



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FERNANDA BELINCANTA BORGHI

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO  
DE FOLHAS DE *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni  
(Lauraceae) COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

---

Londrina  
2013

FERNANDA BELINCANTA BORGHI

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO  
DE FOLHAS DE *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni  
(Lauraceae) COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Diniz

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria da Conceição  
Torrado Truiti

Londrina  
2013

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B732o Borghi, Fernanda Belincanta.  
Obtenção e avaliação de extrato padronizado de folhas de *Nectandra falcatifolia*  
(Nees) Castiglioni (Lauraceae) com atividade antioxidante / Fernanda Belincanta  
Borghi. – Londrina, 2013.  
46f. : il.  
Orientador: Andréa Diniz.  
Coorientador: Maria da Conceição Torrado Truiti.  
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.  
Inclui bibliografia.  
1. Plantas medicinais – Teses. 2. Lauracea – Teses. 3. Antioxidantes – Teses.  
4. Flavonóides – Teses. 5. Estresse oxidativo – Teses. I. Diniz, Andréa. II. Truiti, Maria  
da Conceição Torrado. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da  
Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU 615.89

FERNANDA BELINCANTA BORGHI

**OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE  
FOLHAS DE *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae) COM  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Andréa Diniz  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Décio Sabatini Barbosa  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de março de 2013.

“Quando você dá de si mesmo, você recebe mais do que dá.”  
*Antoine de Saint-Exupéry*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pela vida e saúde que me foi dada, por me proporcionar os meios para que eu pudesse alcançar os meus sonhos...

Agradeço à minha família, à minha irmã Clara Belincanta Borghi, meu pai Altair Moreli Borghi pela torcida incessante e principalmente minha mãe Carmen Ilma Belincanta Borghi pelas ajudas, incentivos e amor infinito...

Agradeço as minhas amigas que moram no meu coração: Mariana Carniel Milliatti, Mirela Fulgêncio Rabito, Lígia Maria Zanin e Ellen Andressa Sotti Barbosa pelo incentivo e pelo ombro amigo, escutando as minhas angústias e me ajudando a permanecer firme nos caminhos...

Agradeço a minha querida amiga Luana Magri Tunin, fiel companheira de mestrado, que muito me ajudou e apoiou, com quem compartilhei muitas angustias, mas também felicidades neste mestrado...

Agradeço ao meu primo Bruno Nanni Alexandrino pelo apoio, torcida e pela eterna parceria...

Agradeço ao Luis Henrique Moreli Pangoni por ter permanecido ao meu lado durante os momentos estressantes desta caminhada, mas principalmente pelo amor, pelo apoio, pela torcida, pela parceria e pela doce companhia...

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho, principalmente a Ana Cláudia Nogueira pela sua ajuda e a sua disposição em ajudar, realmente fez muita diferença no desenvolvimento do meu trabalho. E também agradeço as alunas do professor Décio, que também foram minhas alunas queridas, Luciana Higashi e Kamila Landucci pela ajuda e disponibilidade...

Agradeço ao professor Décio Sabatini Barbosa pela ajuda e por nos permitir uma visita em seu laboratório...

Agradeço a minha co-orientadora Professora Doutora Maria da Conceição Torrado Truiti pela orientação, pela ajuda e por ter disponibilizado seu laboratório e seus materiais para que o trabalho pudesse ser realizado...

Agradeço a minha orientadora Professora Doutora Andrea Diniz pela orientação, amizade e principalmente pelo ser humano maravilhoso e iluminado.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina, a Universidade Estadual de Maringá e a Capes.

BORGHI, Fernanda Belicanta. **Obtenção e avaliação de extrato padronizado de folhas de *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae) com atividade antioxidante.** 2013. 47f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

A espécie vegetal *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae), popularmente conhecida como canelinha, possui flavonoides e neolignananas na sua composição. Flavonoides são substâncias fenólicas conhecidas por sua atividade antioxidante, propriedade de grande interesse no controle do estresse oxidativo. Para o desenvolvimento de um extrato com alta capacidade antioxidante, devem ser testadas diferentes condições extrativas a fim de se obter o melhor resultado. Para isso, delineamentos estatísticos experimentais vêm sendo aplicado com sucesso, e entre as ferramentas o delineamento fatorial. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a melhor condição extrativa para folhas de *Nectandra falcifolia* de modo a obter um extrato com alta capacidade antioxidante. Foram empregados dois planejamentos experimentais sequenciais: o fatorial  $2^3$  e o composto central  $2^2$ . Para o primeiro foram definidas as variáveis tempo de extração (TE), teor de alcoólico (TA) e proporção planta:solvente (PROP). Para o segundo planejamento foram tempo de extração (TE) e proporção planta:solvente em dois níveis e adição de pontos axiais, sendo o teor de alcoólico (TA) fixado em 100%. Todos os extratos foram quantificados quanto aos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH. Os resultados para o planejamento fatorial  $2^3$  mostrou que a melhor extração para atividade antioxidante (AO) foi o extrato produzido nas condições TE 72 horas, TA 100% e PROP 1:20 p / p e para fenólicos totais (FT) foi TE 72 h, TA 100% e PROP 1:10 p / p. A partir desses resultados foi feito um novo planejamento, composto central  $2^2$ , que mostrou que o melhor extrato para FT foi o de TE 82 h e PROP 1:08 p/p, para AO foi o de  $t > 72$  h e  $prop \leq 1:10$ . O extrato foi padronizado de acordo com o melhor resultado antioxidante e teor de fenólicos totais e estes foram analisado quanto a capacidade antioxidante por dois outros métodos, o método do ABTS e o do *Burst* respiratório. Os dados mostraram que a AO para ABTS é semelhante a obtida pelo DPPH, confirmando sua ação e foi positiva também no teste do burst respiratório, que é uma técnica desenvolvida em ambiente celular. O extrato foi caracterizado por espectroscopia fotoacústica e sugere a presença de flavonoides, possivelmente os compostos responsáveis pela AO. Portanto o extrato também foi avaliado quanto ao teor de flavonoides. Sendo assim, o extrato padronizado de *N. falcifolia* foi capaz de exercer ação antioxidante em matrizes celulares, indicando suas potencialidades para utilização com finalidades medicamentosas.

**Palavras-chave:** *Nectandra falcifolia*. Padronização de extrato. Atividade antioxidante. Desenvolvimento. Planejamento experimental.

BORGHI, Fernanda Belicanta. **Collection and evaluation of standardized extract of leaves *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae) with antioxidant activity.** 2013. 47p. Dissertation (Master in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

### ABSTRACT

*Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae) popularly known as “canelinha”, is a plant distributed in many tropical and subtropical regions. Studies show that it possesses anti-inflammatory activity, among many other biological activities. The phytochemical exploration of the leaves of *N. falcifolia* showed the presence of phenolic compounds (flavonoid) and neolignans. Aiming at obtaining a pharmaceutical product containing antioxidant derived from the leaves of *N. falcifolia* a study was conducted using statistical design to establish a more suitable extractive condition for this plant drug. Sequential experimental designs: the 2<sup>3</sup> factorial and central composite 2<sup>2</sup> were used and the extracts were analyzed for their content of phenolic compounds and antioxidant activity by DPPH in validated methodologies. In the 2<sup>3</sup> factorial design the variables studied were: extraction time (TE), ethanol-water mixture (TA) and proportion drug: solvent (PROP). In the compound central TE and 22 were PROP with solvent set at 100% ethanol. By association among the results obtained for a better content of FT and TO, the extract from the leaves of *N. falcifolia* standardized with the best extraction efficiency for phenolic compounds and better antioxidant activity was obtained with liquid alcohol extractor 100% soaking time of 72 hours and plant ratio: solvent ratio of 1:10 w / w). The standardized extract of AO was also evaluated by respiratory burst and ABTS which showed a high radical scavenging ability in a simple and cell environment reaction. The extract was characterized by photoacoustic spectroscopy and suggests the presence of flavonoids, possibly the compounds responsible for AO. So the extract was also evaluated on the content of flavonoids. The use of materials derived from leaves of *N. falcifolia* in pharmaceutical products and cosmetics has great potential and can be exploited.

**Keywords:** *Nectandra falcifolia*. Standardized extract. Antioxidant activity. Standardization. Statistical design.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura.1** - Arranjo experimental da Espectroscopia fotoacústica..... 20

### **ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGUÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA TALANTA**

**Figura 1** - Gráfico de superfície de resposta do delineamento Composto Central 22 para o teor de fenólicos totais para os extratos de *Nectandra falcifolia* ..... 33

**Figura 2** - Gráfico de superfície de resposta obtido do delineamento Central Composto 22 quanto a atividade antioxidante nos extratos de *Nectandra falcifolia*..... 34

**Figura 3** - Gráfico de desejabilidade para o teor de fenólicos totais dos extratos de *Nectandra falcifolia* obtidos pelo delineamento central composto 22..... 35

**Figura 4** - Gráfico de desejabilidade para o delineamento central composto 22 da atividade antioxidante dos extratos de *Nectandra falcifolia*. ..... 36

**Figura 5** - Gráfico de ativação de neutrófilos humanos pelo P.M.A na ausência (neutrófilos controle) ou presença de neutrófilos adicionado com o extrato padronizado e otimizado de *N. falcifolia* nas massas de 20, 30 e 40  $\mu\text{g}$  no volume final de reação do burst respiratório (310 $\mu\text{L}$ ) (n=14)..... 37

**Figura 6** - Perfil espectral do extrato padronizado de *N. falcifolia* obtido por espectroscopia de fotoacústica e o resultado de sua deconvolução gaussiana apresentando os principais comprimentos de onda onde houve absorções na faixa de comprimento de onda testado..... 39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Matriz de delineamento fatorial 23 para o estudo das soluções extrativas de <i>Nectandra falcifolia</i> .....	15
<b>Tabela 2</b> - Matriz de delineamento composto central 22 para o estudo das soluções extrativas de <i>Nectandra falcifolia</i> .....	15

### ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGUÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA TALANTA

<b>Tabela 1</b> - Delineamento fatorial 23 para o estudo das soluções extrativas de <i>Nectandra falcifolia</i> .....	25
<b>Tabela 2</b> - Delineamento composto central 22 para o estudo das soluções extrativas de <i>Nectandra falcifolia</i> .....	25
<b>Tabela 3</b> - Resultados da atividade antioxidante dos extratos de <i>Nectandra falcifolia</i> obtidos pelo delineamento fatorial 23.....	30
<b>Tabela 4</b> - Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos da <i>Nectandra falcifolia</i> obtidos pelo delineamento composto central 22.....	31
<b>Tabela 5</b> - Modelos contendo as respostas geradas e coeficientes de determinação(R <sup>2</sup> ) pelo delineamento composto central 22 para extratos da <i>N. falcifolia</i> .....	31
<b>Tabela 6</b> - Dados ANOVA para o teor de fenólicos totais para o extrato padronizado de <i>N. falcifolia</i> .....	32
<b>Tabela 7</b> - Dados ANOVA para a atividade antioxidante (DPPH) em porcentagem de inibição para o extrato padronizado de <i>N. falcifolia</i> .....	32
<b>Tabela 8</b> - Porcentagem de inibição da atividade do radical ABTS+• pelo extrato padronizado de <i>N. falcifolia</i> nas massas de 20, 30 e 40 µg.....	37
<b>Tabela 9</b> - Comparação de diferentes metodologias antioxidantes contendo porcentagem de inibição e IC <sub>50</sub> para diferentes massas do extrato padronizado de <i>Nectandra falcifolia</i> .....	38
<b>Tabela 10</b> - Resultados das diferentes metodologias testadas para o extrato padronizado de <i>N. falcifolia</i> .....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS.+	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AO	Atividade antioxidante
CPM	Contagens por minuto
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EFA	Espectroscopia de fotoacústica
EROS	Espécies reativas do oxigênio
FT	Teor de fenólicos totais
IC50	Concetração que inibibe em 50%
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Polimorfonucleados
PROP	Proporção planta:solvente
R2	Coefficiente de determinação
RSM	Response surface methodology
TA	Teor alcoólico
TE	Tempo de extração
QL	Quimioluminescência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	12
2.1	OBJETIVO GERAL .....	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	13
3.1	MATERIAL.....	13
3.1.1	Matérias-Prima e Reagentes.....	13
3.1.2	Equipamentos e Acessórios.....	13
3.2	MÉTODOS.....	14
3.2.1	Material Vegetal.....	14
3.2.2	Preparo e Caracterização das Soluções Extrativas .....	14
3.2.3	Estratégia Experimental .....	14
3.2.4	Atividade Sequestradora de Radicais –Ensaio de DPPH .....	16
3.2.5	Atividade Sequestradora de Radicais –Ensaio de ABTS .....	16
3.2.6	Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Burst Respiratório.....	16
3.2.7	Determinação do Teor de Flavonoides Totais.....	18
3.2.8	Determinação do Teor de Fenólicos Totais.....	19
3.2.9	Espectroscopia de Fotoacústica.....	19
<b>4</b>	<b>ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGUÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA TALANTA</b> .....	21
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	44
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de produtos oriundos da biodiversidade brasileira tem aumentado muito nos últimos anos. No entanto, um desafio do mercado que ainda persiste é a oferta de produtos que sejam seguros, eficazes e de qualidade adequada. Entre os produtos de origem vegetal bastante em voga no momento estão os fitocosméticos, que são cosméticos que contém ativos vegetais (ISAAC et al., 2008).

Para se obter um produto com a qualidade desejada, uma série de pesquisas buscando a otimização e padronização dos insumos vegetais ou mesmo dos produtos finais devem ser realizadas. Entre esses estudos pode-se destacar a padronização dos processos envolvidos para a produção de um dado produto farmacêutico que deverá, posteriormente, ter comprovada a sua qualidade e sua eficácia (ISAAC et al., 2008).

A investigação da capacidade antioxidante de materiais vegetais também está em crescimento, e tem buscado avaliar essa atividade para a aplicação na prevenção de danos oxidativos responsáveis por diversos processos degenerativos e também tido como uma das causas do envelhecimento cutâneo (LONNI et al., 2012, ISAAC et al., 2008).

Obter um derivado vegetal com um máximo de atividade e composto ativo costuma ser um processo bastante lento e envolve muitos experimentos (DINIZ, 2007). Em função disso a utilização de ferramentas quimiométricas para otimizar e padronizar sistemas extrativos tem sido cada vez mais empregada. O planejamento fatorial é uma excelente técnica para se chegar a esse objetivo (ARMSTRONG, JAMES, 1996). A análise dos dados pelo método da superfície de resposta (RSM *response surface methodology*) é muito favorável para o desenvolvimento, otimização e melhoria de processos farmacêuticos (ONSEKIZOGLU *et al.*, 2010).

Uma das espécies vegetais nativas no Brasil é a *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae), que é popularmente conhecida como canelinha. O extrato das folhas dessa espécie apresentou atividades biológicas de grande interesse na medicina (MELO et al., 2006; TRUITI et al., 2005; TRUITI et al., 2006) e em suas folhas foram identificadas a presença de compostos fenólicos (flavonóides) e neolignanas (TRUITI, 2004).

Os compostos fenólicos apresentam diversas atividades biológicas, dentre as quais se destaca a capacidade seqüestradora de radicais livres e de inibição da peroxidação de lipídios (HANASAKI et al, 1994) e em função disso, a utilização dessa espécie para a produção de um produto farmacêutico de uso tópico com alta capacidade antioxidante pode ter grande interesse.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar o extrato das folhas da *Nectandra falcifolia* utilizando planejamento estatístico visando a obtenção de insumo farmacêutico com atividade antioxidante.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Nectandra falcifolia* em diferentes condições extrativas estabelecidas por planejamento experimental estatístico;
- Padronizar o método de obtenção do extrato com maior atividade antioxidante;
- Quantificar o teor de fenólicos totais e flavonoides totais no extrato padronizado das folhas de *Nectandra falcifolia*;
- Quantificar a atividade antioxidante no extrato padronizado das folhas de *Nectandra falcifolia* por diferentes métodos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Matérias-Prima e Reagentes

- Ácido gálico (Sigma<sup>®</sup>)
- Álcool etílico absoluto (Synth<sup>®</sup>)
- Álcool metílico grau analítico (F Maia<sup>®</sup>)
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT) (Aldrich<sup>®</sup>)
- Carbonato de sódio anidro P.A. (Neon<sup>®</sup>)
- Cloreto de alumínio grau analítico (Synth)
- 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (Aldrich<sup>®</sup>)
- Folin Ciocalteu (Dinâmica<sup>®</sup>)
- Quercetina (Sigma<sup>®</sup>)

##### 3.1.2 Equipamentos e Acessórios

- Aparelho medidor de pH (Tecnopon<sup>®</sup>, MPA210)
- Balança analítica (Mettler Toledo<sup>®</sup> XS 204)
- Cubeta de polimetacrilato 10 MM (Kartell<sup>®</sup>)
- Espectrofotômetro UV-visível (Varian<sup>®</sup> Cary 50)
- Estufa de secagem e esterilização (Fanen<sup>®</sup>, 315 SE)
- Liofilizador (Christ Alpha<sup>®</sup> 1-4 LD)
- Micropipeta 10-100 µL (Gilson<sup>®</sup>)
- Micropipeta 100-1000 µL (Transferpette<sup>®</sup>)
- Mufla (Fanen<sup>®</sup>)
- Rotaevaporador (Fisatom<sup>®</sup>)

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Material Vegetal

Amostras das folhas da espécie *Nectandra falcifolia* foram coletadas na margem direita do Canal Baía, no Município de Taquaraçu, MS, Brasil. O material foi herborizado e incorporado ao acervo do herbário do Nupélia/Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil (HNUP n°1421). As folhas foram secas, em estufa de ar circulante a 40°C, e moídas em moinhos de facas com diâmetro de malha de 1,6 mm. O controle de qualidade da droga foi executado e avaliado segundo o exigido pela Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010).

### 3.2.2 Preparo e Caracterização das Soluções Extrativas

Os extratos foram produzidos pelo método de maceração simples, em temperatura ambiente, em triplicata, utilizando diferentes teores alcoólicos (100%, 50% e 75%), proporções entre planta:solvente (1:10 p/v, 1:15 p/v e 1:20p/v) e tempos de maceração (24h, 48h e 72h). A combinação entre os parâmetros foi feita inicialmente de acordo com o planejamento experimental fatorial  $2^3$ .

### 3.2.3 Estratégia Experimental

A primeira matriz experimental utilizada foi um delineamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1) com o objetivo de avaliar a influência das variáveis: tempo de extração (TE), teor alcoólico (TA) e proporção droga: solvente (PROP) em 2 diferentes níveis, sendo eles: (-) limite inferior, (+) limite superior e (0) ponto central. Posteriormente, outro delineamento experimental foi aplicado, o composto central  $2^2$  (Tabela 2), onde variáveis analisadas foram tempo de extração (TE) e proporção droga:solvente (PROP), com os níveis (-) limite inferior, (+) limite superior, (0) ponto central,  $(-\alpha)$  ponto axial inferior,  $(+\alpha)$  ponto axial superior. Neste delineamento a variável teor alcoólico foi mantido fixo em 100%.

A análise estatística dos delineamentos experimentais, juntamente com suas respostas foram analisadas pelo software Statistica 7.0<sup>®</sup>.

**Tabela 1** - Matriz de delineamento fatorial  $2^3$  para o estudo das soluções extrativas de *Nectandra falcifolia*.

Solução extrativa	Variável Codificada	Variável Codificada	Variável Codificada	Variável Descodificada	Variável Descodificada	Variável Descodificada
	X1	X2	X3	X1 Proporção droga:solvente(p/v)	X2 Tempo de maceração (h)	X3 Teor alcoólico (% v/v)
1	1,00	1,00	1,00	1:20	72	100
2	1,00	1,00	-1,00	1:20	72	50
3	1,00	-1,00	1,00	1:20	24	100
4	1,00	-1,00	-1,00	1:20	24	50
5	-1,00	1,00	1,00	1:10	72	100
6	-1,00	1,00	-1,00	1:10	72	50
7	-1,00	-1,00	1,00	1:10	24	100
8	-1,00	-1,00	-1,00	1:10	24	50
9	0,00	0,00	0,00	1:15	48	75
10	0,00	0,00	0,00	1:15	48	75

**Tabela 2** - Matriz de delineamento composto central  $2^2$  para o estudo das soluções extrativas de *Nectandra falcifolia*.

Bloco	Variável Codificada	Variável Codificada	Variável Descodificada	Variável Descodificada
	X1	X2	Tempo de maceração(h) X1	Proporção droga:solvente(p/v) X2
1	-1,00	-1,00	24	1:10
1	-1,00	1,00	24	1:20
1	1,00	-1,00	72	1:10
1	1,00	1,00	72	1:20
1	0,00	0,00	48	1:15
2	-1,41421	0,00	14	1:15
2	1,41421	0,00	82	1:15
2	0,00	-1,41421	48	1:08
2	0,00	1,41421	48	1:22
2	0,00	0,00	48	1:15

Os 10 extratos propostos pelo planejamento fatorial  $2^3$ , assim como os outros 10 extratos pelo composto central  $2^2$ , foram preparados em triplicata, desalcoolizados em evaporador rotativo a 40°C e liofilizados. Os extratos obtidos foram submetidos às análises de teor de fenólicos totais, teor de flavonoides e atividade antioxidante pelo método do radical livre estável DPPH.

### 3.2.4 Atividade Sequestradora de Radicais –Ensaio de DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH (EL-MASSRY, 2002), com modificações. Os extratos produzidos com etanol 100% e 75% foram dissolvidos em 5 mL de metanol P.A., os

produzidos com etanol 50% foram dissolvidos em metanol 50% (em água destilada). As análises foram realizadas em triplicata.

Foram realizadas diluições das soluções para obtenção das concentrações de 20, 24, 28, 32, 36, 40 µg de extrato liofilizado/mL. Em seguida 1,0 mL da solução das respectivas concentrações foram adicionadas a 2 mL da solução reagente de DPPH (0,06 mg/mL), protegidos da luz. Após 30 minutos de reação a absorbância foi medida no comprimento de onda de 516 nm. A solução em branco foi composta de 3 mL de metanol P.A. e o negativo de 1 mL de metanol acrescido de 2 mL de solução reagente de DPPH. O grau de inibição foi determinado pela alteração da cor da solução de DPPH. A porcentagem de inibição foi calculada pela equação 1

$$IC\% = \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

(1)

sendo,  $A_0$  a absorbância da solução de DPPH e  $A_1$  a da solução de DPPH na presença das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata e valores de  $IC_{50}$  foram estimados por regressão linear da curva de IC% pelas concentrações testadas.

### 3.2.5 Atividade Sequestradora de Radicais –Ensaio de ABTS

A capacidade antioxidante do extrato padronizado foi avaliada frente ao radical livre  $ABTS^{+\bullet}$ , realizada de acordo com Sánchez-González et al. (2005) (SÁNCHEZ-GONZALEZ et al., 2005). O cátion  $ABTS^{+\bullet}$  foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A solução  $ABTS^{+\bullet}$  foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorbância de 0,7 a 730 nm. Após a adição de 10µL de amostra para 4mL da solução  $ABTS^{+\bullet}$  diluída, as leituras de absorbância a 730 nm foram realizadas após 6 minutos de reação. As massas do extrato utilizadas foram 20,30 e 40 µg, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A capacidade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição da atividade do radical ABTS (IA%), de acordo com a equação 2:

$$IA\% = 100 - \left( \frac{A_{amostra}}{A_{controle}} \right) * 100$$

(2)

onde  $A_{amostra}$  é o valor da absorvância da amostra e  $A_{controle}$  é o valor da absorvância da

solução controle, em ausência de amostra.

### 3.2.6 Avaliação da Atividade Antioxidante Pelo Método de *Burst* Respiratório

As amostras foram obtidas de voluntários sadios do Laboratório de Pós Graduação da Universidade Estadual de Londrina, no mesmo momento da realização dos experimentos. Para a realização dos testes foram colhidos por punção venosa aproximadamente 15 ml de sangue em tubos com vácuo (Vacutainer<sup>®</sup>), contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O tipo sanguíneo (ABO e Rh) não interfere na metodologia.

A contagem de neutrófilos foi executada. Para isso, o isolamento dos neutrófilos a partir do sangue total foi efetivado seguindo uma adaptação do procedimento descrito por Freitas (2008). O laboratório foi climatizado em 22°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Todos os reagentes encontravam-se a temperatura ambiente. Em um tubo cônico de 12 mL foi adicionado, respectivamente, 2,0 mL de Histopaque 1.119 e 2,0 mL de Histopaque 1,077, lentamente para que se formassem duas camadas distintas. Em seguida, 6 mL de sangue total foi adicionado pela parede do tubo para que não se misturasse ao Histopaque. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 1.000 rpm e 22°C. Em seguida, a interface de neutrófilos foi retirada cuidadosamente utilizando uma pipeta tipo Pasteur e transferidos para um tubo cônico limpo. Acrescentou-se à suspensão de células o dobro do seu volume de PBS com glicose e albumina. Após lenta homogeneização, submeteu-se o tubo a centrifugação, por 10 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-suspendido novamente com o dobro de volume em PBS e centrifugado, desta vez por 1 minuto a 1.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, a lise de hemácias foi realizada utilizando água destilada e inversão lenta do tubo por aproximadamente 30 segundos. Por fim, cerca de 3 mL de PBS foi adicionado e o tubo centrifugado por 1 minuto a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspendido com PBS até completar 1 mL.

A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas utilizando a técnica de exclusão por trypan blue, visualizado em câmara de Neubauer no microscópio óptico (40x). Para isso, 10  $\mu\text{L}$  de células foram adicionados a 240  $\mu\text{L}$  de trypan blue. Em seguida, a contagem foi realizada no quadrante central da câmara e a viabilidade avaliada em toda câmara. As células incolores foram consideradas viáveis e as azuis (que permitiram a entrada do corante) foram consideradas não-viáveis. Conhecendo a concentração da solução, foi possível ajusta-la para  $2,5 \times 10^6$  células/mL.

Para a quantificação do *burst* respiratório a medida deste foi realizada no dia do isolamento dos neutrófilos (dia da coleta de sangue) por quimiluminescência (QL). A intensidade da quimiluminescência (fluxo de fótons) é diretamente proporcional à taxa de produção de radicais livres, sendo, portanto, uma medida direta da atividade da oxidase (WYMANN et al., 1987).

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca (Victor X-3, Perkin Elmer, EUA), em um modo de contagem não coincidente por 60 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm.

Para o ensaio controle, na microplaca, em cada poço foram adicionados 200  $\mu$ L de neutrófilos, seguido de 50  $\mu$ L de luminol 20mM, 50  $\mu$ L de PMA 5  $\mu$ M. Após homogeneização, submeteu-se a solução a leitura, com um tempo de contagem de 60 minutos e temperatura de 30°C ( $\pm 1,0^\circ$ C). Os testes foram realizados, pelo menos, em quatorze repetições. A quantificação foi feita em contagens por minuto.

Para o ensaio teste com o extrato, foi repetido o mesmo procedimento do ensaio controle, adicionando 10  $\mu$ L do extrato ao meio de reação.

Para o extrato da *Nectandra falcifolia*, as concentrações testadas foram: 20, 30 e 40  $\mu$ g/mL. Os resultados foram avaliados de acordo com os valores dos picos das curvas cinéticas e apresentados na forma de quartis (1° e 3°).

### 3.2.7 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais nos extratos liofilizados foi determinado segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição (2000) (monografia da *Calendula officinalis* L.- ASTERACEA) (BRASIL, 2000), com modificações. Pesou-se 5 mg do extrato liofilizado de *N. falcifolia* e este foi colocado em um balão de fundo redondo, adicionado de 100  $\mu$ L de solução aquosa de urotropina 0,5%, 2 ml de acetona R e 0,2 ml de ácido clorídrico R. Foi aquecido em manta, sob refluxo, durante 30 minutos. A solução foi transferida para funil de separação, adicionou-se 2ml de água e porções de 2mL de acetato de etila R. Da fração acetato obtida foi transferido 2 ml adicionado de 0,2ml do reagente de cloreto de alumínio 2%, diluindo-se todos os reagentes em 5ml (balão de 5 ml) com solução metanólica de ácido acético 5%. Após 30 minutos mediu-se a absorbância da amostra a 422 nm. O teor de flavonóides totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com quercetina e expressos como miligrama de equivalente

quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.2.8 Determinação do Teor de Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método de Souza et al. (2007), com modificações. Foram dissolvidos 20 mg de extrato liofilizado de *N. falcifolia* em 5mL metanol P.A. Em um balão volumétrico de 10 mL, foi então adicionados 200 µL desta última solução, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu com e 6 mL de água destilada, agitou-se por 1 min; passado este tempo foi acrescentado 2 mL de bicarbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 15%, agitou-se por 30 s, então o volume foi completado para 10 mL com água deionizada. Após 2h, a absorbância foi lida a 760 nm, à temperatura ambiente, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. A curva de calibração foi construída nas mesmas condições, tendo o ácido gálico como marcador. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico e expressos como miligrama de equivalente ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

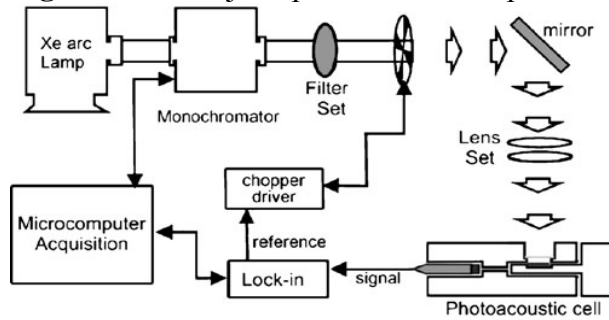
Todos os métodos analíticos foram validados segundo a Resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003), de acordo com os parâmetros linearidade, precisão, robustez, exatidão, limite de quantificação e detecção.

### 3.2.9 Espectroscopia de Fotoacústica

O extrato liofilizado de *N. falcifolia* padronizado foi submetido análise por espectroscopia fotoacústica, para verificar a região espectral de absorção de seus componentes entre 200 e 800 nm, a fim de determinar os componentes principais contidos no extrato. A medida foi realizada usando um arranjo experimental (figura 1). A luz monocromática é obtida de uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel, modelo 68820), com potência de 1.000 Watts (W) e emissão no intervalo entre 180 e 4.000 nm, e monocromador (Oriel, modelo 77250). A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico (Stanford Research Systems, modelo SR 540). A célula fotoacústica é feita com o mínimo volume. O microfone (Brüel & Kjaer, modelo BK 2669) acoplado à célula fotoacústica está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sintonizado) (EG & G Instruments, modelo 5110). O

Lock-in fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB. Os espectros fotoacústicos obtidos para diferentes frequências de modulação de luz (de 13 a 60 Hz) foram registrados entre 200 e 800 nm.

**Figura 1** - Arranjo experimental da Espectroscopia fotoacústica



**Fonte:** MELO et al., 2011.

#### 4 ARTIGO NA VERSÃO EM PORTUGUÊS PARA SER SUBMETIDO À REVISTA TALANTA

### PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Nectandra falcifolia* COM ELEVADA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO DELINEAMENTO FATORIAL

Fernanda Belincanta Borghi<sup>1\*</sup>, Luana Magri Tunin<sup>2</sup>; Fabio Yamashita<sup>1</sup>, Ana Claudia Nogueira<sup>2</sup>; Luciana Higashi<sup>1</sup>, Kamila Landucci<sup>1</sup>, Décio Sabatini Barbosa<sup>1</sup>, Maria da Conceição Torrado Truiti<sup>2</sup>, Andrea Diniz<sup>1</sup>.

#### Resumo

A espécie vegetal *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae), popularmente conhecida como canelinha, possui flavonoides e neolignananas na sua composição. Flavonoides são substâncias fenólicas conhecidas por sua atividade antioxidante, propriedade de grande interesse no controle do estresse oxidativo. Para o desenvolvimento de um extrato com alta capacidade antioxidante, devem ser testadas diferentes condições extrativas a fim de se obter o melhor resultado. Para isso, delineamentos estatísticos experimentais vêm sendo aplicado com sucesso, e entre as ferramentas o delineamento fatorial. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo estudar a melhor condição extrativa para folhas de *Nectandra falcifolia* de modo a obter um extrato com alta capacidade antioxidante. Foram empregados dois planejamentos experimentais sequenciais: o fatorial  $2^3$  e o composto central  $2^2$ . Para o primeiro foram definidas as variáveis tempo de extração (TE), teor de alcoólico (TA) e proporção planta:solvente (PROP). Para o segundo planejamento foram tempo de extração (TE) e proporção planta:solvente em dois níveis e adição de pontos axiais, sendo o teor de alcoólico (TA) fixado em 100%. Todos os extratos foram quantificados quanto aos teores de fenólicos totais e atividade antioxidante por DPPH. Os resultados para o planejamento fatorial  $2^3$  mostrou que a melhor extração para atividade antioxidante (AO) foi o extrato produzido nas condições TE 72 horas, TA 100% e PROP 1:20 p / p. Para fenólicos totais (FT) o melhor extrato foi o produzido com TE 72 h, TA 100% e PROP 1:10 p / p. A partir desses resultados foi feito um novo planejamento, composto central  $2^2$ , que mostrou que o melhor extrato para FT foi o de TE 82 h e PROP 1:08 p/p, para AO foi o de  $t > 72$  h e o de menor proporção prop  $\leq 1:10$ . O extrato foi padronizado de acordo com o melhor resultado antioxidante e teor de fenólicos totais e estes foram analisado quanto a capacidade antioxidante por dois outros métodos, o método do ABTS e o do *Burst* respiratório. Os dados mostraram que a atividade antioxidante para ABTS é semelhante a obtida pelo DPPH, confirmando sua ação e foi positiva também no teste do burst respiratório, que é uma técnica desenvolvida em ambiente celular. O extrato foi caracterizado por espectroscopia fotoacústica e sugere a presença de flavonóides, possivelmente os compostos responsáveis pela AO. Portanto o extrato padronizado também foi avaliado quanto ao teor de flavonoides. Sendo assim, o extrato padronizado de *Nectandra falcifolia* foi capaz de exercer ação antioxidante em matrizes

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001, BR-86051-970, Londrina, PR, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Estadual de Maringá, BR-87020-900, Maringá, PR, Brasil

\* [adinizbe@gmail.com](mailto:adinizbe@gmail.com)

celulares, indicando suas potencialidades para utilização com finalidades medicamentosas.

**Palavras-chave:** *Nectandra falcifolia*. Padronização de extrato. Atividade antioxidante. Desenvolvimento. Planejamento experimental.

### **Destaques**

- Padronização das condições extrativas para obtenção do extrato bruto das folhas de *Nectandra falcifolia* com elevada atividade antioxidante utilizando delineamentos experimentais sequenciais (fatorial  $2^3$  e composto central  $2^2$ ).
- Avaliação da capacidade antioxidante do extrato padronizado obtido por diferentes metodologias

### **Introdução**

Atualmente, muitos estudos são conduzidos visando investigar a capacidade antioxidativa de materiais vegetais e seus derivados. Os trabalhos buscam a obtenção de produtos que previnam os danos oxidativos celulares, causadores de envelhecimento e de diversos processos degenerativos responsáveis de doenças [1], em função de acelerar o processo de envelhecimento e levar ao mal funcionamento celular ou até mesmo a morte das mesmas.

A espécie vegetal *Nectandra falcifolia* (Nees) Castioglioni (Lauraceae), popularmente conhecida como canelinha [2] é distribuída em diversas regiões tropicais e subtropicais do planeta, predominantemente no sudoeste da Ásia e no Brasil. Estudos mostraram que extrato obtido dessa espécie apresentou atividade antiinflamatória [3-5] e a avaliação fitoquímica das folhas de *N. falcifolia* mostrou a presença de compostos das classes flavonoides e neolignananas [3], possivelmente responsáveis pela referida atividade.

As substâncias fenólicas, entre elas os flavonoides, apresentam conhecidas e diversas atividades biológicas, dentre as quais se destaca a atividade antioxidante por sequestrar os radicais livres bem como pela inibição da peroxidação de lipídios [6].

Muitos são os testes empregados para avaliar a atividade antioxidante de produtos e essa diversidade dificulta a comparação de desempenho dessa atividade entre produtos. Algumas das técnicas mais descritas na literatura para a determinação da capacidade antioxidante são os ensaios que se baseia no sequestro de radicais, como o ensaio do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), baseado na habilidade de sequestro deste radical livre [7,8]; o

ensaio do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), cujo radical sequestrado é o ABTS•+ [9,10].

Além dos ensaios baseados na reação de oxido-redução sem envolvimento de sistemas biológicos, o *burst respiratório*, que é uma técnica mais complexa, avalia a capacidade antioxidante de um produto em ambiente celular. Baseia-se na ativação de neutrófilos isolados de sangue humano tratados com o anticoagulante, cuja ativação dos neutrófilos é induzida por acetato miristato forbol (PMA). A medida do burst é realizada por quimiluminescência, pela monitorização da oxidação do luminol por espécies reativas geradas pelos neutrófilos [11].

Além da variabilidade nos ensaios de atividade antioxidante, há diversos sistemas extrativos empregados para a obtenção de produtos de origem vegetal e sua eficiência para a extração de compostos fenólicos é variada [12,13]. Os solventes mais usados para a obtenção de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, e propanol sozinhos ou de forma combinada [14]. Entretanto, não existe um sistema único e satisfatório para a extração completa de todos os compostos fenólicos, ou mesmo para classes específicas. Portanto, torna-se necessário a utilização de um ou mais solventes para que a eficiência extrativa de um grupo de compostos seja atingida [14].

Em função dessas variações nos processos produtivo e analítico de um extrato vegetal, a primeira etapa para o desenvolvimento de um produto de origem vegetal com utilização biológico-farmacêutica deve ser a padronização de soluções extrativas vegetais [15]. Com esse intuito, a metodologia da superfície de resposta (RSM *response surface methodology*) tem sido uma ferramenta muito útil para o desenvolvimento, otimização e melhoria de processos, e muito utilizada para avaliar a relação entre as respostas de uma ou mais variáveis e de um conjunto de variáveis experimentais quantitativas em um mesmo desenho experimental [16, 25, 26].

O objetivo do trabalho foi desenvolver e padronizar um sistema extrativo para folhas de *N. falcifolia* visando obter um produto com alta capacidade antioxidante.

## **Material e métodos**

### **Material**

Amostras das folhas da espécie *Nectandra falcifolia* foram coletadas na margem direita do Canal Baía, no Município de Taquaraçu, MS, Brasil. O material foi

herborizado e incorporado ao acervo do herbário do Nupélia/Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil (HNUP nº1421). As folhas foram secas, em estufa de ar circulante a 40°C, e moídas em moinhos de facas com diâmetro de malha de 1,6 mm. O controle de qualidade da droga foi executado e avaliado segundo o exigido pela Farmacopéia Brasileira [17].

#### Preparo e caracterização das soluções extrativas

Os extratos foram produzidos pelo método de maceração simples, em temperatura ambiente, em triplicata, utilizando diferentes teores alcoólicos (50%, 75% e 100%), proporções entre planta:solvente (1:10 p/v, 1:15 p/v e 1:20 p/v) e tempos de maceração (24 h, 48 h e 72 h). A combinação entre os parâmetros foi feita inicialmente de acordo com o planejamento experimental fatorial  $2^3$ .

#### Planejamento experimental

A primeira matriz experimental utilizada foi um delineamento fatorial  $2^3$  (Tabela 1) com o objetivo de avaliar a influência das variáveis: tempo de extração (TE), teor alcoólico (TA) e proporção droga: solvente (PROP). Posteriormente, outro delineamento experimental foi aplicado, o composto central  $2^2$  (Tabela 2), onde variáveis analisadas foram tempo de extração (TE) e proporção droga:solvente (PROP). Neste delineamento a variável teor alcoólico foi mantido fixo em 100%.

A análise estatística dos delineamentos experimentais foi, realizada utilizando o programa Statistica 7.0<sup>®</sup>.

**Tabela 1** - Delineamento fatorial  $2^3$  para o estudo das soluções extrativas de *Nectandra falcifolia*.

Solução extrativa	Variável			Variável Codificada		
	X1 Proporção droga:solvente (p/v)	X2 Tempo de maceração (h)	X3 Teor alcoólico (% v/v)	X1	X2	X3
1	1:20	72	100	1	1	1
2	1:20	72	50	1	1	-1
3	1:20	24	100	1	-1	1
4	1:20	24	50	1	-1	-1
5	1:10	72	100	-1	1	1
6	1:10	72	50	-1	1	-1
7	1:10	24	100	-1	-1	1
8	1:10	24	50	-1	-1	-1
9	1:15	48	75	0	0	0
10	1:15	48	75	0	0	0

**Tabela 2** - Delineamento composto central  $2^2$  para o estudo das soluções extrativas de *Nectandra falcifolia*.

Bloco	Variável		Variável Codificada	
	X1 Tempo de maceração(h)	X2 Proporção droga:solvente (p/v)	X1	X2
1	24	1:10	-1,00	-1,00
1	24	1:20	-1,00	1,00
1	72	1:10	1,00	-1,00
1	72	1:20	1,00	1,00
1	48	1:15	0,00	0,00
2	14	1:15	-1,41	0,00
2	82	1:15	1,414	0,00
2	48	1:08	0,00	-1,41
2	48	1:22	0,00	1,41
2	48	1:15	0,00	0,00

Os 10 extratos propostos pelo planejamento fatorial  $2^3$ , assim como os outros 10 extratos pelo composto central  $2^2$ , foram preparados em triplicata, desalcoolizados em evaporador rotativo a 40°C e liofilizados. Os extratos obtidos foram submetidos à análise de atividade antioxidante pelo método do radical livre estável DPPH e ao teor de fenólicos totais.

#### Atividade sequestradora de radicais –Ensaio de DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH [18], com modificações. Os extratos

produzidos com etanol 100% e 75% foram dissolvidos em 5 mL de metanol P.A., os produzidos com etanol 50% foram dissolvidos em metanol 50% (em água destilada). As análises foram realizadas em triplicata.

Foram realizadas diluições das soluções para obtenção das concentrações de 20, 24, 28, 32, 36, 40 µg de extrato liofilizado/mL. Em seguida 1,0 mL da solução das respectivas concentrações foram adicionadas a 2 mL da solução reagente de DPPH (0,06 mg/mL), protegidos da luz. Após 30 minutos de reação a absorbância foi medida no comprimento de onda de 516 nm. A solução em branco foi composta de 3 mL de metanol P.A. e o negativo de 1 mL de metanol acrescido de 2 mL de solução reagente de DPPH. O grau de inibição foi determinado pela alteração da cor da solução de DPPH. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação 1

$$IC\% = \left( \frac{A_0 - A_1}{A_0} \right) * 100$$

(1)

sendo,  $A_0$  a absorbância da solução de DPPH e  $A_1$  a da solução de DPPH na presença das amostras. Os ensaios foram realizados em triplicata e valores de  $IC_{50}$  foram estimados por regressão linear da curva de IC% pelas concentrações testadas.

#### Atividade sequestradora de radicais –Ensaio de ABTS

A capacidade antioxidante do extrato padronizado foi avaliada frente ao radical livre  $ABTS^{+\bullet}$ , realizada de acordo com Sánchez-González et al. (2005) [10]. O cátion  $ABTS^{+\bullet}$  foi produzido reagindo 7 mM da solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A solução  $ABTS^{+\bullet}$  foi diluída com tampão fosfato (pH 7,4) para uma absorbância de 0,7 a 730 nm. Após a adição de 10µL de amostra para 4mL da solução  $ABTS^{+\bullet}$  diluída, as leituras de absorbância a 730 nm foram realizadas após 6 minutos de reação. As massas do extrato utilizadas foram 20,30 e 40 µg, diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). A capacidade antioxidante foi calculada pela porcentagem de inibição da atividade do radical ABTS (IA%), de acordo com a equação 2:

$$IA\% = 100 - \left( \frac{A_{amostra}}{A_{controla}} \right) * 100$$

(2)

onde  $A_{\text{amostra}}$  é o valor da absorvância da amostra e  $A_{\text{controle}}$  é o valor da absorvância da solução controle, em ausência de amostra.

#### Avaliação da atividade antioxidante pelo método de *Burst* respiratório

As amostras foram obtidas de voluntários sadios do Laboratório de Pós Graduação da Universidade Estadual de Londrina, no mesmo momento da realização dos experimentos. Para a realização dos testes foram colhidos por punção venosa aproximadamente 15 mL de sangue em tubos com vácuo (Vacutainer<sup>®</sup>), contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O tipo sanguíneo (ABO e Rh) não interfere na metodologia.

A contagem de neutrófilos foi executada. Para isso, o isolamento dos neutrófilos a partir do sangue total foi efetivado seguindo uma adaptação do procedimento descrito por [19]. O laboratório foi climatizado em 22°C ( $\pm 0,5^\circ\text{C}$ ). Todos os reagentes encontravam-se a temperatura ambiente. Em um tubo cônico de 12 mL foi adicionado, respectivamente, 2,0 mL de Histopaque 1,119 e 2,0 mL de Histopaque 1,077, lentamente para que se formassem duas camadas distintas. Em seguida, 6 mL de sangue total foi adicionado pela parede do tubo para que não se misturasse ao Histopaque. O tubo foi centrifugado por 30 minutos a 1.000 rpm e 22°C. Em seguida, a interface de neutrófilos foi retirada cuidadosamente utilizando uma pipeta tipo Pasteur e transferidos para um tubo cônico limpo. Acrescentou-se à suspensão de células o dobro do seu volume de PBS com glicose e albumina. Após lenta homogeneização, submeteu-se o tubo a centrifugação, por 10 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi re-suspendido novamente com o dobro de volume em PBS e centrifugado, desta vez por 1 minuto a 1.000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, a lise de hemácias foi realizada utilizando água destilada e inversão lenta do tubo por aproximadamente 30 segundos. Por fim, cerca de 3 mL de PBS foi adicionado e o tubo centrifugado por 1 minuto a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet re-suspendido com PBS até completar 1 mL.

A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas utilizando a técnica de exclusão por trypan blue, visualizado em câmara de Neubauer no microscópio óptico (40x). Para isso, 10  $\mu\text{L}$  de células foram adicionados a 240  $\mu\text{L}$  de trypan blue. Em seguida, a contagem foi realizada no quadrante central da câmara e a viabilidade avaliada em toda câmara. As células incolores foram consideradas viáveis e as azuis (que permitiram a entrada do corante) foram consideradas não-viáveis. Conhecendo a concentração da solução, foi possível ajustá-la para  $2,5 \cdot 10^6$  células/mL.

Para a quantificação do *burst* respiratório a medida deste foi realizada no dia do isolamento dos neutrófilos (dia da coleta de sangue) por quimiluminescência (QL). A intensidade da quimiluminescência (fluxo de fótons) é diretamente proporcional à taxa de produção de radicais livres, sendo, portanto, uma medida direta da atividade da oxidase [20].

Este experimento foi conduzido em um leitor de microplaca (Victor X-3, Perkin Elmer, EUA), em um modo de contagem não coincidente por 60 minutos e uma faixa de resposta entre 300 a 620 nm.

Para o ensaio controle, na microplaca, em cada poço foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de neutrófilos, seguido de 50  $\mu\text{L}$  de luminol 20 mM, 50  $\mu\text{L}$  de PMA 5  $\mu\text{M}$ . Após homogeneização, submeteu-se a solução a leitura, com um tempo de contagem de 60 minutos e temperatura de 30°C ( $\pm 1,0^\circ\text{C}$ ). Os testes foram realizados, pelo menos, em quatorze repetições. A quantificação foi feita em contagens por minuto.

Para o ensaio teste com o extrato, foi repetido o mesmo procedimento do ensaio controle, adicionando 10  $\mu\text{L}$  do extrato ao meio de reação.

Para o extrato da *Nectandra falcifolia*, as concentrações testadas foram: 20, 30 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os resultados foram avaliados de acordo com os valores dos picos das curvas cinéticas e apresentados na forma de quartis (1° e 3°).

#### Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais nos extratos liofilizados foi determinado no extrato otimizado segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição (2000) (monografia da *Calendula officinalis* L.- ASTERACEA) [21], com modificações. Pesou-se 5 mg do extrato liofilizado de *N. falcifolia* e este foi colocado em um balão de fundo redondo, adicionado de 100  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de urotropina 0,5%, 2 mL de acetona R e 0,2 mL de ácido clorídrico R. Foi aquecido em manta, sob refluxo, durante 30 minutos. A solução foi transferida para funil de separação, adicionou-se 2 mL de água e porções de 2 mL de acetato de etila R. Da fração acetato obtida foi transferido 2 mL adicionado de 0,2 mL do reagente de cloreto de alumínio 2%, diluindo-se todos os reagentes em 5 mL (balão de 5 mL) com solução metanólica de ácido acético 5%. Após 30 minutos mediu-se a absorvância da amostra a 422 nm. O teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com quercetina e expressos como miligrama de equivalente quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

## Determinação do teor de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método de Souza et al. (2007) [22], com modificações. Foram dissolvidos 20 mg de extrato liofilizado de *N. falcifolia* em 5mL metanol P.A. Em um balão volumétrico de 10 mL, foi então adicionados 200 µL desta última solução, 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água destilada, agitou-se por 1 min; passado este tempo foi acrescentado 2 mL de bicarbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 15%, agitou-se por 30 s, então o volume foi completado para 10 mL com água deionizada. Após 2h, a absorbância foi lida a 760 nm, à temperatura ambiente, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. A curva de calibração foi construída nas mesmas condições, tendo o ácido gálico como marcador. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com ácido gálico e expressos como miligrama de equivalente ácido gálico por grama de extrato seco (mg EAG/g de extrato). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Todos os métodos analíticos foram validados segundo a Resolução RE nº 899 (ANVISA, 2003) [23], de acordo com os parâmetros linearidade, precisão, robustez, exatidão, limite de quantificação e detecção.

## Espectroscopia de fotoacústica

O extrato liofilizado de *N. falcifolia* padronizado foi submetido análise por espectroscopia fotoacústica, para verificar a região espectral de absorção de seus componentes entre 200 e 800 nm, a fim de determinar os componentes principais contidos no extrato. A medida foi realizada usando um arranjo experimental (MELO et al., 2011). A luz monocromática é obtida de uma lâmpada de arco de Xenônio (Oriel, modelo 68820), com potência de 1.000 (W) e emissão no intervalo entre 180 e 4.000 nm, e monocromador (Oriel, modelo 77250). A frequência de modulação da luz é controlada por um modulador mecânico (Stanford Research Systems, modelo SR 540). A célula fotoacústica é feita com o mínimo volume. O microfone (Brüel & Kjaer, modelo BK 2669) acoplado à célula fotoacústica está conectado a uma fonte de alimentação e a um pré-amplificador. O sinal do microfone é transferido para o Lock-in (amplificador sintonizado) (EG & G Instruments, modelo 5110). O Lock-in fornece a intensidade e a fase do sinal fotoacústico que são transferidos para um microcomputador via interface GPIB. Os espectros fotoacústicos obtidos para diferentes

frequências de modulação de luz (de 13 a 60 Hz) foram registrados entre 200 e 800 nm.

## Resultados

A Tabela 3 mostra os resultados da atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) e do teor de fenólicos totais dos extratos de *Nectandra falcifolia* obtidos pelo delineamento fatorial  $2^3$ .

**Tabela 3** - Resultados da atividade antioxidante dos extratos de *Nectandra falcifolia* obtidos pelo delineamento fatorial  $2^3$ .

Ordem de análise	Variáveis descodificadas			Fenólicos totais (mgEAG/g ext)	Atividade antioxidante $IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )
	X1	X2	X3	Y1	Y3
				Media $\pm$ dp	Media $\pm$ dp
8	24	50	01:10	141,9 $\pm$ 18,4	27,7 $\pm$ 1,2
4	24	50	01:20	261,9 $\pm$ 45,6	19,4 $\pm$ 0,7
7	24	100	01:10	791,8 $\pm$ 43,8	24,7 $\pm$ 1,1
3	24	100	01:20	590,5 $\pm$ 71,4	27,1 $\pm$ 0,3
6	72	50	01:10	278,3 $\pm$ 26,6	21,4 $\pm$ 1,5
2	72	50	01:20	385,5 $\pm$ 33,3	26,8 $\pm$ 0,7
5	72	100	01:10	775,0 $\pm$ 84,4	21,1 $\pm$ 2,2
1	72	100	01:20	536,2 $\pm$ 51,6	23,2 $\pm$ 0,5
9	48	75	01:15	74,5 $\pm$ 19,5	19,9 $\pm$ 0,5
10	48	75	01:15	104,5 $\pm$ 25,0	22,4 $\pm$ 0,2

O planejamento fatorial  $2^3$  apresentou significância de efeito de curvatura em todas as respostas e, além disso, demonstrou que a melhor resposta seguiu as direções do maior tempo (72 h), da menor proporção (1:10) e do maior teor alcoólico (100%). Portanto a variável teor alcoólico foi fixada, uma vez que já se encontrava no seu ponto máximo.

Como a variável teor alcoólico foi fixada em 100%, no segundo delineamento, o composto central  $2^2$ , as variáveis analisadas foram: tempo de extração (TE) e proporção droga:solvente (PROP). Os resultados para teor de fenólicos totais (mg de Equivalente em Ácido gálico / g de extrato liofilizado (mg EAG/g ext)) e atividade antioxidante (Inibição do radical DPPH em 50% ( $IC_{50}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ))) estão na tabela 4. Os modelos obtidos juntamente com os valores dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) ( $p < 0,05$ ) contendo as respostas geradas pelo delineamento composto central  $2^2$  para extratos encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 4** - Teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos da *Nectandra falcifolia* obtidos pelo delineamento composto central 2<sup>2</sup>.

Bloco	Variável Codificada		Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)	DPPH IC <sub>50</sub> (µg/mL)
	X1	X2	Y1	Y3
1	-1,00	-1,00	791,8±43,8	24,8 ± 1,2
1	-1,00	1,00	590,5 ±71,4	27,2 ± 0,4
1	1,00	-1,00	775,0±84,4	21,2 ± 2,3
1	1,00	1,00	536,2±51,6	23,3 ± 0,6
1	0,00	0,00	692,6±77,7	28,6 ± 0,4
2	-1,41	0,00	159,3±28,6	33,9 ± 1,6
2	1,41	0,00	784,8±43,0	30,5 ± 1,0
2	0,00	-1,41	888,4±43,5	24,7 ± 0,8
2	0,00	1,41	520,5±49,1	31,0 ± 0,6
2	0,00	0,00	641,2±26,7	23,7 ± 1,2

X1= tempo de extração; X2= Proporção droga:solvente

**Tabela 5** - Modelos contendo as respostas geradas e coeficientes de determinação(R<sup>2</sup>) pelo delineamento composto central 2<sup>2</sup> para extratos da *N. falcifolia*.

Variáveis dependentes	Modelo	R <sup>2</sup>	Eq
Teor de fenólicos totais	$\hat{T}F = (639,79 \pm 8,64) + (132,34 \pm 4,31)$		4
Atividade antioxidante	$\hat{A} = (24,45 \pm 0,15) - (1,87 \pm 0,07) \cdot TE$	0,7728	3

onde  $\hat{T}F$  é o teor de fenólicos predito pelo modelo,  $\hat{A}$  é a atividade antioxidante dada em IC<sub>50</sub> (µg/mL) TE L é o tempo (linear) de extração, TE Q é o tempo (quadrático) de extração, PROP L é a proporção (linear) droga:solvente e PROP Q é a proporção (linear) droga:solvente.

A análise de variância foi avaliada para o delineamento composto central 2<sup>2</sup> para extratos da *N. falcifolia*, contendo os dados da atividade antioxidante (Tabela 7) e teor de fenólicos totais (Tabela 6).

**Tabela 6** - Dados ANOVA para o teor de fenólicos totais para o extrato padronizado de *N. falcifolia*.

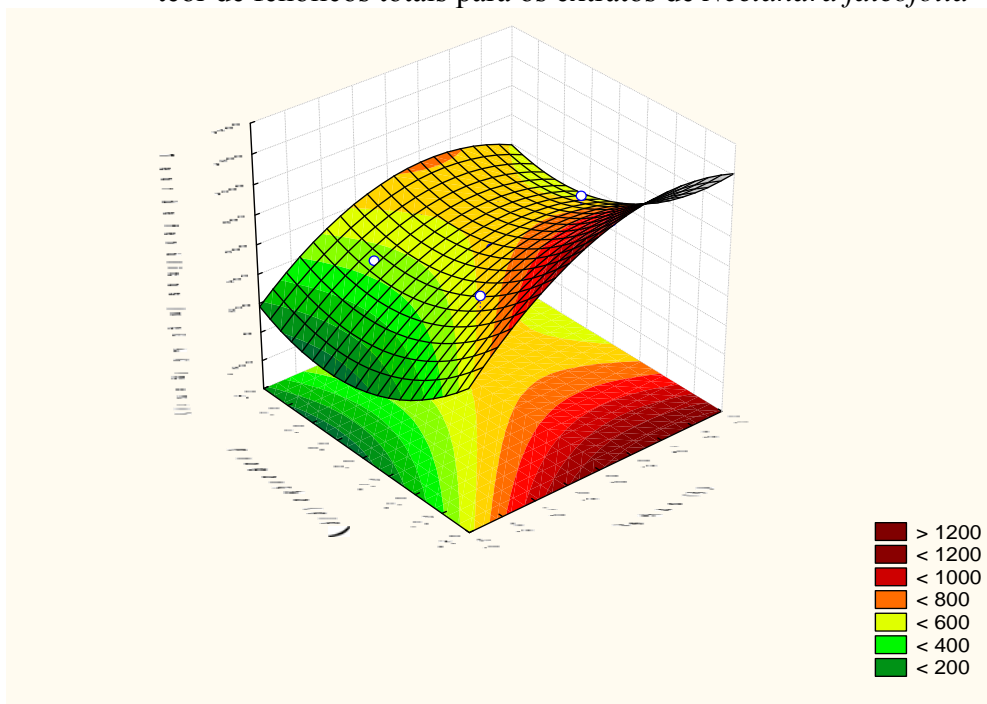
Fator	Soma quadrática (SS)	Graus de liberdade (df)	Média quadrática (MS)	F	p
tempo (L)	140120,4	1	140120,4	622,34	0,02
tempo (Q)	26113,7	1	26113,7	825,14	0,04
proporção (L)	127180,9	1	127180,9	423,53	0,02
Proporção (Q)	25499,8	1	25499,8	20,57	0,04
Interação tempo (L) e prop (L)	839,6	1	839,6	10,88	0,25
Falta de ajuste	73705,3	3	24568,4	164,3079	0,05
Erro puro	149,5	1	0,04		
Total SS	432317,6	9			

**Tabela 7** - Dados ANOVA para a atividade antioxidante (DPPH) em porcentagem de inibição para o extrato padronizado de *N. falcifolia*.

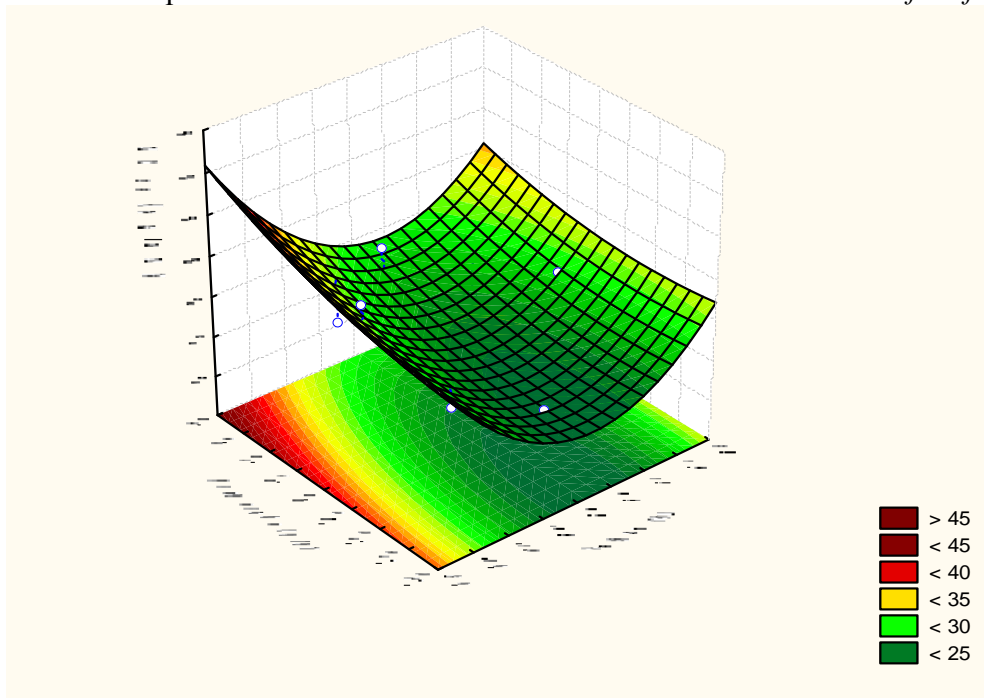
Fator	Soma quadrática (SS)	Graus de liberdade (df)	Média quadrática (MS)	F	p
tempo (L)	28,00	1	28,00	622,34	0,02
tempo (Q)	37,13	1	37,13	825,14	0,02
proporção (L)	19,05	1	19,05	423,53	0,03
Proporção (Q)	0,92	1	0,92	20,57	0,13
Interação tempo (L) e prop (L)	0,49	1	0,49	10,88	0,18
Falta de ajuste	59,30	3	19,76	439,29	0,35
Erro puro	0,04	1	0,04		
Total SS	147,36	9			

Os gráficos apresentando as superfícies de resposta do planejamento composto central  $2^2$  para a atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) e teor de fenólicos totais estão representados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

**Figura 1** - Gráfico de superfície de resposta do delineamento Composto Central  $2^2$  para o teor de fenólicos totais para os extratos de *Nectandra falcifolia*

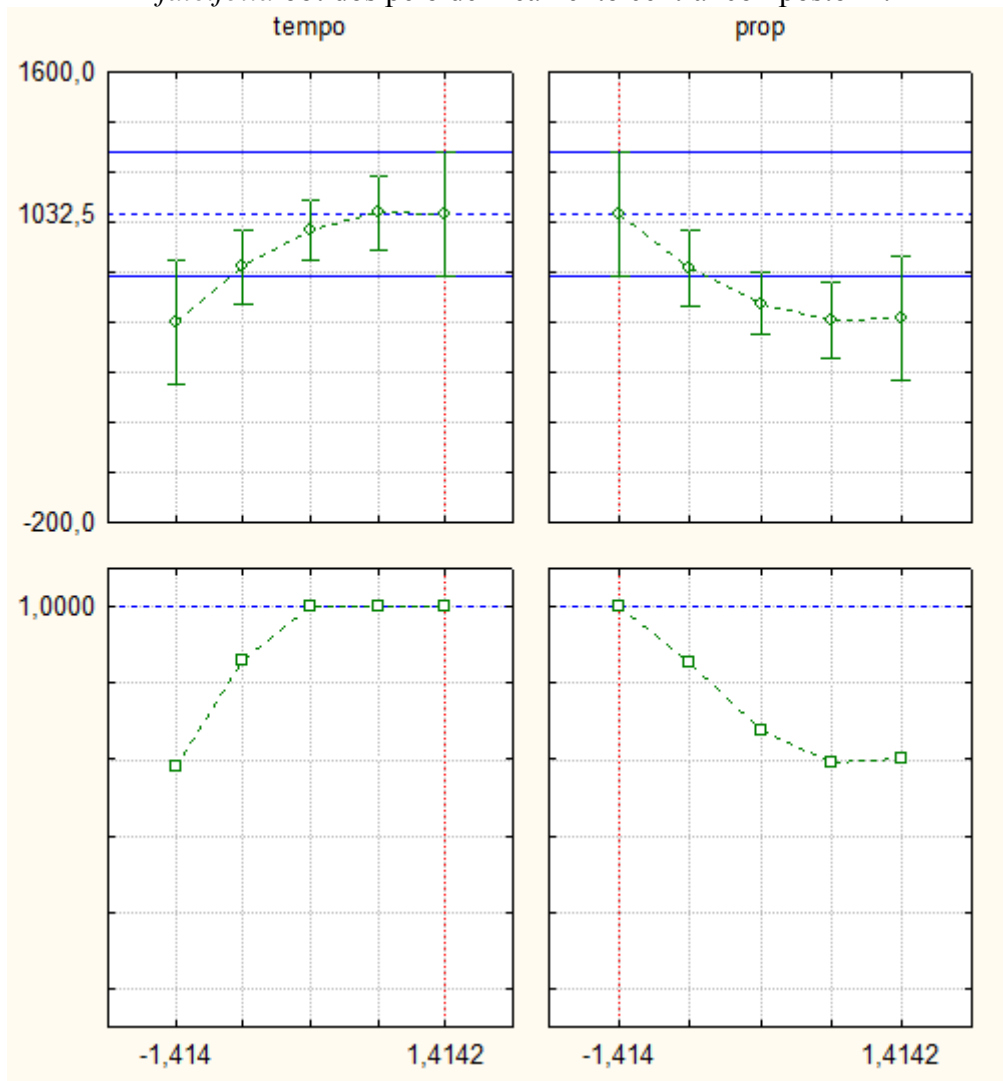


**Figura 2** - Gráfico de superfície de resposta obtido do delineamento Central Composto  $2^2$  quanto a atividade antioxidante nos extratos de *Nectandra falcifolia*.

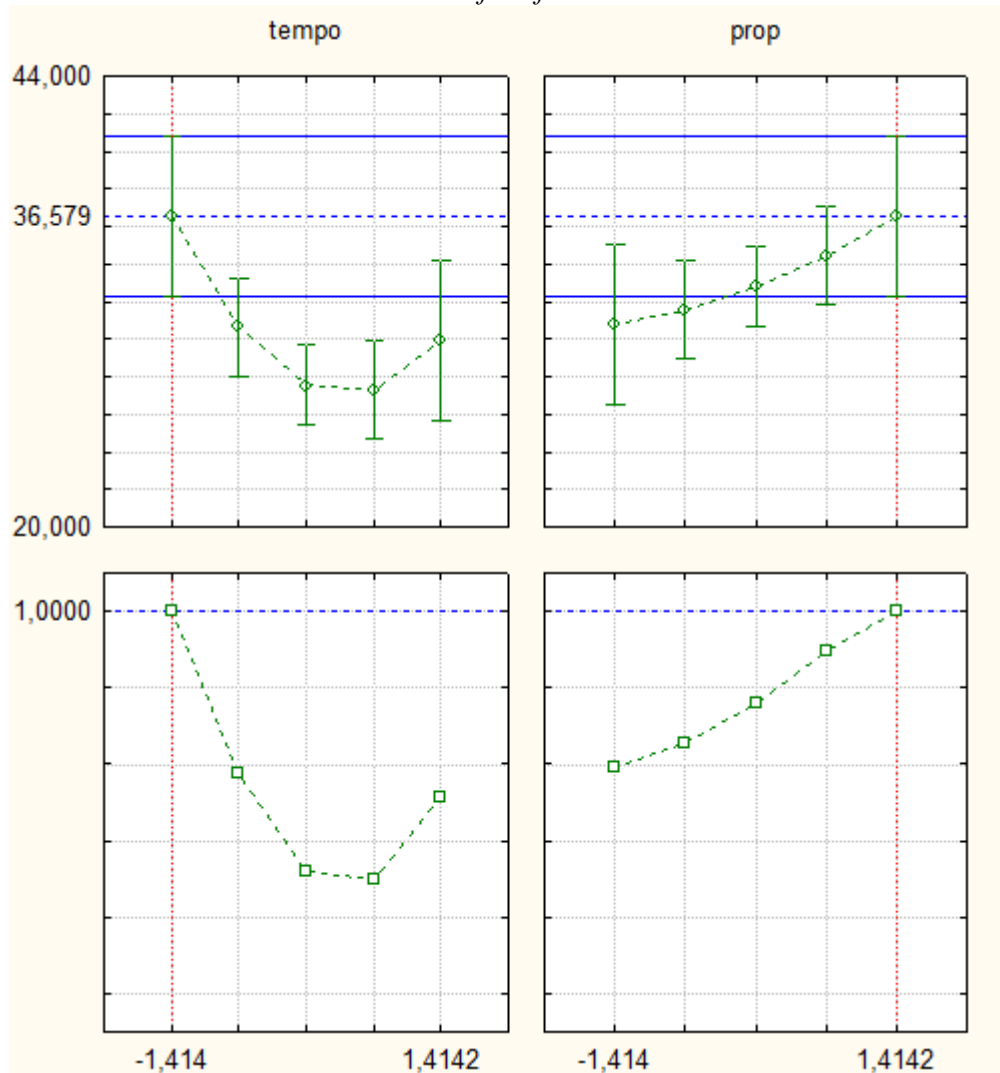


De acordo com o modelo gerado pelo delineamento central composto  $2^2$ , os valores de tempo de extração e proporção droga:solvente para obter o máximo de teor de fenólicos totais e de atividade antioxidante dos extratos de *Nectandra falcifolia* obtidos por, estão representados nas Figuras 3 e 4, respectivamente, que representam os gráficos de desejabilidade do modelo.

**Figura 3** - Gráfico de desejabilidade para o teor de fenólicos totais dos extratos de *Nectandra falcifolia* obtidos pelo delineamento central composto  $2^2$ .



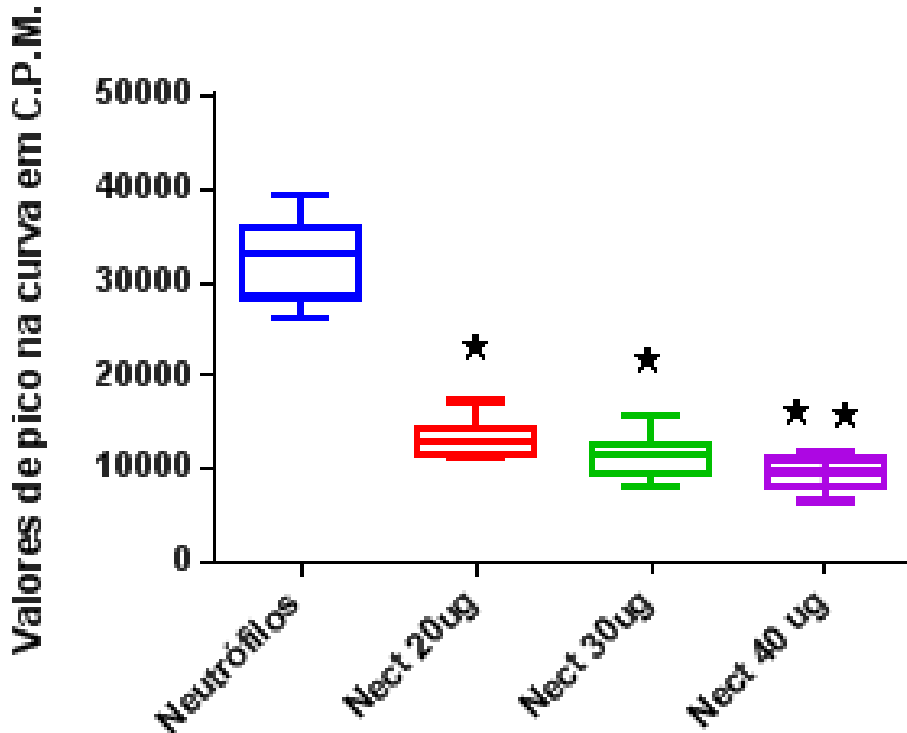
**Figura 4** - Gráfico de desejabilidade para o delineamento central composto 2<sup>2</sup> da atividade antioxidante dos extratos de *Nectandra falcifolia*.



Para o extrato padronizado duas outras metodologias foram testadas, além do teste do radical livre DPPH, sendo elas o *burst* respiratório e do radical ABTS<sup>+</sup>.

Os resultados da atividade antioxidante pelo método de *burst* respiratório estão apresentados na figura 5. Os dados mostrados representam a ativação de neutrófilos humanos pelo P.M.A na ausência (neutrófilos controle) ou presença de neutrófilos adicionado com o extrato padronizado de *N. falcifolia* nas massas testadas no volume final de reação do *burst* respiratório (n=14). Os dados foram analisados pelo teste ANOVA e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey. Para o controle de neutrófilos a média (n=14) foi de 32.497 ( $\pm 4.469$ ) contagens por minuto (C.P.M.), a concentração de 20 $\mu$ g apresentou 13.408 ( $\pm 1.939$ ) C.P.M., concentração de 30 $\mu$ g apresentou 11.403,28 ( $\pm 2177$ ) C.P.M. e para a concentração de 40 $\mu$ g proporcionou 9.716 ( $\pm 1.658$ ) C.P.M.

**Figura 5** – Gráfico de ativação de neutrófilos humanos pelo P.M.A na ausência (neutrófilos controle) ou presença de neutrófilos adicionado com o extrato padronizado e otimizado de *N. falcifolia* nas massas de 20, 30 e 40  $\mu\text{g}$  no volume final de reação do *burst* respiratório (310 $\mu\text{L}$ ) (n=14).



Os dados foram analisados pelo teste ANOVA complementados pelo teste de Tukey \*  $p < 0,001$  em relação ao controle; \*\* $p < 0,001$  em relação ao grupo controle e  $p < 0,01$  em relação ao grupo de 20  $\mu\text{g}$  de *N. falcifolia*.

A atividade antioxidante determinada pelo método do sequestro do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  também foi testada em 3 concentrações do extrato padronizado (n=14) de *Nectandra falcifolia*: 20, 30 e 40 $\mu\text{g}$ . O resultado em porcentagem de inibição apresenta-se expresso na tabela 8:

**Tabela 8** - Porcentagem de inibição da atividade do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  pelo extrato padronizado de *N. falcifolia* nas massas de 20, 30 e 40  $\mu\text{g}$

Massa	Inibição (%)
40 $\mu\text{g}$	93,50
30 $\mu\text{g}$	93,10
20 $\mu\text{g}$	77,40

A tabela 9 apresenta a comparação das metodologias antioxidantes DPPH e ABTS em percentual de inibição (%) e  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) para o extrato padronizado de *Nectandra falcifolia* nas massas de 20, 30 e 40  $\mu\text{g}$ .

**Tabela 9** - Comparação de diferentes metodologias antioxidantes contendo porcentagem de inibição e IC<sub>50</sub> para diferentes massas do extrato padronizado de *Nectandra falcifolia*.

Massa Extrato padronizado	DPPH Inibição(%)	ABTS Inibição(%)
40 µg	88,13	93,50
30 µg	67,92	93,10
20 µg	47,71	77,40
IC50 µg /ml	21	17

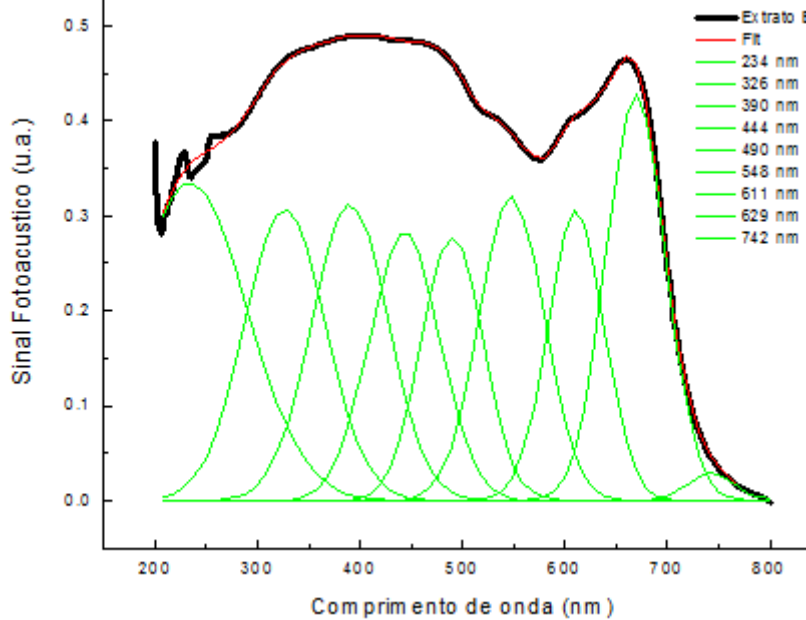
Portanto, para o extrato padronizado de *N. falcifolia*, os resultados das análises de teores de fenólicos e flavonoides, bem como os resultados de atividade antioxidante por diferentes metodologias encontram-se na tabela 10.

**Tabela 10** - Resultados das diferentes metodologias testadas para o extrato padronizado de *N. falcifolia*

Metodologias testadas	Flavonoides (µ EQ/mg extrato)	Fenólicos totais (mg EAG/g extrato)	Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> ) DPPH	Atividade antioxidante (IC <sub>50</sub> ) ABTS	<i>Burst</i> respiratório Massa 40 µg C.P.M
Resultado	41,72±1,92	775,03±84,47	21,17±2,27	17,20	9.716 (±1.658)

O extrato padronizado de *N. falcifolia* também foi analisado por espectroscopia fotoacústica e apresentou o espectro apresentado na figura 6 juntamente com o resultado de sua a deconvolução gaussiana.

**Figura 6** - Perfil espectral do extrato padronizado de *N. falcifolia* obtido por espectroscopia de fotoacústica e o resultado de sua deconvolução gaussiana apresentando os principais comprimentos de onda onde houve absorções na faixa de comprimento de onda testado.



## Discussão

Os extratos obtidos utilizando o fatorial  $2^3$  foram submetidos às análises de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método do radical livre estável DPPH. Os resultados obtidos demonstraram que para fenólicos totais a média geral foi **470,19(±9,50)** mg EAG/g extrato e os efeitos principais que apresentaram significância foram: para TE: **47,20(±19,00)** mg EAG/g extrato, para TA **406,44(±19,00)** e para a PROP **-53,22(±19,00)**. Os efeitos de interação significativos foram: **-82,75(±19,0)** mg EAG/g extrato (TE x TA) e **166,03(±19,00)** mg EAG/g extrato (TE x PROP).

O teor alcoólico foi a variável pura de maior influência para a eficiência extrativa, sendo que, quanto maior o TA maior o teor de fenólicos totais. Entretanto, a interação do TA com o TE apresentou efeito negativo, assim como a sua interação com a variável PROP. Esses dados indicam que existe uma contribuição desfavorável quando as variáveis TE e PROP são aumentadas a níveis superiores em função da interação entre seus efeitos com o TA. Sendo assim, o planejamento utilizado demonstra que, nas condições estudadas, a maior eficiência extrativa para compostos fenólicos foi obtida com o sistema TA 100%, TE 72h e PROP 1:10 (p/p).

Para a atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH a média

geral do IC<sub>50</sub> foi **24,00 (±0,26)** (µg /ml), e os efeitos principais foram para TE **-1,60 (±0,52)** (IC<sub>50</sub> (µg /ml ), para TA **0,19 (±0,52)** (µg /ml ) e PROP **0,38 (±0,52)** (µg /ml ). As interações significativas entre as variáveis foram: para TE x TA **-2,14(±0,52)** (µg /ml ) , para TE x PROP **-3,34 (±0,52)** (µg /ml ), para TE x PROP **1,84(±0,52)** (µg /ml ) e para TA x TE x PROP **-3,47(±0,52)** (µg /ml ).

Como pode ser observado, o fator que mais influencia para a diminuição das concentrações de IC<sub>50</sub> é o tempo, sendo que o seu aumento leva a diminuição dos valores de IC<sub>50</sub>. Além disso, as interações de TE x TA e de TA x TE x PROP também são importantes para a diminuição do valor de IC<sub>50</sub>. Sendo assim, a melhora na capacidade antioxidante está associada ao aumento do TA, TE e PROP, principalmente em função dos efeitos de interação entre fatores.

De acordo com os resultados apresentados para o delineamento fatorial 2<sup>3</sup>, a variável teor alcoólico indicou que quanto maior sua concentração melhores foram as respostas estudadas. Para as duas respostas foram avaliados também o efeito da curvatura para o modelo gerado e foi encontrado significância nos dois casos. Sendo assim, a rotação do plano experimental sobre o eixo fez-se necessário para determinar a existência de possível efeito quadrático. Considerando que a rotação do eixo levou ao estabelecimento dos pontos axiais (-1,4142 e + 1,4142) para este modelo (tabela 2), a execução do ponto axial superior não foi possível para TA pois o mesmo já foi testado em sua concentração máxima (100%) no nível +1.

Em função do exposto, novo delineamento experimental foi desenvolvido : composto central 2<sup>2</sup>, sendo o fator TA fixado em 100% e não mais considerado no novo delineamento.

Os 10 extratos propostos pelo delineamento composto central 2<sup>2</sup> foram preparados em triplicata, desalcoholizados em evaporador rotativo e liofilizados. Os extratos obtidos foram submetidos às análises de teor de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método do radical livre estável DPPH. Para teor de fenólicos totais o valor da média geral foi **639,79 (± 8,64)** mg de EAG/g extrato, e os efeitos principais significativos foram **264,68(±8,64)** mg de EAG/g extrato para o TE (L), **-151,16(±11,43)** para o TE (Q), **-252,17(±8,64)** para a PROP (L) e **149,37(±11,43)** para PROP (Q). O efeito de interação que apresentou significância foi TE (L) x PROP (L) **-28,97 (+ 12,2)**. O

planejamento utilizado demonstrou que, nas condições estudadas, a melhor eficiência extrativa para teor de fenólicos foi do extrato produzido com TA 100%, TE 82 horas e PROP 1:08 p/p, como observado no gráfico de desejabilidade (figura 3).

Para a atividade antioxidante o valor da média geral em IC50 foi **24,45 ( $\pm 0,15$ )**  $\mu\text{g/ml}$ , e os efeitos das variáveis puras que apresentaram significância foram **-3,74 ( $\pm 0,15$ )** para o TE (L), **5,70 ( $\pm 0,19$ )** para o TE (Q) **3,08 ( $\pm 0,15$ )** para a PROP (L) **0,90 ( $\pm 0,19$ )** para PROP (Q). O efeito de interação significativo foi observado para TE (L) x PROP (L) **-0,70 ( $\pm 0,21$ )**.

Os modelos obtidos para as duas respostas (tabela 6) apresentaram a análise de variância que demonstraram que os modelos estão ajustados (tabelas 7 e 8).

O valor ótimo predito para o teor de fenólicos totais dos extratos de *Nectandra falcifolia* (figura 3), indicou para a variável TE três valores ótimos, sendo eles (codificados): 0, -1 e -1,4142, respectivamente : 48 hs, 72hs e 82 hs (descodificadas). Para a variável PROP, os valores ótimos foram -1 e -1,4142, portanto 1:10 (p/p) e 1:08 (p/p). Para a atividade antioxidante, o valor ótimo predito para a variável TE dos extratos obtidos (figura 4) mostraram que os valores codificados 0 e +1, portanto são os 48h e 72 h são os que apresentaram melhor atividade antioxidante. Para a variável PROP os valores de IC50 para a atividade antioxidante apresentaram uma sutil diferença entre os extratos estudados, como pode ser visto na figura 4. Assumiu-se como sendo o melhor valor para o parâmetro proporção o valor codificado de -1,414 (1:08 p/p).

A partir dos dados apresentados o extrato padronizado de *Nectandra falcifolia* foi definido pelo extrato que melhor representou as respostas associadas de teor de fenólicos e atividade antioxidante. Portanto, o planejamento central composto  $2^2$  demonstrou que, nas condições estudadas, o extrato padronizado com maior teor de fenólicos e atividade antioxidante foi o extrato produzido com TA 100%, TE 72 horas e PROP 1:10 p/p.

Nesse extrato foram realizados dois outros testes de avaliação da capacidade antioxidante. O *burst* respiratório demonstrou que dentre as massas testadas (20, 30 e 40 $\mu\text{g}$ ) a massa de 40 $\mu\text{g}$  também apresentou melhor atividade antioxidante em relação ao controle (9.716,57) C.P.M e 32.497,35 C.P.M, respectivamente.

No teste com ABTS o melhor resultado foi obtido também com a massa de 40  $\mu\text{g}$  de extrato, inibindo em 93,5% o radical ABTS<sup>•+</sup>. Para o experimento com DPPH, a inibição foi de 88,1% (tabela 8). Assim podemos depreender que diante das metodologias do DPPH e ABTS o extrato padronizado apresentou alta capacidade antioxidante pelo sequestro de radicais em ambiente reacional simples. No *burst* respiratório, os resultados mostraram

que, mesmo em um meio reacional complexo como o meio celular, o extrato também foi capaz de manter a alta capacidade antioxidante. Esta informação indica a potencialidade de aplicações deste extrato em condições fisio-patológicas que necessitem da regulação do estresse oxidativo para o restabelecimento da condição biológica favorável a manutenção celular. Entretanto, experimentos *in vivo* devem ser realizados com o intuito de comprovar a atividade em um ambiente ainda mais complexo.

Para caracterizar o extrato otimizado, o mesmo foi analisado quanto por espectroscopia fotoacústica. A figura 6 apresenta o perfil obtido por esta técnica, bem como a deconvolução gaussiana do mesmo. O espectro ultravioleta de um flavonóide é geralmente determinado em etanol ou metanol e consiste em 2 picos de absorção máxima entre 240-285 nm (banda II, devido a absorção do anel A) e 300-555 nm (banda I, devida ao anel B). As flavonas e os flavonóis exibem 2 picos de absorção máxima na região de 240-280 nm para a banda II (anel A) e 300-380 para a banda I (anel B) [24]. Portanto, pela deconvolução gaussiana do extrato padronizado e otimizado de *N. falcifolia* (figura 10), podemos dizer que o pico de absorção máxima em 234 nm e 390 nm são as bandas II (anel A) e I (anel B), respectivamente. Isto confirma a presença de flavonoides no extrato, corroborando Truiti (2004) [2]. O teor de flavonoides no extrato padronizado foi determinado e apresentou o valor de **41,72 (± 1,92) μ EQ/ mg** de extrato, confirmando a presença desta classe de compostos com conhecida atividade antioxidante.

Os resultados aqui apresentados mostram que a utilização de planejamento experimental no desenvolvimento do extrato padronizado de *N. falcifolia* com o objetivo biológico específico na atividade antioxidante foi capaz de atingir êxito, comprovado por metodologias distintas, e obter informações tecnológicas de maior abrangência que os delineamentos experimentais clássicos, como os efeitos de interação.

### Referências

- [1] A. A. S. G. Lonni, R. Longhini, G. C. Lopes, J. C. P. Mello, I. S. Iscarminio, Anal. Chim. Acta. 719(2012) 57-60.
- [2] M. C. T. Truiti, Estudo químico e avaliação de atividades biológicas de espécies vegetais nativas da planície alagável do alto rio Paraná. Maringá, 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- [3] J. O. Melo, M.C.T. Truiti, M. N. Muscará, S. M. Bolonheis, J. A. Dantas, S. M. Carrapoz-Assef, R. K. N. Cuman, C. A. Bersani-Amado, Biol. Pharm. Bull. 29 (2006) 2241- 2245.

- [4] M. C. T. Truiti, I. C. P. Ferreira, M. L. M. Zamuner, C.V. Nakamura, M.H. Serragioto, M.C. Souza, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38 (2005) 1873-1878.
- [5] M. C. T. Truiti, C.A. Bersani-Amado, B.P. Dias Filho, M.H. Sarragioto, M.C. Souza, *Pharm. Biol.* 44 (2006) 516-521.
- [6] Y. Hanasaki, S.Ogawa, S.Fukui, *Biol. And Med.* 16 (1994) 845-850.
- [7] R. L. Priori, W. Xianli, K. Schaich, *J. of Agric. And Food. Chem.* 53 (2005) 4290-4302.
- [8] I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, A. Rosas- Romero, G. Saavedra, M.A. Murcia, A. M. Jiménez, C. Codina, *Life Sciences.* 73 (2003) 1667-1681.
- [9] R. C. Borreli, A.Visconti, C. Mennella, M. Anese, V. Fogliano, *J. of Agric. and Food Chem.* 50 (2002) 6527–6533.
- [10] I. Sánchez-Gonzalez, A. Jiménez-Escrig, F. & Saura-Calixto, *Food Chem.* 90 (2005) 133–139.
- [11] D. Costa, A. P. Marques, R.L. Reis, J. L. F. C. Lima, E. Fernandes, *Free Radic. Biol. Med.* 40 (2006) 632-640.
- [12] B. Lapornik, M. Prosek, A. G. Wondra, *J. Food Eng.* 71 (2005) 214- 222.
- [13] B. B. Li, B. Smith, M. M. Hossaim, *Sep. Purif. Technol.* 48(2006) 182-189.
- [14] M. Naczka, F. Shahidi, *J. of Chrom. A.* 1054 (2004) 95-111.
- [15] E. A. Audi, E. J. V. Campos, M. Rufino, D.G. Cortez, C. A. Bersani-Amado, L. A. L. Soares, P. R. Petrovick, J. C. P. Mello, *Acta Farm. Bonaerense.* 20 (2001) 225-232.
- [16] P. Onsekizoglu, K. Bahceci, J. Acar, *J. of Memb. Sci.* 349 (2010) 225-230.
- [17] Brazil, *Brazilian. Pharmacopeia*, 5th ed. Anvisa, Brasilia, 2010.
- [18] K.F. El-Massry, A. H. El-Ghorad, a. Farouk, *Food Chem.* 79 (2002) 331-336.
- [19] M. Freitas, G. Porto, J. L. F. Lima, E. Fernandes, *Clinical Biochem.* 41 (2008) 570–575.
- [20] M. P. Wymann, V. V. Tschärner, D. A. Deranleau, M. Baggiolini, *J. of Biol. Chem.* 262 (25) (1987) 12048-12053
- [21] Brazil, *Brazilian. Pharmacopeia*, 4th ed. Anvisa, Brasilia, 2000.
- [22] C. M. de M. Souza, H. Rocha and Silva, G. M. vierira-Junior, M. C. C. Ayres, C. L. S. Da Costa, D. S. Araujo, M. S. Brandão, M. H. Chaves, *Quim. Nova.* 30 (2007) 351-355.
- [23] Brazil, Anvisa, Resolução RE n. 899 de 29/05/2003, 2003.
- [24] A. P. da Cunha, *Farmacognosia e Fitoquímica*, second Ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2009, pp. 250-251.
- [25] T. Prvan, D.J. Street. *J. of St. Plan. And Inf.* 106 (2002) 245-269.

- [26] F.D. Cunha, L.J.L. Costa, A.J.D. Fernandes, T.P. Souza, L.A.L. Soares. Bras. Arch. of Biol. and Tech. 52 (3) (2009) 647-652.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o uso da droga vegetal folhas de *Nectandra falcifolia* alguns parâmetros de qualidade foram estabelecidos. Os critérios adotados foram os preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). O valor encontrado para cinzas totais foi de 5,55% (p/p) em média, o teor de umidade foi de 11,91% (p/p) e o teste de substâncias extraíveis mostrou que para a análise desta droga vegetal deve-se utilizar como líquido extrator o etanol 75% e 48 horas de tempo de maceração.

Na área de produtos naturais são utilizadas muitas técnicas espectrofotométricas, e três delas foram empregadas neste estudo para a determinação do teor de fenólicos totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante pelo ensaio de DPPH. Todas foram validadas quanto aos parâmetros linearidade, precisão (intra e inter-corrída), exatidão e robustez.

O desenvolvimento de um extrato com alta capacidade antioxidante, propriedade esta de grande interesse no controle do estresse oxidativo, foi realizado neste trabalho. O extrato de *N. falcifolia* foi padronizado e com a atividade antioxidante comprovado por diferentes métodos foi incorporado a uma emulsão não-iônica na concentração de 1% (p/p). Esta formulação foi avaliada quanto a sua capacidade de penetração através da pele. Para isso, a Espectroscopia Fotoacústica foi o método adotado para a determinação da presença da formulação em distintas camadas da pele.

O procedimento foi realizado utilizando ratos Wistar machos, em protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no uso de animais em experimentação, da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n°. 100/2012). Os resultados sugeriram que a formulação base está presente na epiderme mas não na derme. Após a aplicação da dose de 2 mg/cm<sup>2</sup> da formulação. Em dose mais alta (5m/cm<sup>2</sup>), os dados indicam que a formulação está presente tanto na epiderme quanto na derme.

Assim, considerando a atividade antioxidante verificada para o extrato padronizado liofilizado de *Nectandra falcifolia*, a aplicação de filmes mais finos da formulação contendo o extrato sobre a pele protegeria a epiderme de danos oxidativos, mas se a proteção for desejada também para os componentes da derme, tais como fibroblastos, é necessário aplicar maiores quantidades da mesma. Mais experimentos ainda deverão ser

realizados para a confirmação destas informações.

Este trabalho alcançou seu objetivo de obter produto padronizado de origem vegetal para a utilização farmacêutica. O uso tópico parece ser viável considerando os dados preliminares de estudos de permeabilidade envolvendo o extrato. Portanto o uso de planejamento experimental para o referido insumo foi eficaz.

## REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, A.; JAMES K. **Pharmaceutical experimental design and interpretation**. Londres: Taylor & Francis, 1996. p.131-223.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE n. 899 de 29/05/2003**, 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira 4a ed.**, São Paulo: Atheneu, 1988.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira 5a ed.**, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília:ANVISA, 2010. v.1.

DINIZ, A. **Avaliação do perfil de absorção da vicenina-2 e desenvolvimento de extrato seco padronizado de *Lychnophora ericoides* com máxima extração deste flavonoide**. Ribeirão Preto, 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

EL MASSRY , K. F., et al. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. **Food Chemistry**, v.79, p.331-336, 2002.

FREITAS, M.; PORTO, G.; LIMA, J.L.F.C.; FERNANDES, E. Isolation and activation of human neutrophils in vitro. The importance of the anticoagulant used during blood collection. **Clinical Biochemistry**, v.41, p.570–575, 2008.

HANASAKI, Y. et al. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, p.845-850, 1994.

ISAAC, V.L.B. ; CEFALI, L.C. ; CHIARI, B.G. ; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N.; CORREA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytica Chimica Acta*, n.719, p.57-60, 2012.

MELO, J.O.; PEDROCHI, F.; BAESSO, M. L.; HERNANDES, L.; TRUITI, M. C. T.; BARONI, BERSANI-AMADO, C. A.. Evidence of deep percutaneous penetration associated with anti-inflammatory activity of topically applied *Helicteres gardneriana* extract: a photoacoustic spectroscopy study. **Pharm Res**. v. 28, p. 331–336, 2011.

MELO, J. O.; TRUITI, M. C. T.; MUSCARÁ, M. N.; BOLONHEIS, S. M.; DANTAS, J. A.; CARRAPOZ-ASSEF, S. M.; CUMAM, R. K. N.; BERSANI-AMADO, C. A. Anti-inflammatory Activity of Crude Extract and Fractions of *Nectandra falcifolia* Leaves. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p.2241- 2245, 2006.

SÁNCHEZ-GONZALEZ, I.; JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIZTO, F. **In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures (Italian, espresso and filter**. *Food Chem.*, v.90, p.133–139, 2005.

SOUZA, C. M. de M.; ROCHA e SILVA, H.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; AYRES, M.C.C; DA COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TRUITI, M. C. T.; FERREIRA, I. C. P.; ZAMUNER, M. L. M.; NAKAMURA, C. V.; SERRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C.; Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38: p.1873-1878, 2005.

TRUITI, M.C.T. **Estudo químico e avaliação de atividades biológicas de espécies vegetais nativas da planície alagável do alto rio Paraná**. Maringá, 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá.

TRUITI, M. C. T., BERSANI-AMADO, C. A.; DIAS FILHO, B. P.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C. Screening of Five Brazilian Plants for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, n.7, p. 516-521, 2006.

ONSEKIZOGLU, P.; BAHCECI, K.; ACAR, J. The use of factorial design for modeling membrane distillation. **Jouranl of Membrane Science**, v. 349, p.225-230, 2010.

WYMANN, M. P.; TSCHARNER, V. V.; DERANLEAU, D. A.; BAGGIOLINI, M. The Onset of the Respiratory Burst in Human Neutrophils. **The Journal of Biological Chemistray**, v. 262, n. 25, p. 12048-12053, 1987.