.M. (2021). *Turnera diffusa* extract attenuates profibrotic, extracellular matrix and mitochondrial markers in activated human hepatic stellate cells (HSC). *Annals of Hepatology* 22, 100281. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.10.009>

Rosenberg M., Kopelman I.J., & Talmon Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science* 50(1), 139-144. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1985.tb13295.x>

Rowan S., Bejarano E., & Taylor A. (2018). Mechanistic targeting of advanced glycation end-products in age-related diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864(12), 3631-3643. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.036>

Rufino M.S.M., Alves R.E., Brito E.S., Pérez-Jiménez J., Saura-Calixto F., & Mancini-Filho J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry* 121(4), 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>

Saravanan M., Senthilkumar P., Kalimuthu K., Chinnadurai V., Vasantharaj S., & Pugazhendhi A. (2018). Phytochemical and pharmacological profiling of *Turnera subulata* Sm., a vital

medicinal herb. *Industrial Crops and Products* 124, 822-833. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.065>

Saravanan M., Senthilkumar P., Chinnadurai V., Sakthivel K.M., Rajeshkumar R., & Pugazhendhi A. (2020). Antiangiogenic, anti-inflammatory and their antioxidant activities of *Turnera subulata* Sm. (Turneraceae). *Process Biochemistry* 89, 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.10.011>

Siemons I., Politiek R.G.A., Boom R.M., Van der Sman R.G.M., & Schutyser M.A.I. (2020). Dextrose equivalence of maltodextrins determines particle morphology development during single sessile droplet drying. *Food Research International* 131, 108988. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.108988>

Song Q., Liu J., Dong L., Wang X., & Zhang X. (2021). Novel advances in inhibiting advanced glycation end product formation using natural compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 140, 111750. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111750>

Soriano-Melgar L.A.A., Alcaraz-Meléndez L., Méndez-Rodríguez L.C., Puente M.E., Rivera-Cabrera F., & Zenteno-Savín T. (2014). Antioxidant responses of damiana (*Turnera diffusa* Willd) to exposure to artificial ultraviolet (UV) radiation in an in vitro model; part II; UV-B radiation. *Nutrición Hospitalaria* 29(5), 1116-1122. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.5.7092>

Sousdaleff M., Baesso M.L., Neto A.M., Nogueira A.C., Marcolino V.A., & Matioli G. (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixin and curcumin with maltodextrin: stability, solubility and food application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(4), 955-965. <https://doi.org/10.1021/jf304047g>

Stagos D., Portesis N., Spanou C., Mossialos D., Aligiannis N., Chaita E., Panagoulis C., Reri E., Skaltsounis L., Tsatsakis A.M., & Kouretas D. (2012). Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food and Chemical Toxicology* 50(11), 4115-4124. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.033>

Szewczyk K., & Zidorn C. (2014). Ethnobotany, phytochemistry, and bioactivity of the genus *Turnera* (Passifloraceae) with a focus on damiana—*Turnera diffusa*. *Journal of Ethnopharmacology* 152(3), 424-443. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.019>

Valentová K. (2020). Cytoprotective Activity of Natural and Synthetic Antioxidants. *Antioxidants* 9(8), 713. <https://doi.org/10.3390/antiox9080713>

Willer J., Jöhrer K., Greil R., Zidorn C., & Çiçek S.S. (2019). Cytotoxic Properties of Damiana (*Turnera diffusa*) Extracts and Constituents and A Validated Quantitative UHPLC-DAD Assay. *Molecules* 24(5), 855. <https://doi.org/10.3390/molecules24050855>

Zhishen J., Mengcheng T., & Jianming W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry* 64(4), 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2)

Zigoneanu I.G., Astete C.E., & Sabliov C.M. (2008). Nanoparticles with entrapped alfatocopherol: Synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology* 19(10), 105606. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/10/105606>

Table 1. Evaluation of total polyphenols and flavonoids content of *T. ulmifolia* crude extract.

Concentration (mg mL ⁻¹)	Total phenol1	Total flavonoid2
1	47.90±0.57a	96.80±3.05a
3	163.70±4.49b	277.10±22.41b
5	264.10±13.47c	392.53±18.82c
7	347.80±10.96d	465.50±12.58d
10	604.80±11.98e	876.20±20.29e

Values are expressed as mean ± standard deviation. 1mg gallic acid equivalent (GAE) g⁻¹ dry weight (DW); 2mg rutin equivalent (RE) g⁻¹ dry weight (DW). Same letters within the same column indicate no significant differences among samples by Tukey test (p≤0.05)

Table 2. Retention Time (Rt), name of compounds (NCs), molecular formula (MF), molecular weight (MW) and peak area (PA%) of compounds of *T. ulmifolia* crude extract.

Rt	NCs	MF	MW	PA %	References
2.18	Kaempferol-3-O-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433.87	1.47	Estrada-Reyes et al. (2009); Brito et al. (2012); Szewczyk, and Zidorn (2014); Bezerra et al. (2016); Chandrasekhar, and Vinay (2017); Saravanan et al. (2018), Báez-Parra et al. (2019); Willer et al. (2019); Nascimento Júnior et al. (2020).
5.15	Kaempferol-3-O-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	449.19	1.89	
10.89	Cyanidin-3-O-rhamnoside	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433.11	7.56	
12.46	Delphinidin-3-O-rutinoside	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	611.16	4.20	
17.09	Naringenin-7-O-glucuronide	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448.10	7.31	
23.23	6,7,30,40-Tetrahydroxyisoflavone	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.05	23.11	
27.57	m-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	164.86	2.63	
29.47	Dihydro-caffeoyl-3-O-glucuronide	C ₁₅ H ₁₈ O ₁₀	358.09	9.98	

Table 3. Encapsulation efficiency of CETu by total phenols determination

Samples	(g) + MD20 (g)	Total phenols			ME %
		FN	FE	FR	
CETu	0.10 + 5.00		28.50 ± 1.9	160.40 ± 15.7	49.9
	0.10 + 10.0	264.10 ± 13.47	29.60 ± 2.2	120.00 ± 4.4	34.2
	0.10 + 20.0		29.60 ± 1.1	76.70 ± 1.7	17.8
MD20	0.0 + 10.0	-	-	-	-

MD20 = maltodextrin DE20; FN= non-encapsulated phenolic compounds before freeze-drying; FE= phenolic compounds encapsulated in microcapsules after freeze-drying; FR= phenolic compounds after release; ME= microencapsulation efficiency.

Table 4. Antioxidant activity of CETu and positive control (Gallic Acid and Trolox) by DPPH, FRAP and NO tests.

Extract	Concentration (mg mL ⁻¹)	DPPH1	FRAP2	NO3
CETu	0.10	4.20 ± 2.1a	63.00 ± 2.3a	21.60 ± 1.4a
	0.25	16.60 ± 2.4b	154.00 ± 6.8b	24.20 ± 1.1b
	0.50	26.90 ± 1.9c	381.20 ± 8.5c	27.50 ± 1.5b
	0.75	31.90 ± 3.6c	712.30 ± 17.6d	-
	1.00	70.60 ± 3.2d	628.40 ± 20.0d	34.10 ± 2.5c
Gallic acid	0.10	87.0 ± 0.2e		
Trolox	1.00	-	-	8.0 ± 0.0d

Values expressed as mean ± standard deviation. CETu = *T. ulmifolia* Crude Extract. 1% Antioxidant Activity, 2µM Trolox Equivalent (TE) g-1 dry weight (DW), 3µM mL⁻¹ nitrite formed. Same letters within the same column indicate no significant differences among samples by Tukey test ($p \leq 0.05$).

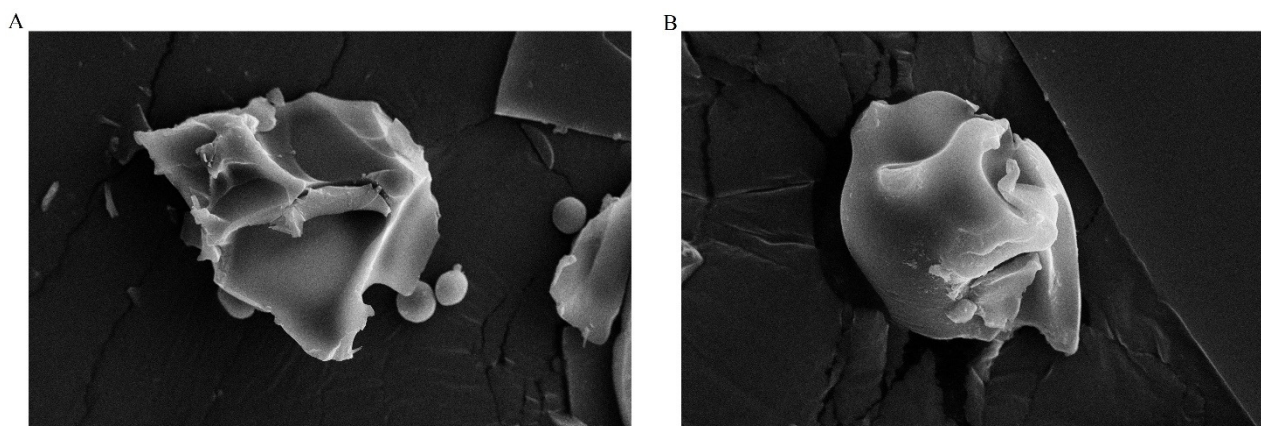


Figure 1. Micrographs (SEM) of maltodextrin microcapsules containing CETu at 2000x magnification (A and B).

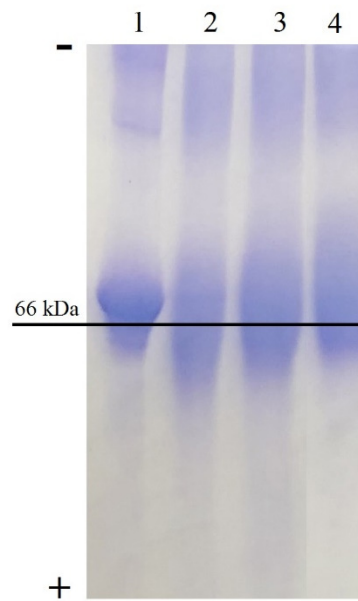


Figure 2. Relative electrophoretic mobility test for evaluation of antiglycation activity: 1= BSA; 2= BSA+Ribose; 3= BSA+Ribose+AMG; 4= BSA+Ribose+CETu.

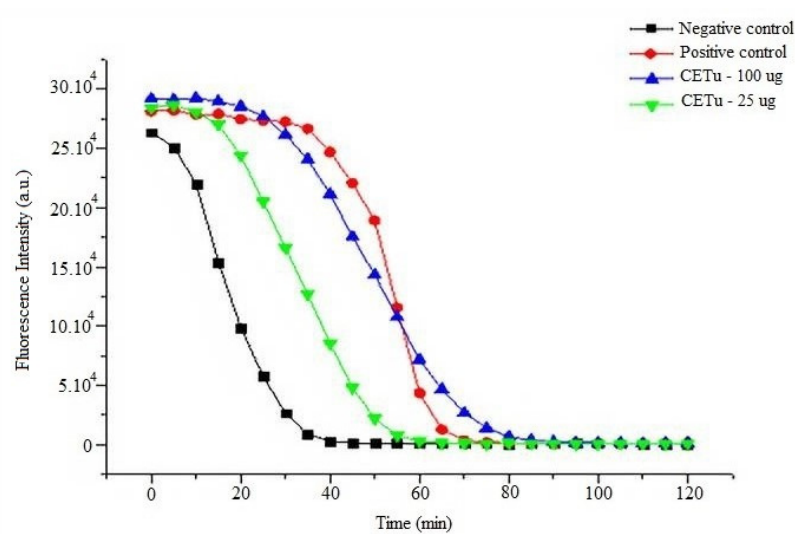


Figure 3. Effect of different concentration of *T. ulmifolia* extract (CETu) and Trolox (positive control) on decay curve. Measured by changes in fluorescein intensity from 0 to 120 minutes.

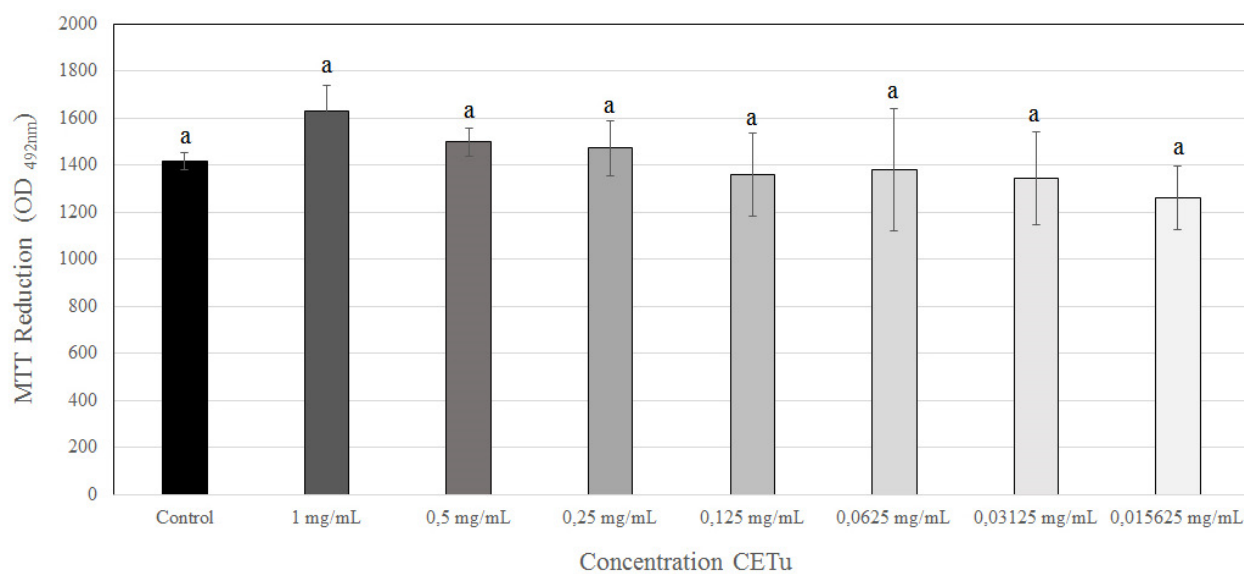


Figure 4. Cytotoxic activity of the *T. ulmifolia* crude extract (CETu) at different concentrations (1; 0.5; 0.25; 0.125; 0.0624; 0.03125 and 0.015625 mg mL⁻¹). Each bar represents MTT reduction (OD 492nm). Results with equal letters did not differ statistically ($p \leq 0.05$).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da hipótese levantada e dos objetivos propostos é possível considerar que ambas as espécies *Pyrostegia venusta* e *Turnera ulmifolia*, apresentaram potencial para serem utilizadas como fonte de compostos ativos antioxidantes e antiglicante, principalmente flavonoides.

P. venusta apresentou citotoxicidade em células de fibroblastos, o que reflete a possibilidade de utilização dessa espécie em linhagens de células tumorais. A *T. ulmifolia* não apresentou citotoxicidade pelo teste de MTT.

Os extratos microencapsulados em maltodextrina por método de liofilização demonstrou eficácia da técnica aplicada, pois foi capaz de preservar o conteúdo polifenólico, que apresentou atividade antioxidante após liberação das microcápsulas.

Pyrostegia venusta e *Turnera ulmifolia* podem ser consideradas espécies promissoras como fonte de compostos ativos, para aplicação em diferentes áreas da indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia.

ANEXO

TOXICOLOGICAL, GENOTOXIC AND ANTIOXIDANT POTENTIAL OF *PYROSTEGIA VENUSTA*

POTENCIAL TOXICOLÓGICO, GENOTÓXICO E ANTIOXIDANTE DE *PYROSTEGIA VENUSTA*

Amanda Martins VIEL¹; Luciana Pereira SILVA²; Gustavo Rafagnin MARTINS³; Betsaida URTREMARI⁴; Alline SEKIYA⁵; Anne Lúgia DOKKEDAL⁶; Edislane Barreiros de Souza⁷; Isabel Cristina Cherici CAMARGO⁸; Regildo Márcio Gonçalves SILVA⁹

1. MSc in Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara; 2. PhD in Immunology and Parasitology Applied, Educational Foundation of the Municipality of Assis (FEMA); 3. MSc in Biotechnology, São Paulo State University (UNESP), Institute of Chemistry, Araraquara; 4. Biologist, São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, Department of Biotechnology; 5. MSc in Genetics and Molecular Biology, State University of Londrina (UEL); 6. PhD in Biological Sciences, Department of Biological Sciences, State University of São Paulo (UNESP), Faculty of Sciences of Bauru, Bauru; 7. PhD in Biological Sciences - Genetics, São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, Department of Biotechnology; 8. PhD in Biological Sciences - Anatomy, São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, Department of Biotechnology; 9. PhD-LD in Plant Physiology and Natural Products, São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, Department of Biotechnology, Assis, São Paulo, Brazil. e-mail: regildo.silva@unesp.br

ABSTRACT: *Pyrostegia venusta* is usually found in the secondary growth of the Atlantic forests, and in the Brazilian Savanna. Flowers and leaves of this plant are used in folk remedies for treating a wide variety of healthy conditions, this way is important evaluate its safety and antioxidant potential for this applications. For this, was made a ethanolic extract from its flowers and analyzed with toxicological, genotoxicity and antioxidant tests, the toxicological analysis was made by reproductive toxicity in rats and clatogenicity/aneugenicity in human lymphocytes. The genotoxicity was studied by micronucleus test mice bone marrow. The antimutagenic test in root cells of *Allium cepa*, the antioxidant assays used was DPPH, FRAP, Lipid Peroxidation and REM, beyond of that the extract was analyzed in HPLC showing the profile of its compounds. The toxicological analysis showed that *P. venusta* has no negative significant effect on reproductive and cellular level. The micronucleus test in mouse bone marrow, the extract protected cells from cyclophosphamide, mutagenic compound, in a similar way. The *A. cepa* test showed that the extract reduced chromosomal disorders formations. The antioxidant activity of extract was significant, except in REM test. The phytochemical analysis showed the presence of flavonoids compounds. *P. venusta* extract does not present reproductive toxicity and genotoxic effects. However, the extract of this species showed antigenotoxic and antioxidant potential, possibly due to the different flavonoid compounds present in its extract.

KEYWORDS: Reproductive toxicology. Cytotoxicity. Oxidation. Mutagenesis. Flavonoids. Phenol compounds.

INTRODUCTION

Pyrostegia venusta (Ker-Gawl) Miers, is popularly known as “flor-de-São-João” or “cipó-de-São-João” and in folk medicine (SOUSA, 2016), a neotropical heliophyte bignoniaceous vine is a typical colonizing species. It is usually found in the secondary growth of the Atlantic forests, and in the Brazilian Savanna with characteristic savanna-like vegetation. Its geographical distribution reaches from southern Brazil to Paraguay, Bolivia, and northeastern Argentina (POOL, 2008). Ethnomedically, flowers and leaves of this plant are used in folk remedies for treating white patches on the skin (leukoderma, vitiligo) (FERREIRA et al., 2000). An infusion prepared from the bark and roots is widely used in the

treatment of erysipelas, jaundice (hyperbilirubinemia and deposition of bile pigments) and infections of female genital tract in newborn babies (ROY et al., 2012). In addition, *P. venusta* is also used for cough and common diseases of the respiratory system that are related to infections, such as bronchitis and influenza (FIGUEIREDO et al., 2014). Roy et al. (2011) demonstrated that the extracts of flowers and roots of *P. venusta* contain significant amounts of phytochemicals with antioxidant properties that could act as inhibitors or scavengers of free radicals.

Moreover, no genotoxic effect was observed for extracts of *P. venusta* on bone marrow of mice using the micronucleus and

Received: 18/04/18

Accepted: 10/10/18

Biosci. J., Uberlândia, v. 35, n. 2, p. 570-585, Mar./Apr. 2019

<http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v35n2a2019-41790>

Toxicological, genotoxic...

chromosome aberration assay (MAGALHÃES et al., 2010).

Major chemical components reported in the methanolic extract *P. venusta* flowers are sitosterol, n-hentriacontane ($\text{n-C}_{31}\text{H}_{64}$), 7-O-d-glicopiranosilacetina and mesoinositol (myoinositol) hexadecanoic acid, linoleic acid, oleic acid, stigmasteryl tosylate, diazoprogestosterone, arabipyranoze, propanoic acid, pentamethyldisilanyl ester, acetophenone and trans-3-hexenedioic acid, and 9-octadecenoic acid (Z)-methyl ester (ROY et al., 2011). Analysis of the ethanolic extract of the roots performed by Ferreira et al. (2000) identified allantoin, steroids, sitosterol and 3-O-d-glicopiranosilsitosterol and flavanone hesperidin and others studies performed by Santos and Blatt (1998) have identified the presence of different classes of flavonoids and phenols in the leaves evaluated, in forty species of Bignoniaceae, including *P. venusta*, revealing the presence of phenolic components and syringyl groups (phytochemicals).

Given the medicinal effects attributed to *P. venusta*, and the diverse secondary compounds of *P. venusta*, studies on the toxic, cytotoxic and mutagenic potential of this plant species should be carried out. Based on their traditional use for long periods of time vegetable preparations are often assumed to be safe. However, research has shown that many plants that are used for food or used in traditional medicine have *in vitro* mutagenic properties (MOHD-FUAT et al., 2007) or toxic and carcinogenic properties (FERREIRA; VARGAS, 1999).

Within this context, it is also important to screen medicinal plants for their mutagenic properties. Plants exhibiting clear mutagenic properties should be considered as potentially unsafe and certainly require further testing before their continued use can be recommended. On the other hand, plants with obvious antimutagenic potential may be of interest for therapeutic use and are worthy of further in-depth investigations of their pharmacological properties.

The purpose of the present study was to evaluate the *in vivo* and *in vitro* toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of extracts of the flowers of *P. venusta* on tissues of female rat reproductive organs, cultured human lymphocytes and bone marrow of mice. In addition, the antioxidant potential and phytochemical profile of the extract was investigated.

MATERIAL AND METHODS

Collection of plant material

VIEL, A. M. et al.

The flowers of *P. venusta* were collected from specimen of remaining Savanna vegetation near the campus of UNESP/Assis, SP, Brazil (22°32'26"S and 50°22'31"N and 22°32'18"S; 50°22'47"N) and a copy was taxonomically identified at the Herbarium of the Forestry Institute of Assis, São Paulo, Brazil (voucher specimen: SPSF-40207). The collection was made in a sustainable manner and without causing environmental impact to the specie collected.

Preparation of plant material in the laboratory, production and storage of ethanolic extract

Flowers of *P. venusta* were selected and dried with airflow at a temperature of 40 °C, and then crushed and pulverized to prepare the ethanolic crude extract. The mechanical extraction of the powdered plant under stirring with ethanol PA at 1:10 (w:v) was carried out over a 24 h period and repeated twice. After obtaining the extract, the sample was taken to a rotary evaporator to remove all of the alcohol, and the resulting concentrated extract was taken to the drying chamber to obtain a dry extract.

Evaluation of reproductive toxicity in rats

Wistar adult female rats that were 12 weeks of age and weighed 250 g were kept at the Faculty of Sciences and Letters (UNESP- Assis, SP, Brazil), and maintained under controlled conditions of temperature (23 ± 1 °C) and lighting. (12L, 12D photoperiod, lights switched on at 7 a.m.). Tap water and commercial chow were supplied *ad libitum*. The experimental protocol followed the Ethical Principles in Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Ethical Committee for Animals Use (Permit number: 002/2010).

Females were weighed and randomly distributed in two groups ($n = 14/\text{group}$), either a control group (given 0.5 mL distilled water) or the experimental group (given *P. venusta*, 100 mg/Kg body weight (bw) of ethanolic extract that was diluted in 0.5 mL distilled water). The rats of each group received the treatment by via an oral (gavage), single dose daily, during 20 consecutive days.

During the experiment, animals were given a cytological examination (vaginal swabs), according (MARCONDES et al., 2002). The time collection was fixed at 7 a.m. Each slide was analyzed under a light microscope (Olympus CX31 RBSFA, Japan).

The consumption of water and food were registered daily. After the treatment period, the females in estrus phase of the estrous cycle

Toxicological, genotoxic...

(n=7/group) were sacrificed through a lethal intraperitoneal (i.p.) dose of sodium thiopental (Thiopentax®, Cristália, São Paulo, Brasil). The ovaries and uterine horns were collected and weighed, and then fixed in Bouin's solution, and processed in the usual histological routine for paraffin embedding (Paraplast Labware-Oxford, St. Louis, MO, USA). The blocks were sliced into 5 µm-thick sections and stained with Hematoxylin-Eosin (H&E) or Mallory's Tricomic. The types of follicles were identified according (PEDERSEN; PETERS, 1968) as presented (PLOWCHALCK et al., 1993; VIEL et al., 2017). Ovarian and uterine sections were analyzed using a Zeiss microscope (Scope A1-Axio coupled with video-camera AxioCam ICc3 and digitalized by the software Axio Vision, version 4.7.2).

At the end of the treatment period, other 7 females of each group were mated with untreated males. After mating, the presence of sperm in the morning vaginal smear was indicative of fertilization and was considered as day one of gestation (GD1). Pregnant females were kept in individual cages. On the 19th gestational day (GD19) a laparotomy was performed after an intramuscular administration of ketamine (40 mg/kg bw) and xylazine (20 mg/kg bw), and records were obtained for the number of implantations, the number of corpora lutea, the litter size, the litter weight and the number of resorptions. Copulation rate (number of females with sperm in the smear/number of mated females in the group) x 100). Fertility rate (number of pregnant females/number of copulated females) x 100). Pre-implantation loss rate (number of corpora lutea - number of implants/number of corpora lutea) x 100) and post-implantation loss rate (number of implants - number of fetuses/number of implants) x 100) were calculated as described (DAMASCENO, 2008; VIEL et al., 2017). The evaluation of fitotoxicity was performed based on a analysis of fetal external morphology with a stereomicroscope (Carl Zeiss, Citoval 2, Germany).

The results were analyzed using a Students t-test or a Mann-Whitney non-parametric test. The results were considered significant when $p < 0.05$.

Clatogenicity/Aneugenicity in human lymphocytes

Collection of lymphocytes

Lymphocytes were obtained from human blood as approved by the Ethics Committee of the Assis Faculty of Sciences and Letters of Assis (UNESP – SP, Brazil), No. 833386. The blood was collected from healthy volunteers aged between 18 and 25 years that were not using drugs, tobacco or

VIEL, A. M. et al.

alcohol. Blood was collected from the antecubital vein between 7:00 and 10:00 am in heparinized tubes and under sterile conditions. The material was processed within 4 h of collection.

Lymphocyte isolation of whole blood

Whole blood collected was homogenized by inversion and diluted with saline RPMI with unsupplemented culture for experiments performed in cell culture in the proportion of 1:1 (v/v). The diluted blood (7 mL) was added slowly into a centrifuge tube containing 3 mL of Ficoll-Paque TM Plus and centrifuged for 30 min at 1,000 rpm and refrigerated at 4 °C. Then, the lymphocyte cloud was removed with a Pasteur pipette and washed 2 times with RPMI 1640 medium.

Culture of human lymphocytes

The culture was performed according (TITENKO-HOLLAND et al., 1997; FAREED; AFZAL; SIDDIQUE, 2011) with an initial density of 10^6 cells in 2 mL of culture medium. Then, the lymphocytes were cultured. Culture medium consisted of RPMI 1640 supplemented with 15% fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine, 100 units mL^{-1} of penicillin, 100- $\mu\text{g mL}^{-1}$ of streptomycin and 1.5% phytohemagglutinin.

Treatment conditions

For each individual 5 culture vials were mounted followed by 8 h of incubation at 37 °C with the addition ethanolic extract of *P. venusta* at a concentration of 50, 100 or 200 mg mL^{-1} . Two culture flasks were reserved for the positive control (50 mg mL^{-1} of cyclophosphamide) and the negative control (without a test substance).

Micronucleus assay

After 48 h of incubation, 0.2 mL of cytochalasin B was added to 5mL of medium to prevent cytokinesis of the dividing cells. After 72 h the culture was stopped with 0.5 mL of methanol-acetic acid fixative (3:1) for 5 min at room temperature. The material was centrifuged at 800 rpm, discarding the supernatant. Next, 5 mL of fixative was added with stirring, and then the material was centrifuged. This procedure was repeated 3 to 4 times until the precipitate remained clean. The material was dripped onto slides, allowed to dry at room temperature, and then stained with Giemsa at a ratio of 1:3 in phosphate buffer (pH = 6.8) for 5 to 8 min.

The slides were examined in a blind condition. For each individual in the sample two blades were selected and MN (micronucleus) was recorded for 1,000 bi-nucleated cells (500 per replicate/blade). The evaluation/cell count of MN

Toxicological, genotoxic...

followed the criteria according (FENECH et al., 2003), such that the chromatin structure and similar refractions between nucleus were evaluated, the cytoplasm was well preserved, the staining intensity was similar between nucleus, the definition of the nuclear contours were oval or round in shape, there were no links to the main nucleus, and the diameter was between 1/3 and 1/16 of the average diameter of the main core corresponding to 1/256 and 1/9 of an area of a nucleus of a main bi-nuclear cell.

Significant differences between the controls and treated samples were determined with the Fisher exact test for MN frequencies and with the Chi-square test.

Antimutagenic assay

Micronucleus test in mice bone marrow

Antigenotoxic effects of the extract of *P. venusta* on cyclophosphamide-induced micronucleus in mice was tested using 7-week to 12-week old male Swiss albino mice (*Mus musculus* Rodentia, Muridae) weighing 25-35 g. The mice were provided by the central bioterium (Instituto de Biociências/UNESP/Botucatu) and acclimatized in cages at 24 ± 1 °C under a 12 h light period for one week. During acclimatization and throughout the experiments the mice had free access to standard granulated chow and drinking water. Each cage contained 5 mice that were randomly assigned to 1 of the 4 following groups: 1) a negative control group that was given distilled water by oral gavage; 2) a positive control group that was given a single intraperitoneal injection of the equivalent of 0.2 mg per 100 g of body weight (bw) of cyclophosphamide (CAS n.50-18-0; Endoxan, Baxter Oncology Gmb, Germany) dissolved in distilled water; a extract group that was given the equivalent of 50 mg, 100 mg or 200 mg per kg bw during 7 days by oral gavage. However, on the seventh day, the mice also received the same treatment as the positive control group.

All mice were killed by cervical dislocation on day 8. This study conforms to the relevant Brazilian guidelines regarding the ethical use of live animals. Genotoxic effects were evaluated in the mouse bone marrow by the micronucleus test (BAESSE et al., 2015). Immediately after sacrifice the mice both femurs were removed from each mouse and the bone marrow flushed out into centrifuge tubes containing 2 mL of fetal calf serum at 1,000 revolutions per min for 10 min, after which the supernatant was discarded and the pellet resuspended in a drop of serum, and a smear was made on a clean slide. The smear was air-dried,

VIEL, A. M. et al.

fixed with absolute methanol for 5 min, then air-dried and either stored at room temperature or directly stained for 5 min with a freshly prepared working solution of Giemsa stain diluted 1:1 v/v in 0.06 M of sodium phosphate buffer and 0.06 M of potassium phosphate buffer (both at pH 6.8). After staining, the slides were rinsed in distilled water, dried at room temperature and scored for micronucleus according to the criteria of Krishna and Hayashi (2000) using 100X magnification and a Carl Zeiss optical microscope. We scanned 2000 polychromatic erythrocytes (PCE) per mouse and recorded the number of micronucleated PCE (MNPCE).

To compare the frequencies of MNPCE and normal PCE between treated and control groups the results were expressed as the mean ± standard deviation and analyzed statistically using the nonparametric Mann-Whitney U-test with the significance level set at $\alpha = 0.05$. The statistical analyses were carried out using the SPSS 12.0 statistical package for PCs (SPSS, Chicago, IL).

Antimutagenic test in root cells of *Allium cepa*

Onion bulbs (*A. cepa* L., 2n = 16) were obtained commercially in Assis, São Paulo, Brazil. They were cleaned and the outer scales were removed, leaving the ring intact with primordial roots. The bulbs were used for the bioassay according to standard procedures (BABATUNDE; BAKARE, 2006). The growth of the roots was used a culture solution (Hoagland's solution). The bulbs were kept suspended in a 100-mL beaker leaving the ring of roots in contact with the solution, changed every 24 h for a period of 72 h, and maintained at a photoperiod (18 h/6h light/dark) and temperature (22 ± 2 °C) in controlled chamber B.O.D. Bulbs with roots approximately 2 cm were used in the experiment.

To evaluate the mitotic index-MI, micronucleus-MN and induction of chromosomal aberrations-CA (c-metaphase; chromosome delay; chromosomal bridge; aberrant telophase; nucleolus outside the nucleus; amorphous nucleus), 6 onion bulbs were exposed to each concentration of ethanolic extract (0.1, 5 and 10 mg/mL) of *P. venusta*. Mineral water and positive control solution of MMS (methyl methanesulfonate) at 10 mg/L was used for the negative control, as described (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). At the end of 48 h of exposure and 24 h recovery in culture solution, the roots of treated and control bulbs were cut and fixed in ethanol: glacial acetic acid (3:1, v/v). These were hydrolyzed in 1 N of HCl at 60 °C for 8 min, after which they were rinsed in distilled water. The roots were stained with acetic carmine for 10 min, the tips were

Toxicological, genotoxic...

removed and the roots carefully crushed between slide and coverslip were sealed, as suggested (AKINBORO; BAKARE, 2007). Five slides were prepared for each treatment and controls were analyzed at 1000× magnification. The mitotic index was calculated on the number of dividing cells per 1000 cells observed (FISKESJÖ, 1985; DE CAMPOS VENTURA-CAMARGO; MARIN-MORALES, 2016). The frequency was calculated based on the number of aberrant cells and micronucleus per total cells analyzed for each treatment and controls (BAKARE et al., 2000). The MI, CA e MN obtained were compared with the controls and statistically analyzed using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$), as described (BAKARE et al., 2000).

Antioxidant potential

DPPH radical scavenging activity

The stable 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma, USA) radical scavenging activity was determined according to the methodology proposed (HELM et al., 2008). The dry ethanolic extract of each sample was dissolved in ethanol (75%) at different concentrations (25, 50, 75, 100, 250, 500 and 1,000 $\mu\text{g/mL}^{-1}$) and then mixed with 5 mL of DPPH solution (1.5×10^{-4} M). The extract reacted with the DPPH radical for a period of 30 min in a low luminosity, and then they were submitted to the UV-Vis spectrophotometer (model: SP220, BIOSPECTRO, Brazil) at 517 nm wavelength. The calculation of the antioxidant activity was performed according to the following formula:

$$(I\%) = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Where A_{control} is the absorbance of the control, and A_{sample} is the absorbance of sample, with extract. Triplicates were made to the analyses

Ferric reducing antioxidant power (FRAP test)

The FRAP test was performed as previously described (MANIAN et al., 2008) with some modifications. Up to 2.7 mL of FRAP reagent, freshly prepared was mixed with 270 μL of distilled water and 90 μL of each sample. Then, this mixture was maintained in water bath at 37 °C for 30 min. The FRAP reagent contained 2.5 mL of 10 mM of TPZ solution in 40 mM of HCl, plus 2.5 of 20 mM of $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, plus 25 mL of 0.3-M acetate buffer (pH 3.6). Readings was performed at the absorption maximum (595 nm). Solutions of known Trolox concentration were used for calibration. The final results were expressed as micromole Trolox equivalents (TE) per grams of extract.

VIEL, A. M. et al.

Lipid peroxidation test

For the lipid peroxidation test a source of homogenized egg yolk lipid was used according to the method proposed (PULIDO et al., 2000). In Pirex® screw capped tubes 1,000 μL of homogenized egg yolk was added in 1% (v/v) to saline solution. To this medium 100 μL of different extracts in different concentrations were included, which constituted the different treatment groups. Next, 100 μL of AAPH (2,2-azobis-amidinopropane dihydrochloride, 120 mM) in buffer TBA (Thiobarbituric acid) was added to the samples. Finally TBA buffer at volume of 1.2 mL was added. This mixture was incubated at 37 °C for 30 min. After this period, 300 μL was removed from each tube and transferred to Eppendorf tubes. Then, 600 μL of TCA (trichloroacetic acid) at 15% was added to the Eppendorf tubes, and the tubes were centrifuged at 10,000 g at 4 °C. Then, 500 μL of supernatant from each reaction was transferred to Eppendorf tubes followed by the addition of 500 μL of 0.67% TBA in Milli-Q water. The final mixture was heated in a water bath for 30 min. Afterwards the absorbance was measured at 532 nm.

The antioxidant activity was calculated as the percentage of inhibition of lipid peroxidation, based on the following equation: Inhibition of lipid

$$\text{peroxidation (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

Where A_{control} is the absorbance of the control, and A_{sample} is the absorbance of sample. The concentration of the extract (mg.mL^{-1}) required to inhibit 50% of the lipid peroxidation (IC50) was calculated. The TMP standard curve was prepared from an aqueous solution at a concentration of 2.0 nmol.mL^{-1} . Aliquots of 30, 60, 120 and 180 μL of TMP solution are transferred to glass tubes and the volume was adjusted to 500 μL with distilled water. The solutions were prepared in triplicate.

Relative electrophoresis mobility (REM) test

REM was adapted (HSIEH et al., 2005), bovine serum albumin (BSA, 2 mg/mL) was diluted in PBS (10 mM, pH 7.4) and incubated with Cu^{2+} (2 mM) at 37 °C for 24 h in the presence or absence of the herbal ethanolic extract (1000 $\mu\text{g/mL}$), H_2O_2 (0.25 mM) was used as a positive control for oxidation. Electrophoresis of BSA was performed using polyacrylamide gels (SDS-PAGE). Running gel solution was comprised of 12% acrylamide, and the stacking gel was 5% acrylamide. Proteins were stained with 0.25% Coomassie Blue R-250. The results were

Toxicological, genotoxic...

expressed in the REM in mm using that of native BSA as the base.

Phytochemical compounds

Total phenols and flavonoids quantification

The quantification of total phenols and flavonoids was performed for extract diluted in ethanol concentrations of 25, 50, 75, 100, 250, 500, 1,000, 3,000, 5,000 and 10,000 µg/mL⁻¹. For the determination of total phenols, the Folin-Ciocalteu method was performed. For each 0.5 mL of extract at the different concentrations 5 mL of distilled water was added in addition to 0.25 mL of Folin-Ciocalteu Reagent. After 3 min, 1 mL of saturated Na₂CO₃ solution was added at 10% and the mixture was stored for 1 h. The absorbance was measured at 725 nm using a UV-Vis spectrophotometer (model: SP220, BIOSPECTRO, Brazil). All tests were performed in triplicate and the results were expressed in mg of gallic acid equivalent (AGE) per gram of extract.

Total flavonoid quantification of the extract was determined based on the UV-Vis spectrophotometer and the samples were prepared as described (TODA, 2005), based on the flavonoids complexation with AlCl₃. An aliquot of 250 µL of extract at the different concentrations was mixed with 1.25 mL distilled water and 75 µL NaNO₂ solution at 5%. After 6 min, a 150 µL AlCl₃/H₂O solution at 10% was added. After 5 min, 0.5 mL of a 1 M NaOH solution was added and then the total volume was adjusted by adding 2.5 mL of distilled water. The samples were shaken in a vortex mixer and the absorbance was

VIEL, A. M. et al.

measured at 510 nm. All tests were performed in triplicate and the results were expressed in mg of rutin equivalent (RE) per gram of extract.

Analysis in HPLC

The fingerprint of the crude ethanolic extract of the flowers of *P. venusta* was analyzed using HPLC-ESI-IT-MS (Accela High Speed LC from Thermo Scientific®, coupled to an Accela Thermo Scientific® LCQ Fleet with Ion Trap 3D and ionization by electrospray (Column Phenomenex® Luna C18 (2)). The conditions for HPLC were a 250 mm x 4.6 mm x 5 µm column; a mobile phase with water ultra-pure + formic acid 0.1% (A) and methanol + formic acid 0.1% (B); a gradient of 25% of A to 100% of B in 80 min; an injection volume of 20.0 µL; a column temperature of 25 °C; a flow ratio of 0.8 mL.min⁻¹, λ= 254 nm. FIA-ESI-IT-MSn was in the negative mode.

RESULTS

Evaluation of reproductive toxicity

There was no significant difference (p>0.05) in the water and food consumption and ovarian weight between the two groups (Table 1). The females treated with *P. venusta* had a significant increase (p<0.05) in uterine weight compared to the control females. The estrous cycle was regular during the treatment period, being that the number of estrus phase was similar (p>0.05) in the control and experimental groups (5.0 ± 0.0 and 5.0 ± 0.50, respectively).

Table 1. Water and food consumption and reproductive organs relative weight in the control group (0.5 mL distilled water) and experimental group (*P. venusta*, 100 mg/Kg bw).

Parameters	Control group (n=7)	Experimental group (n=7)
Water consumption ¹ (mL)	241.05 ± 30.94	244.21 ± 25.18
Food consumption ² (g)	128.00 ± 29.50	125.00 ± 29.50
Ovaries weight ¹ (g%)	0.017 ± 0.007	0.021 ± 0.004
Uterus weight ¹ (g%)	0.193 ± 0.048	0.245 ± 0.037*

¹Values express as the mean ± standard deviation. t-Student test. ²Values express as the median ± interquartile deviation. Mann-Whitney test. *p<0.05 in comparison between the groups.

The ovarian histological structure showed that in the control (Figure 1A) and experimental (Figure 1B) groups, there were several corpora lutea and health follicles inserted into a fibrocellular stroma. Comparing the groups, there was no significant difference (p>0.05) in the number of corpora lutea (control, 3.0 ± 3.0 and experimental, 2.5 ± 4.0), growth follicles (control, 2.0 ± 2.0 and experimental, 2.0 ± 1.2), antral follicles (control: 2.0 ± 2.2 and experimental: 2.0 ± 2.0) and atretic follicles (control: 5.0 ± 4.0 and

experimental, 5.0 ± 3.0). Data are expressed as the median and interquartile deviation. The uterus of untreated females (Figure 1C) presented with endometrium composed of loose connective tissue, with many leukocytes scattered throughout the interstitium. Nevertheless, in the females treated with *P. venusta* (Figure 1D), the endometrial stroma exhibited a predominantly fibrous appearance, with leukocytes located mainly in the subepithelial region. In this group, there was an increase in the tissular vascularization and

Toxicological, genotoxic...

vasodilatation. Moreover, a significant decrease ($p < 0.05$) in luminal epithelium height and thickness of the endometrial stroma and perimetrium was observed in the group that received the extract (experimental vs. control: 29.3 ± 8.7 vs. 32.3 ± 9.0 μm ; 256.2 ± 269.0 vs. $424.6 \pm$

VIEL, A. M. et al.

331.4 μm ; 17.3 ± 6.9 vs. 26.4 ± 11.0 μm , respectively). The myometrium thickness was similar ($p > 0.05$) in the control (398.8 ± 170.5 μm) and experimental (360.2 ± 181.7 μm) groups. Data are expressed as the median and interquartile deviation.

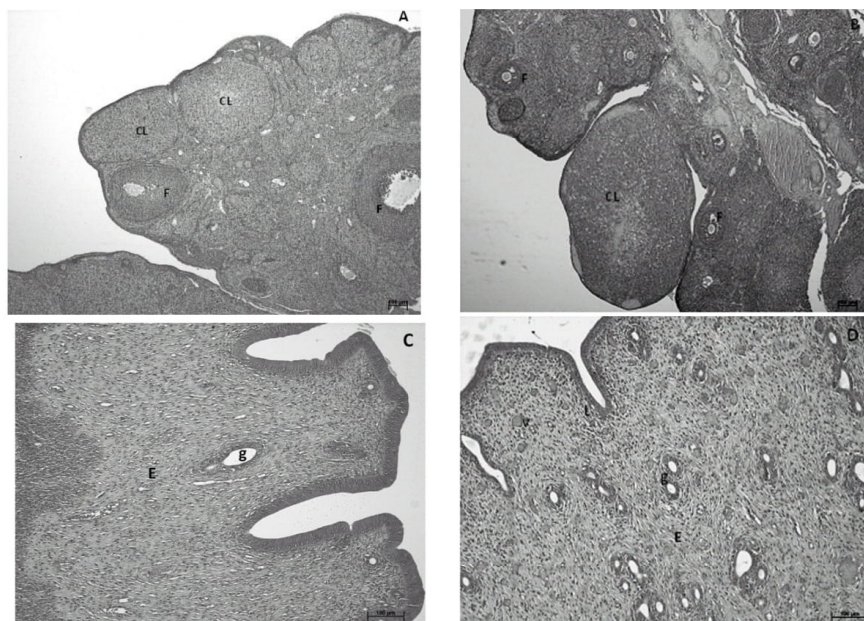


Figure 1. Photomicrographs of the ovarian tissue (A and B) and uterine tissue (C and D). In A and B, observe the similarity of ovaries in the two groups, with corpora lutea (CL) and health follicles (F) in stroma. In C, observe the glands (g) in the endometrium (E). In D, are shows glands (g) and blood vessels (v) inserted in endometrium (E) of fibrous aspect and leukocytes (L) in subepithelial region. Hematoxylin-eosin. Bars = 100 μm .

Table 2 shows that there was no effect of treatment with *P. venusta* extract in maternal and fetal parameters. No external morphologic

anomaly was observed in the fetuses of the experimental group.

Table 2. Evaluation of maternal and fetal parameters.

Parameters	Control group (n=7)	Experimental group (n=7)
Copulation rate (%)	100	100
Fertility rate (%)	71.4	71.4
Body weight of dams (g)	344.0 ± 36.0	350.0 ± 15.0
Gravid uterus weight (g)	44.9 ± 10.0	43.0 ± 7.4
Placentas weight (g)	5.7 ± 0.9	5.9 ± 0.8
Litter weight (g)	21.9 ± 5.4	22.2 ± 3.6
Size litter	13 ± 4	12 ± 2
Pre-implantation loss (%)	0	0
Post-implantation loss (%)	0	0

Values are expressed as median $\pm$ interquartile deviation. Mann-Whitney test. None statistical difference between the groups ($p > 0.05$).

Toxicological, genotoxic...

Clatogenicity/aneugenicity in human lymphocytes

Table 3 shows the micronucleus frequency in bi-nucleated lymphocytes. There were no significant differences between extract treatments, the different concentrations, and the negative control group. Compared to the positive control,

VIEL, A. M. et al.

the extract-treated groups showed a significant difference; the PC presented the highest frequency of micronucleated bi-nucleated lymphocytes (26.17 ± 2.14), as the group treated with 200 mg.Kg⁻¹ bw (highest concentration) showed a frequency of 7.83 ± 2.64 .

Table 3. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes treated with diferents concentrations of *P. venusta* (50mg/Kg - E50, 100mg/Kg - E100, 200mg/Kg - E200).

Treatments	Number of individuals	MN per 1000 binucleated lymphocytes
		Mean±SE(%)
NC	6	5.83±2.40a
E50	6	9.33±1.75a
E100	6	8.33±2.06a
E200	6	7.83±2.64a
PC	6	26.17±2.14b

Means followed by same letter in a column not differ significantly by Mann-Whitney and U-test ($\alpha=0.05$). NC= negative control; PC= positive control (cyclophosphamide).

Antimutagenic assay

Micronucleus test in mice bone marrow

Table 4 shows the results of a micronucleus test in mice bone marrow. The groups treated with different concentrations of extract and cyclophosphamide presented a superior rate of MNPCEs in relation to negative control

(NC = 50.0); however compared to positive control group (PC) treated with only with cyclophosphamide, the extract-treated groups showed a significant decrease in the frequency of MNPCEs. The different treatments with the extracts showed no significant difference between them.

Table 4. Frequency of erythrocytes polychromatics micronucleus (MNPCEs) of bone marrow cells of Swiss mice in experimental groups treated with hydroethanolic extract of *P. venusta* (NC=negative control was distilled water; Animals were treated with the following doses of extract: 50mg/Kg bw (E50), 100mg/Kg bw (E100) and 200mg/Kg bw (E200) or 2mg/Kg bw of cyclophosphamide (PC)).

Treatments	Number of animals	MNPCE per 2000 PCE	
		Nº	Mean ± SD(%)
NC	5	50,0	0,50±2,34a
E50 + PC	5	89,0	0,89±6,46b
E100 + PC	5	76,0	0,76±6,72b
E200 + PC	5	84,0	0,84±4,32b
PC	5	286	2,86 ± 9,01c

Means followed by same letter in a column not differ significantly by Mann-Whitney and U-test ($\alpha=0.05$).

Antimutagenic test in root cells of *Allium cepa*

The *Allium cepa* test results are shown in Table 5. There was a significant decrease in the micronucleus frequency for roots treated with 5.0 mg.mL⁻¹ + MMS (04.4 ± 2.41) compared to other treatments ($0.5 \text{ mg.mL}^{-1} + \text{MMS} = 13.8 \pm 5.89$ and $1.0 \text{ mg.mL}^{-1} + \text{MMS} = 10.2 \pm 3.63$) and controls ($01.0 \pm 1.22 = \text{NC}$ and $\text{PC} = 16.4 \pm 2.30$), revealing a dose-dependent profile. Increasing extract concentrations resulted in a significant decrease in total chromosomal disorders between the two higher concentrations ($0.5 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ MMS} + = 2.92 \pm 0.90$, $1 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ MMS} + = 3.52 \pm 0.66$ and $5 \text{ mg.mL}^{-1} \text{ MMS} + = 2.60 \pm 0.51$). Compared to controls sample the results were higher than the NC (1.72 ± 0.59) and lower than the PC (5.10 ± 1.21).

Toxicological, genotoxic...

VIEL, A. M. et al.

578

Table 5. Total cells with micronuclei and chromosomal disorders in meristem tissue of *Allium cepa* root under different *P. venusta* extract concentrations (Pv) with Metilmetanosulfonato (MMS), negative control (NC) and positive control (PC).

Treatment (mg/mL)	Micronuclei	c-Metaphase	Chromossomic delay	Cromossomic bridge	Telophase Aberrant	Nucleoli out the Nucleus	Amorphous nucleus	Total chromosomal aberrations
NC	01.0 ± 1.22a	5.0 ± 3.16	3.8 ± 0.45	1.8 ± 0.45	0.8 ± 0.8	03.8 ± 3.27	02.0 ± 2.55	1.72 ± 0.59a
Pv(0.5)+MMS(10)	13.8 ± 5.89b	3.6 ± 2.97	0.8 ± 0.84	5.2 ± 0.45	2.0 ± 1.41	12.2 ± 6.87	05.4 ± 1.82	2.92 ± 0.90b
Pv(1.0)+MMS(10)	10.2 ± 3.63b	3.6 ± 1.52	3.0 ± 1.87	3.4 ± 3.00	4.0 ± 0.70	11.6 ± 3.51	09.6 ± 4.83	3.52 ± 0.66b
Pv(5.0)+MMS(10)	04.4 ± 2.41c	3.0 ± 1.22	2.4 ± 1.52	3.6 ± 1.67	2.4 ± 1.82	07.6 ± 1.82	07.0 ± 3.54	4.60 ± 0.51b
PC	16.4 ± 2.30d	5.6 ± 1.34	2.8 ± 1.92	3.2 ± 2.68	2.6 ± 1.52	15.0 ± 3.54	21.8 ± 6.38	5.10 ± 1.21c

* Equal letters to no significant differences (p≥0.05).

Antioxidant potential and total phenols and flavonoids DPPH, FRAP and TBARS, total phenols and flavonoids compounds

Table 6 presents the results of the antioxidant tests (DPPH, FRAP and TBARS) and quantification of total phenols and flavonoids in the *P. venusta* extract. For these tests revealed a dose-

dependency for the antioxidant activity and phenolic content and total flavonoid. The EC₅₀ was calculated for the DPPH and TBARS tests, resulting in concentrations of, respectively, 131.63 µg and 1.038 mg. The FRAP test found 154.00 µM of TE per extract gram in the extract concentration of 1000 µg/mL⁻¹.

Table 6. Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of *P. venusta* extract.

Concentration (µg.mL ⁻¹)	DPPH (%) ^a	FRAP ^b	TBARS (%) ^c	Total Phenols	Total Flavonoids
100	48.90	54.92	6.78	8.42	40.50
250	61.43	98.96	14.56	21.40	65.34
500	63.23	138.00	23.90	37.64	113.25
1000	65.62	154.00	38.34	51.92	190.52

^aAverage values standard deviation of triplicates for test cleaning of DPPH radical scavenging activity; ^bFRAP: ferric reducing power; ^clipoperoxidation inhibition percentage (TBARS (%)).

Relative electrophoresis mobility (REM) test

The electrophoresis gel revealed that there was an extensive BSA protein fragmentation resulting from the combined activity of Cu²⁺ and the extract (Figure 2, lane 3), and fragmentation was

much higher compared to the positive control with only Cu²⁺ and hydrogen peroxide in the acting protein (Figure 2, lane 2) and with only Cu²⁺ and BSA (Figure 2, lane 1).

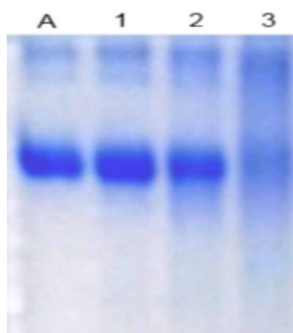


Figure 2. Effect of hydroethanolic extract of *P. venusta* on migration of BSA with PAGE (Incubation period was 24 hours) in oxidative condition. A: Native BSA; 1: BSA with Cu²⁺; 2: BSA with Cu²⁺ and H₂O₂; 3: BSA with Cu²⁺/H₂O₂ and hydroethanolic extract (1000 µg/mL).

Phytochemical analysis using HPL

The analysis of the HPLC-PDA chromatogram of *P. venusta* showed two main peaks at 4.11 min and 31.37 min. Based on the *m/z* values, UV spectra and comparison with the

literature, we can conclude that peak 2 is quinic acid, and peak 3 is the flavonoid diglycoside. Furthermore, we have propose that peak 1 is a myo-inositol derivative (3).

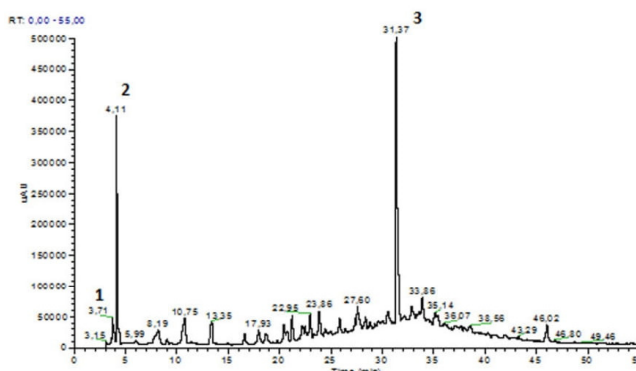


Figure 3. Analytical HPLC-PDA chromatograms at 254 nm of *P. venusta* extract.

Table 7. Tentative identification of compounds in *P. venusta* flowers by LC-PDA, LC-MS and MS/MS data.

Peak	Rt(min)	UV (λ_{max})	[M-H] ⁻	MS/MS ions	Tentative identification
1	3.71	257	179	225, 195	myo-inositol derivative
2	4.11	269	191	173, 127, 85	quinic acid
3	31.37	331, 249	623	461	flavonoid diglycoside

DISCUSSION

P. venusta is widely used in popular culture for treating various diseases (ALTOÉ et al., 2014). There is promising research that aims treat cancer using *P. venusta* (FIGUEIREDO et al., 2014). Moreover, the flowers and roots extracts of this plant contain significant amounts of phytochemicals with antioxidant properties (VELOSO; SILVA, 2010). Thus, the use of this species could possibly expand to include applications in the pharmaceutical and food industry; but for this expansion, and for its current use, it is necessary to establish its safety.

There are several side effects that may be caused by the chemical compounds found in medicinal plants. Among them include changes in water consumption, diet and body weight, and clinical symptoms of piloerection, changes in behavior, tremors, convulsions and even death (FIGUEIREDO et al., 2014). In studies of the antitumor properties associated with phenolic compounds such as flavonoids, (FERNANDES et al., 2010) there was no change in water and food consumption of Wistar rats treated with a phenolic compound concentration of 50 mg.kg⁻¹, as in the present study, treatment of Wistar adult female rats with *P. venusta* did not cause any clinical signs of toxicity.

Female rats treated with isoflavones at concentrations of 3.3 mg/100 mL and 100 mg/100 mL showed a relative weight of the ovaries that was

similar to the control group. But the relative uterine weight was higher in the group treated with isoflavones at 100 mg/100 mL compared to groups treated with 3.3 mg/100 mL and controls (IKAKI et al., 2008). In addition, rats treated with both flavonoid concentrations showed no changes in the estrous cycle or in the number of estrus phase in relationship to the control group. In the present study, the same result was obtained with *P. venusta*, which has a high content of flavonoids. The increase in uterine weight observed in this study probably occurred due to discrete changes observed in the endometrium. Currently, no other report is found in the literature on the effects of *P. venusta* extract on the weight and structure of these reproductive organs.

The *P. venusta* chemical constituents did not promote ovarian toxicity, as gonadal tissue showed similar characteristics to that observed in the control group. A study performed (ROMERO et al., 2008) showed that rats treated with *Ginkgo biloba* (120 mg.Kg⁻¹), which is rich in flavonoids, showed no histopathological change in ovarian tissue. In a experiment with *Tabebuia avellanedae* (ipe-purple), which is in the same Bignoniaceae family as *P. venusta*, (KUNTZE et al., 2012) examined, in rats, the cicatrizing activity of a topical ointment consisting of plant species extracts. Kuntze et al. (2012) highlighted the importance of flavonoids in tissue healing because the phenolic compound promotes neovascularization and

fibroplasia inhibition in inflammatory process, contributing to increased oxygenation and rapid recovery of the injured tissue. This study indicated that the *P. venusta* flavonoids may have contributed to the fibrous endometrial characteristics and the vasodilation observed in the uterus of female rats. These characteristics did not affect endometrial implantation of the egg or embryo development, indicating that the plant does not present toxicity to the embryo or the fetus.

The micronucleus assay with lymphocytes can be efficiently used to measure the cytotoxic and genotoxic effects of different compounds as reactive oxygen species by ionizing radiation (FENECH et al., 2003). Regarding the *P. venusta* clatogenicity/aneugenicity to human lymphocytes, the result was negative, thus it can be considered that the species studied shows low genotoxicity in respect of the formation of the MN of lymphocytes analyzed, which supports the safety of using this species. In cancer patients there is a higher frequency of MN, and there is a correlation between genotoxic agents such as ionizing radiation, cancer on set and MN (GREENROD; FENECH, 2003).

In the micronucleus test in mouse bone marrow, *P. venusta* extract reduced the chances of genetic alterations in the presence of mutagenic compounds. The extract of this species, reduced the formation of micronucleated polychromatic erythrocytes in relation to the controls that showed the mutagen activity of cyclophosphamide. This reduction was similar in all tested concentrations, making this species promising for use in preventing genomic damage because MN in polychromatic erythrocytes (PCE) of mouse bone marrow is a very sensitive measure of the damage caused by chemical mutagens (FENECH, 2002).

Tests of *A. cepa* have a high level of sensitivity in mammals, and thus is suitable to verify chromosome damage and disorders of the mitotic cycle, cytotoxicity, and genotoxicity to a wide variety of compounds, from heavy metals to aromatic compounds (AKINBORO; BAKARE, 2007). In the present study, the results for total chromosomal disorders were similar to those shown for the micronucleus test in mice bone marrow. The number of chromosomal disorders after treatment was lower than that of the positive control. In the same test, regarding the number of micronuclei, unexpectedly, lower concentrations were more effective by inhibiting the formation of micronuclei in the cells analyzed, and the highest contraction (5 mg/mL⁻¹) had a less significant effect. Nonetheless, these results also confirm the results of the previous

experiment on the micronucleus of the mouse bone marrow.

In the DPPH assay, the values achieved with *P. venusta* extract were lower than the values reported previously (ALTOÉ et al., 2014) for *P. venusta* extracts, where the results showed a 94.6% antioxidant activity. The reducing capability of the extract is similar to that described (ROY et al., 2011) in a FRAP test for the extract of *P. venusta* flowers. The results of the FRAP test were lower than that for other species. For example, the value found for the carambola residue was 510.3-μMol/g⁻¹ of dry weight (PEREIRA et al., 2014). In a study conducted by Guo et al. (2003) the reducing power found for the red grape was equivalent to 670.5-μMol.g⁻¹ of dry weight; however the level of the reducing ability of *P. venusta* is still significant, and it can be correlated with the phenolic compounds dosage ($r^2 = 0.9587$). Thus, the test results of FRAP and DPPH confirm that this species has the potential to protect the body from free radicals.

In the work (SHUI; LEONG, 2006) the results obtained with the cyan-carvone, at a concentration of 7.2-μg/mL⁻¹ caused a 72.1% inhibition of lipid peroxidation. The study, (SHUI; LEONG, 2006) examined different flavonoids at a concentration of 15 μM, and quercetin reached more than 60% inhibition lipid peroxidation and rutin showed 8% inhibition. Because they are single compounds, the results obtained using *P. venusta* extract can be considered high, and it is possible to isolate individual compounds. The value of r^2 (0.988) resulting from the correlation between the dosage of compounds and the ability to inhibit lipid peroxidation show a possible dependence.

In the relative mobility test in an electrophoresis gel in the presence of Cu²⁺ and H₂O₂, the extract induced more intense activity that fragmented the BSA protein. Thus, the most prominent action shown in the gel was that the tested extract can present oxidative action under certain conditions. In the work (COSTA et al., 2013), antioxidants tested differently in a similar oxidation system. The antioxidant with the best results was glutathione, which almost completely inhibited oxidation, but only at higher concentrations.

A phytochemical analysis indicated the likely presence of quinic acid, a flavonoid diglycoside and myo-inositol. Similarly, (ROY et al., 2011) was identified these same classes of compounds in extracts from the flowers and roots of *P. venusta*, and also confirmed the antioxidant potential of these compounds.

CONCLUSION

P. venusta extract does not present reproductive toxicity and genotoxic effects. However, the extract of this species showed antigenotoxic and antioxidant potential, possibly due to the different flavonoid compounds present in its extract.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo through a grant (FAPESP: 2011/15430-5).

RESUMO: *Pyrostegia venusta* é geralmente encontrada no crescimento secundário das florestas atlânticas e na savana brasileira. Flores e folhas desta planta são utilizadas em remédios populares para tratar uma grande variedade de doenças, desta forma é importante avaliar a segurança e o potencial antioxidante para estas aplicações. Para tanto, o extrato etanólico das flores foi avaliado com testes toxicológicos, genotóxicos e antioxidantes. A análise toxicológica foi realizada por meio da toxicidade reprodutiva em ratos e a clatogenicidade/aneugenicidade em linfócitos humanos, a genotoxicidade foi estudada por teste de micronúcleo em medula óssea de camundongo. A antimutagenicidade em células da raiz de *Allium cepa*. Os ensaios antioxidantes utilizados foram DPPH, FRAP, TARBS e MRE. O extrato foi analisado em HPLC. A análise toxicológica reprodutiva mostrou que *P. venusta* não tem efeito negativo sobre o nível reprodutivo e celular. No teste do micronúcleo o extrato protegeu as células da ciclofosfamida, um composto mutagênico. O teste de *A. cepa* mostrou que o extrato reduziu as formações dos distúrbios cromossômicos. A atividade antioxidante do extrato foi significativa, exceto no teste REM. A análise fitoquímica mostrou a presença de compostos flavonoides. O extrato de *P. venusta* não apresenta toxicidade reprodutiva e efeitos genotóxicos. No entanto, o extrato desta espécie apresentou potencial antigenotóxico e antioxidante, possivelmente devido aos diferentes compostos flavonoides presentes em seu extrato.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicologia reprodutiva. Citotoxicidade. Oxidação. Mutagênese. Flavonoides. Compostos fenólicos.

REFERENCES

- ALTOÉ, T. D. P.; AMORIM, G. M.; GOMES, J. V. D.; BORGES, A. S.; VALADÃO, I. C.; SILVA, I. V.; RANGEL, L. B. D. A.; VIEIRA, P. C.; JAMAL, C. M.; KITAGAWA, R. R.; BORGES, W. S. *In vitro* antioxidant and cell viability of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers). **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, Mato Grosso do Sul, v. 6, n. 4, p. 215-222, 2014.
- AKINBORO, A.; BAKARE, A. A. Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn. **Journal of Ethnopharmacology**, South Africa, v. 112, p. 470-475, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.04.014>
- BABATUNDE, B. B.; BAKARE, A. A. Genotoxicity screening of wastewaters from Agbara industrial estate, Nigeria evaluated with the Allium test. **Pollution Research**, Germany, v. 25, p. 227-232, 2006.
- BAESSE, C. Q.; TOLENTINO, V. C. M.; SILVA, A. M.; SILVA, A. A.; FERREIRA, G. A.; PANIAGO, L. P. M.; NEPOMUCENO, J. C.; MELO, C. Micronucleus as biomarker of genotoxicity in birds from Brazilian Cerrado. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, United States, v. 115, p. 223-228, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.02.024>
- BAKARE, A. A.; MOSURO, A. A.; OSIBANJO, O. Effect of simulated leachate on chromosomes and mitosis in roots of *Allium cepa*(L.). **Journal of Environmental Biology**, India, v. 21, p. 263-271, 2000.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, United Kingdom, v. 72, p. 722-725, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.056>

Toxicological, genotoxic...

VIEL, A. M. et al.

583

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L. D.; SOUSA, D. P. D.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do composto ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 33, p. 567-575, 2013.

DAMASCENO, D. C. Anomalias Congênitas - Estudos Experimentais. 1. ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2008. 102 p.

DE CAMPOS VENTURA-CAMARGO, B.; MARIN-MORALES, M. A. Micronuclei and chromosome aberrations derived from the action of Atrazine herbicide in *Allium cepa* meristematic cells. **SDRP Journal of Earth Sciences & Environmental Studies**, United States, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2016.

FAREED, M.; AFZAL, M.; SIDDIQUE, Y. H. Micronucleus investigation in buccal mucosal cells among pan masala/gutkha chewers and its relevance for oral cancer. **Biology and Medicine**, India, v. 3, p. 8-15, 2011.

FENECH, M.; CHANG, W. P.; KIRSCH-VOLDERS, M.; HOLLAND, N.; BONASSI, S.; ZEIGER, E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, China, v. 534, n. 1-2, p. 65-75, 2003.

FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. **Drug Discovery Today**, Netherlands, v. 7, p. 1128-1137, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02502-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02502-3)

FERNANDES, E. S.; PINTO, R. M.; REIS, J. E. P.; GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. **Birth Defects Research (Part B): Developmental and Reproductive Toxicology**, United States, v. 89, p. 133-138, 2010.

FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M.; HOUGHTON, P. J.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, p. 42-46, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100010>

FERREIRA, F. I. C.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytotherapy Research**, London, v. 13, p. 397-400, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199908/09\)13:5<397::AID-PTR473>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199908/09)13:5<397::AID-PTR473>3.0.CO;2-#)

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; PEREIRA, F. V.; RABAÇA, A. N.; FARIAS, C. F.; GIROLA, N.; SILVA, R. M. *Pyrostegia venusta* heptane extract containing saturated aliphatic hydrocarbons induces apoptosis on B16F10-Nex2 melanoma cells and displays antitumor activity *in vivo*. **Pharmacognosy Magazine**, Philadelphia, v. 10, n. 38, p. 363-368, 2014. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.133284>

FISKESJÖ G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Germany, v. 102, p. 99-112, 1985. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1985.tb00471.x>

GREENROD, W.; FENECH, M. The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide-and ionizing radiation-induced DNA damage *in vitro*. **Mutagenesis**, United Kingdom, v. 18, p. 119-126, 2003. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.2.119>

GUO, C.; YANG, J.; WEI, J.; LI, Y.; XU, J.; JIANG, Y. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. **Nutrition Research**, Netherlands, v. 23, n. 12, p. 1719-1726, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2003.08.005>

HELM, P. A.; GEWURTZ, S. B.; WHITTLE, D. M.; MARVIN, C. H.; FISK, A. T.; TOMY, G. T. Occurrence and biomagnification of polychlorinated naphthalenes and non- and mono-ortho PCBs in Lake Ontario sediment and biota. **Environmental Science & Technology**, United State, v. 42, p. 1024-1031, 2008.

HSIEH, C. L.; YEN, G. C.; CHEN, H. Y. Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Netherlands, v. 53, p. 6151-6155, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf050707a>

IKAKI, J.; NAGY, T.; LYRA, T.; GONÇALVES, I. D.; QUINCOCES, J. A.; PARDI, P. C. Estudo dos efeitos de compostos fenólicos com atividade antitumoral na ingestão de água, ração e na variação de peso de ratos Wistar. In: **I Jornada de Iniciação Científica e Tecnológica**, São Paulo: Uniban, 2008.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. *In vivo* rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, China, v. 455, p. 155-166, 2000.

KUNTZE, L. B.; KONDO, A. K.; BEZERRA, B. T. S.; PINTO, T.; CAMARGO, I. C. C. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* CA Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, p. 34-42, 2012.

MAGALHÃES, E. A.; JÚNIOR, G. S.; DE CAMPOS, T. A.; SILVA, L. P.; SILVA, R. M. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 20, p. 65-69, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100014>

MANIAN, R.; ANUSUYA, N.; SIDDHURAJU, P.; MANIAN, S. The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 107, p. 1000-1007, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.008>

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, São Paulo, v. 62, p. 609-614, 2002. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400008>

MOHD-FUAT, A. R.; KOFI, E. A.; ALLAN, G. G. Mutagenic and cytotoxic properties of three herbal plants from Southeast Asia. **Tropical Biomedicine**, Malaysia, v. 24, p. 49-59, 2007.

PEDERSEN, T.; PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, United Kingdom, v. 17, p. 555-557, 1968. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0170555>

PEREIRA, A. M. S.; HERNANDES, C.; PEREIRA, S. I.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; PEREIRA, P. S.; TALEB-CONTINI, S. H. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. **Chemico-Biological Interactions**, Netherlands, v. 224, p. 136-141, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.023>

PLOWCHALCK, D. R.; SMITH, B. J.; MATTISON, C. R. Assessment of toxicity to the ovary using follicle quantitation and morphometrics. In: HEINDEL, J.; CHAPIN, R. E. (Ed.). *Methods in Toxicology. Female Reproductive Toxicology*. San Diego: Academic Press Inc., 1993. p. 57-68.

POOL, A. A review of the genus *Pyrostegia* (Bignoniaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, United States, n. 95, p. 495-510, 2008.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Netherlands, v. 48, p. 3396-3402, 2000. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>

ROMERO, V.; DELA CRUZ, C.; PEREIRA, O. Reproductive and toxicological effects of isoflavones on female offspring of rats exposed during pregnancy. **Animal Reproduction**, Netherlands, v. 5, p. 83-89, 2008.

Toxicological, genotoxic...

VIEL, A. M. et al.

585

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, V. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 11, p. 69-77, 2011. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-69>

ROY, P.; AMDEKAR, S.; KUMAR, A.; SINGH, R.; SHARMA, P.; SINGH, V. *In vivo* antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, South Africa, v. 140, n. 1, p. 186-192, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.008>

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, São Paulo, v. 21, p. 135-140, 1998. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041998000200004>

SHUI, G.; LEONG, L. P. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 97, p. 277-284, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.03.048>

SOUSA, M. B.; SILVA JÚNIOR, J. O. C.; BARBOSA, W. L. R.; VALÉRIO, E. S.; LIMA, A. M.; ARAÚJO, M. H.; MUZITANO, M. F.; NAKAMURA, C. V.; MELLO, J. C. P.; TEIXEIRA, F. M. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers Crude Extract and Fractions: Prevention of Dental Biofilm Formation and Immunomodulatory Capacity. **Pharmacognosy Magazine**, India, v. 12, n. Suppl 2, p. S218-S222, 2016.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A. M.; SMITH, M. T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, China, v. 388, p. 85-95, 1997.

TODA, S. Antioxidative effects of polyphenols in leaves of *Houttuynia cordata* on protein fragmentation by copper-hydrogen peroxide *in vitro*. **Journal of Medicinal Food**, United States, v. 8, p. 266-268, 2005. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.266>

VELOSO, H. J. F.; SILVA, A. A. M. Prevalência e fatores associados à obesidade abdominal e ao excesso de peso em adultos maranhenses. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 13, p. 400-412, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2010000300004>

VIEL, A. M.; PEREIRA, A. R.; NERES, W. E.; DOS SANTOS, L.; OLIVA NETO, P.; SOUZA, E. B.; SILVA, R. M. G.; CAMARGO, I. C. C. Effect of *Agave sisalana* Perrine extract on the ovarian and uterine tissues and fetal parameters: comparative interventional study. **International Journal of Public Health**, Switzerland, v. 3, n. 5, p. 129-138, 2017.