



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RONALDO DOS SANTOS SOUSA JUNIOR

Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) e avaliação da sua atividade genotóxica.

Teresina – Piauí  
2018

RONALDO DOS SANTOS SOUSA JUNIOR

Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) e avaliação da sua atividade genotóxica.

Defesa de Mestrado submetido à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para o grau de mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Chistiane Mendes Feitosa

Teresina – Piauí  
2018

FICHA CATALOGRÁFICA  
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do CCN

S725e Sousa Júnior, Ronaldo dos Santos.

Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) e avaliação de sua atividade genotóxica / Ronaldo dos Santos Sousa Júnior – Teresina, 2018.

86f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chistiane Mendes Feitosa

1. Química Orgânica. 2. Semente do Bacuri. 3. Genotoxicidade. I. Título.

CDD 547

RONALDO DOS SANTOS SOUSA JUNIOR

Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) e avaliação da sua atividade genotóxica.

Defesa de mestrado submetido à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como um dos requisitos para a o grau de mestre em Química.

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Chistiane Mendes Feitosa – (Orientadora)

UFPI

---

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior – (Examinador Externo)

IFPI

---

Prof. Dr. Herbert de Sousa Barbosa (Examinador interno)

UFPI

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais,  
Ronaldo dos Santos e Emiliane Portugal,  
Por todo incentivo, apoio e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre comigo e permitir que eu chegasse nessa etapa de minha vida.

Agradeço aos meus pais, Ronaldo e Emiliane, pelo apoio e confiança em todas as minhas escolhas e pelos princípios ensinados.

Aos meus irmãos Wallace e Érica e sobrinhas Anne Sophia e Emilly Valentina.

Gostaria de agradecer à Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa pela confiança e ensinamentos durante toda a fase deste trabalho.

Sou muito grato a minha madrinha Francisca das Chagas e minha tia Cleide Santos por me incentivarem e apoiarem nos momentos em que precisei.

Aos demais familiares, avós, tios e primos por todo incentivo e motivação.

Aos amigos do grupo Antonio, Espedito, Felipe, Lidiane, Rafael, Suyanne, Valéria, Ana Paula, Layana pela amizade e contribuições no desenvolvimento do trabalho.

Aos amigos de curso e de vida do IFPI campús Teresina e Parnaíba e da UFPI, ao amigo Tomas Magno e os demais amigos por todo companheirismo, contribuição e amizade concedida.

Aos laboratórios da UFPI, Laboratorio de produtos naturais e Neuroquímica Experimental – LPNNEX - Laboratório de Pesquisas em Neuroquímica Experimental – LAPNEX, Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados – LIMAV, Laboratório de RMN – LAUREMN, Laboratório de Pesquisas em Cosméticos e Medicamentos – LAPCOM, Laboratório de Genética Toxicológica – LAPGENIC.

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo incentivo financeiro.

“Cantai ao SENHOR um cântico novo, porque ele tem feito maravilhas; a sua destra e o seu  
braço santo lhe alcançaram vitória”

Salmos (98)

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

TG1	1,3-diestearil-2-oleil-glicerol
$\beta$ -CD	$\beta$ -ciclodextrina
CD	Ciclodextrina
EH	Extrato Hexânico
ACE	Acetato de etila
DCM	Dicloro metano
EE	Extrato etanólico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
CHCM	Hemoglobina corpuscular
DA	Doença de Alzheimer
AChE	Acetilcolinesterase
CI	Complexo de inclusão
DRX	Difração de raios-x
TG	Termogravimetria
DSC	Calorimetria Esploratória Diferencial
IV	Infravermelho



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Platonia insignis*: Árvores, Flores e Frutos.
- Figura 2 - Estrutura química do composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.
- Figura 3 - Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina
- Figura 4 - Espectros de infravermelho. TG1,  $\beta$ -CD, Complexos 1:1 e 1:2.
- Figura 5 - Termogramas do TG1 e  $\beta$ -CD e Complexos de inclusão.
- Figura 6 - Termograma do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol,  $\beta$ -Ciclodextrina,
- Figura 7 - Termograma do complexo de inclusão na fração molar de 1:1 e do complexo na fração molar 1:2.
- Figura 8 - Difratoograma do TG1,  $\beta$ -Ciclodextrina, complexo de inclusão 1:1 e Difratoograma do complexo de inclusão 1:2.
- Figura 9 - Curva de calibração do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.
- Figura 10 - Perfil de dissolução do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol e do complexo TG1: $\beta$ -CD.
- Figura 11 - Fotomicrografia do teste de cometa indicativo dos tipos de danos.
- Figura 12 - Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média  $\pm$  desvio padrão) em sangue periférico de camundongos, após 0h, 24h e 72h horas da administração do complexo.
- Figura 13 - Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média  $\pm$  desvio padrão) teste cometa com células da medula óssea 72 horas após o tratamento.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Parâmetros hematológicos de ratos wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.
- Tabela 2 - Determinação dos níveis de substâncias reativas ao TBARS, conteúdo de nitrito, atividades de catalase e SOD no hipocampo de ratos tratados com TG1.
- Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas.

**Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) e avaliação da sua atividade genotóxica. SOUSA JUNIOR, R.S.** Orientadora: Chistiane M. Feitosa. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Química. Centro de Ciências da Natureza. Departamento de Química, UFPI, 2018.

## RESUMO

Dentre as riquezas da flora brasileira, a espécie *Platonia insignis* Mart., conhecida como bacurizeiro, é uma planta de grande importância econômica para alguns estados da região nordeste dada sua multiplicidade de usos, como planta frutífera, com aproveitamento dos frutos; como planta madeireira, para fabricação de móveis, além da extração do óleo das suas sementes. O bacuri é o fruto da espécie *P. insignis*, bastante consumido na forma de sorvetes, doces, geleias e sucos e apresenta em sua semente, dentre outros compostos, o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes de *P. Insignis*. Trabalhos demonstram que o TG1 em estudos *in vivo* com camundongos tem mostrado um efeito benéfico sobre o déficit de aprendizagem e de memória, esse triglicérido não apresentou toxicidade e apresentou outras relevantes atividades farmacológicas. Diante disso, este estudo teve como objetivo obter e caracterizar uma formulação farmacêutica a partir de complexos de inclusão do composto TG1 com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) visando a melhoria de suas propriedades como sua solubilidade, já que, formação do complexo de inclusão facilita, em alguns casos, a solubilização de substâncias pouco solúveis. O preparo foi feito utilizando-se a técnica de malaxagem e a caracterização foi feita através das técnicas, a saber: espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial. Estas técnicas evidenciaram a formação de complexos de inclusão entre TG1 e  $\beta$ -CD. A partir disso, foi avaliada a atividade genotóxica do complexo por meio de ensaio cometa e teste de micronúcleo na medula óssea e sangue periférico em camundongos. Portanto, os resultados obtidos são promissores para elaboração de uma futura formulação farmacêutica com o complexo.

**Palavras-chave:** 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, Ciclodextrina, Complexo de inclusão, Genotoxicidade.

**Elaboracion of a inclusion complex from an isolated constituent of *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) and evaluation of their genotoxic activity. SOUSA JUNIOR, R. S.** Advisor: Chistiane M. Feitosa. Master's Dissertation. Post-graduate Program in Chemistry. Center of Natural Sciences. Department of chemistry, UFPI, 2018.

#### ABSTRACT

Among the riches of Brazilian flora, *Platonia insignis* Mart., known as bacurizeiro, is a plant of great economic importance for the states of the Northeast region due to its multiplicity of uses, as a fruiting plant, with use of the fruits; as a timber plant, for the manufacture of furniture, in addition to extracting the oil from its seeds. The bacuri is the fruit of *P. insignis*, quite consumed in the form of ice creams, jams, jellies and juices which contains 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1) a triglyceride isolated from the hexanic extract of the seeds of *P. insignis*. Studies demonstrate that TG1 in *in vivo* studies with mice has shown a beneficial effect on learning and memory deficits, this triglyceride showed no toxicity and presented other relevant activities pharmacological. This study was aimed to obtain and characterize a pharmaceutical formulation from inclusion complexes of TG1 with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). The formation of the inclusion complex facilitates in some cases the solubilization of poorly soluble substances. The preparation was done by using the technique of malaxing and the characterization was made by infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. These techniques evidenced the possible formation of inclusion complexes between TG1 and  $\beta$ -CD. From this, the genotoxic activity of the complex was evaluated by comet assay and micronucleus test in bone medulla and peripheral blood in mice. The results obtained are promising for the preparation of a future pharmaceutical formulation with the complex.

**Keywords:** 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol, Cyclodextrin, Inclusion complex, Genotoxicity.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol: Atividades farmacológicas do composto isolado de <i>Platonia insignis</i> Mart. (bacurizeiro) - perspectivas na elaboração de fitomedicamentos. ....</b>	<b>13</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>14</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>15</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Metodologia.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Revisão da literatura.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).....</b>	<b>17</b>
<b>3.2 Avaliação da toxicidade do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Potencial cicatrizante.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Atividade anticolinesterásica de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1).....</b>	<b>20</b>
<b>3.5 Potencial antioxidante.....</b>	<b>21</b>
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>22</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>22</b>
<b>CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica: Elaboração e caracterização do complexo de inclusão do 1,3-diestearil-2-oleoilglicerol com <math>\beta</math>-Ciclodextrinas.....</b>	<b>25</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>26</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>27</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>27</b>
<b>1.2 Ciclodextrinas.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3 Complexo de inclusão... ..</b>	<b>31</b>
<b>1.4 Elaboração de complexos de inclusão.....</b>	<b>31</b>
<b>1.5 Caracterização de complexos de inclusão.....</b>	<b>33</b>
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 Caracterização do complexo 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol/<math>\beta</math>-ciclodextrina.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Espectroscopia na região do infravermelho.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Análise termogravimétrica.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Calorimetria exploratória diferencial .....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Difração de raios-X.....</b>	<b>42</b>

<b>3.5 Ensaio de dissolução.....</b>	<b>43</b>
<b>4. Conclusão.....</b>	<b>45</b>
<b>5. Referências.....</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO III: Avaliação da atividade genotóxica de um complexo de inclusão elaborado entre a <math>\beta</math>-ciclodextrina e um constituinte isolado de <i>Platonia insignis</i> Mart. (bacurizeiro).....</b>	<b>51</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>52</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>53</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>53</b>
<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>56</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>58</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>Referências.....</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTULO IV: Estrutura de Produtos naturais antioxidantes extraídos de plantas.....</b>	<b>64</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>65</b>
<b>Referências.....</b>	<b>78</b>

**CAPÍTULO I: Prospecção tecnológica do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol: Atividades farmacológicas do composto isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) - perspectivas na elaboração de fitomedicamentos.**

**Prospecção tecnológica do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol: Atividades farmacológicas do composto isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) - perspectivas na elaboração de fitomedicamentos.**

**Technological prospecting of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol: Pharmacological activities of compound isolated from *Platonia insignis* Mart. (Bacurizeiro) - perspectives in the development of medicinal plants**

**<sup>1</sup>Ronaldo dos S. S. Junior; <sup>1</sup>Chistiane M. Feitosa\*; <sup>2†</sup>Rivelilson M. de Freitas**

1Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Centro de Ciências da Natureza, CEP: 64049-550, Teresina – PI, Brasil

† *in memoriam*. 2Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, Centro de Ciências da Saúde, Teresina – PI, Brasil

## **Resumo**

Este trabalho teve como objetivo realizar um levantamento das atividades farmacológicas de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), composto bioativo isolado da espécie *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro). Foi realizada uma revisão em artigos, dissertações e teses publicadas nos últimos seis anos através das bases de dados Google Academics, PubMed, Scielo e Scencedirect. O composto TG1 corresponde a um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes de *P. insignis*. Os estudos apontam que o TG1 é um composto sem atividade citotóxica. As análises macroscópicas e histológicas das feridas dos ratos tratados com o creme contendo TG1 demonstram uma possível atividade cicatrizante. Através de análises *in vitro* e *in vivo* comprovou-se ações antioxidante e inibitória da acetilcolinesterase, enzima associada á doença de Alzheimer. O TG1 também foi capaz de melhorar os défices de memória em ratos. Os estudos indicam que o composto também apresentou diversas atividades farmacológicas que podem ser melhores caracterizadas para sua utilização na formulação de novas formas farmacêuticas.

**Palavras-chave:** 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, *Platonia insignis* Mart.. Propriedades farmacológicas, Fitomedicamentos.

## Abstract

This study aimed to survey the pharmacological activities of 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1), bioactive compound isolated from the *Platonia insignis* Mart. (Bacurizeiro) specie. A review was carried out in articles, dissertations and theses published in the last six years through databases Google Academics, PubMed, Scielo e Sciencedirect. The compound TG1 corresponds to an isolated triglyceride hexane extract of *P. insignis* seeds. Studies TG1 as a compound without cytotoxic activity. Macroscopic and histological analysis of wounds of rats treated with the cream containing TG1 show a possible healing activity. Through analysis *in vitro* and *in vivo* was proved antioxidant actions and inhibiting acetylcholinesterase, an enzyme associated with Alzheimer's disease. The TG1 was also able to improve memory deficits in rats. Studies indicate that TG1 has several pharmacological activities that can be best characterized for use in the formulation of novel dosage forms.

**Keywords:** 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol, *Platonia insignis* Mart., pharmacological properties, medicinal plants.

## 1. Introdução

Ao longo do processo evolutivo, o homem foi aprendendo a selecionar plantas para a sua alimentação e para o alívio de seus males e doenças. O resultado desse processo é que muitos povos passaram a dominar o conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais (Ferreira & Pinto, 2010). O conhecimento sobre plantas medicinais, muitas vezes representa a única alternativa de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda é possível encontrar nas regiões mais pobres do país e nos grandes centros brasileiros, plantas medicinais comercializadas em feiras livres, mercados populares, ou cultivadas em quintais residenciais (Funasaki et al., 2016; Maciel et al., 2002).

Muitas pesquisas que descrevem as atividades farmacológicas de drogas que têm sido desenvolvidas quando de sua incorporação em formas farmacêuticas, podendo dar origem a medicamentos e cosméticos e a flora brasileira é uma fonte rica de compostos bioativos que podem ser usadas para desenvolvimento de medicamentos, dentre estas espécies cita-se a planta medicinal *Platonia insignis* Mart. (Funasaki et al., 2016). A espécie *P. insignis* (Figuras 1A, 1B, 1C), conhecida como bacurizeiro, uma planta de grande importância econômica para alguns estados da região Nordeste, é destaque principalmente no Piauí, dada sua multiplicidade de usos, como planta frutífera, com aproveitamento dos frutos; como planta madeireira, para fabricação de móveis, ripas e estacas, além da extração do óleo das suas sementes (Costa Junior et al., 2011).

O bacuri (Figura 1C) é o fruto da espécie *P. insignis*, pertencente à família Clusiaceae, subfamília Clusioideae e ao gênero *Platonia*. No Nordeste do Brasil o fruto de *P. insignis* é



bastante consumido na forma de sorvetes, doces, geleias e sucos. Nas áreas de ocorrência natural, o bacurizeiro recebe diferentes denominações comuns. No Brasil seu uso na medicina popular é resultado das suas diversas propriedades, tais como, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e antioxidante (Ciochina, 2006; Santos Junior et al., 2010; Costa Júnior et al., 2011). As sementes do fruto possuem alto teor de óleo e são usadas no tratamento de eczemas e herpes (Agra et al., 2007). A “banha” dos óleos das sementes é utilizada no tratamento de feridas.

**Figura 1.** *Platonia insignis*: (A) Árvore, (B) Flores, (C) Frutos.  
Fonte: Santos *et al.*



Dentre os compostos estudados isolados de *P. insignis* destaca-se o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) que é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes desta espécie. Alguns estudos toxicológicos, histopatológicos e seu potencial terapêutico, entre outros, foram realizados. Porém, ainda há poucos relatos na literatura de testes farmacológicos descritos para este composto.

Neste contexto, este estudo objetivou realizar um levantamento sobre as atividades farmacológicas do composto TG1 através da pesquisa em trabalhos publicados, bem como as perspectivas na elaboração de fitomedicamentos com este composto.

## 2. Metodologia

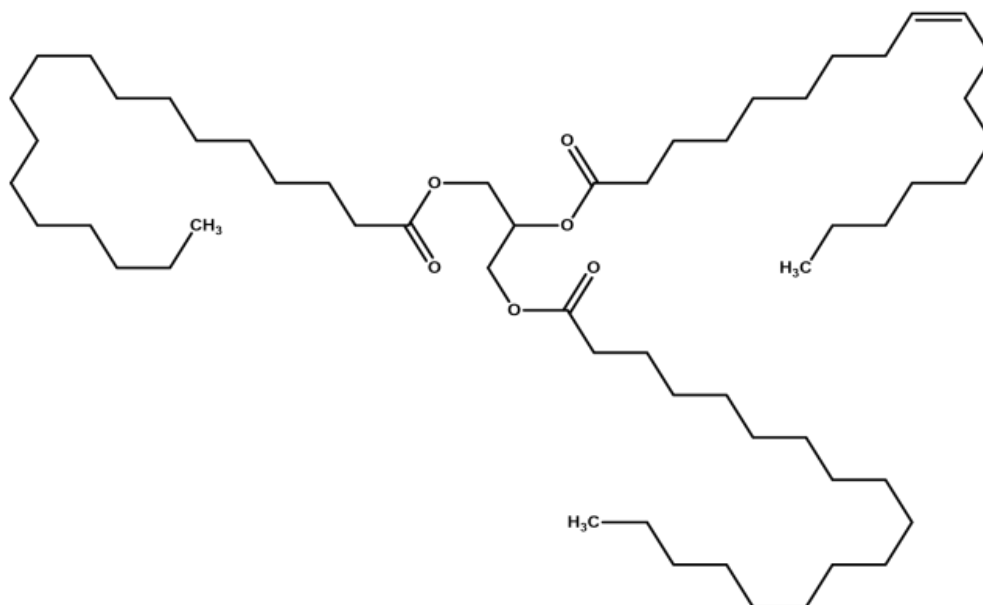
Foi realizada uma revisão na literatura de artigos científicos submetidos a revistas nacionais e internacionais com ampla divulgação na comunidade científica e através das bases de dados Google Academics, PubMed, Scielo e Sciencedirect, utilizando as seguintes palavras-chaves: *Platonia insignis* Mart., 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, atividades farmacológicas. Foram selecionados artigos, dissertações e teses publicadas nos últimos seis anos.

## 3. Revisão da literatura

### 3.1 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

O composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (Figura 2) também denominado de TG1 corresponde a um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes de *P. insignis*. É um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular  $C_{58}H_{112}O_6$  (Costa Junior, 2011). Após revisão da literatura sobre o TG1 verificou-se que ainda há relativamente poucas pesquisas sobre esse composto, justificando a necessidade e a importância da realização do presente estudo. Porém há relatos recentes sobre a citotoxicidade e seus potenciais terapêuticos a partir do extrato hexânico (Feitosa, 2016).

**Figura 2:** Estrutura química do composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol. Molecular structures were drawn with ChemDraw13. (Perkin Elmer)



### 3.2 Avaliação da toxicidade em ensaios pré-clínicos do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol

Foram realizados alguns estudos por Santos (2015) para avaliar a toxicidade aguda sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos, bem como análises histopatológicas em áreas cerebrais de ratos adultos tratados por via oral com TG1. Além disso, foi realizado testes para analisar a citotoxicidade *in vitro* em 2 linhagens de células tumorais. O tratamento dos animais com a dose de  $30 \text{ mg kg}^{-1}$  (v.o) com TG1 alterou apenas a hemoglobina corpuscular média (HCM) e hemoglobina corpuscular (CHCM) nos parâmetros hematológicos, em comparação com o grupo controle (Tabela 1). Os demais parâmetros permaneceram dentro dos

valores de referência e não demonstram importância clínica (Feitosa et al., 2016).

As análises da avaliação dos parâmetros bioquímicos foram obtidas em ratos submetidos aos ensaios toxicológicos, por via oral com TG1 durante 30 dias. Nesse grupo foram verificadas alterações nas análises para o ácido úrico, AST, bilirrubina total e direta, fostatase alcalina em comparação com o grupo controle ( $p < 0,05$ ) na dose testada.

**TABELA 1:** Parâmetros hematológicos de ratos wistar tratados com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) por via oral durante 30 dias consecutivos.

<b>PARÂMETROS</b>	<b>CONTROLE (N=10)</b>	<b>TG1 (N=10)</b>
<b>HEMÁCIAS (MM<sup>3</sup>)</b>	7,71 ± 0,19	7,51 ± 0,20
<b>HEMOGLOBINA (G.DL<sup>-1</sup>)</b>	12,60 ± 0,27	13,01 ± 0,72
<b>HEMATÓCRITO (%)</b>	41,21 ± 0,94	39,96 ± 0,79
<b>VCM (FL)</b>	53,70 ± 0,81	54,49 ± 0,95
<b>HCM (PG)</b>	16,44 ± 0,35	18,01 ± 0,69*
<b>CHCM (G.DL<sup>-3</sup>)</b>	30,62 ± 0,26	34,09 ± 0,85*
<b>PLAQUETAS (MM<sup>3</sup>)</b>	585,3 ± 79,87	552,9 ± 27,8

Fonte: Santos, 2015.

Na análise da citotoxicidade *in vitro* pelo método do 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT), uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas as saber: as linhagens tumorais utilizadas foram: NCIH (carcinoma de pulmão - humano) e HEP-2 (carcinoma de laringe humano). O TG1 foi diluído e testado na concentração de 25 µg/mL. A citotoxicidade foi avaliada pelo método do MTT descrito inicialmente por Mosman (1983), este método verifica a viabilidade e o estado metabólico da célula. É uma análise colorimétrica baseada na conversão do sal MTT em azul de formazan, a partir de enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol apresentou um percentual de inibição de 16% com erro de 1,4 para a linhagem de células HEP-2 (carcinoma de laringe humano) e para a linhagem NCI H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> (Carcinoma de pulmão humano) inibição de 12,6 com erro de 1,3. De acordo com a escala de intensidade para avaliação do potencial citotóxico, esses valores caracterizam como uma substância sem atividade citotóxica.

Nas análises histopatológicas em ratos Wistar tratados com o composto, estudos demonstraram alterações histopatológicas no tecido hepático de ratos adultos. Já o grupo tratado com veículo não apresentou nenhuma alteração histológica. No estudo histopatológico no corpo estriado de ratos adultos não foi observada nenhuma alteração nos ratos tratados com TG1 e no grupo veículo. Para o estudo histopatológico no hipocampo de ratos adultos foi verificada alterações apenas no hipocampo algumas células com núcleos picnóticos. Além disso, não foi observada nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado (Santos, 2015).

Nesse contexto e de acordo com o estudo realizado por Santos (2015), animais tratados com TG1 não apresentaram comprometimento das áreas cerebrais: corpo estriado e hipocampo e não produziram alterações significativas nas análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas cerebrais e hepáticas em ratos caracterizando uma baixa toxicidade.

### **3.3 Potencial cicatrizante**

Estudos realizados por Santos Júnior e colaboradores (2011) permitiram sugerir potente atividade cicatrizante para o óleo das sementes de *P. insignis*, ao realizar experimentos e acelerar o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Santos Júnior e colaboradores (2011) analisaram a cicatrização com o uso da “banha do bacuri” em feridas cutâneas no dorso de ratos. Os resultados apresentaram que a banha foi eficiente no tratamento e que os animais tratados demonstraram reepitelização considerável.

Mendes (2013) avaliou a atividade cicatrizante de uma formulação farmacêutica semissólida contendo o TG1 obtida a partir do extrato hexânico de *P. insignis* em ratos Wistar. A formulação farmacêutica consiste em um creme, o qual permite veicular princípios cosméticos em geral. Para a incorporação do composto ativo à base creme, foram adquiridas as formulações nas concentrações de 5, 10 e 15%.

Os ácidos graxos, diterpenos, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia longa fazem parte da composição do óleo das sementes do bacuri. Os ácidos graxos encontrados na banha do bacuri são: palmítico (na forma de tripalmitina), o oleico, esteárico e linoleico. Estudos sugerem que os ácidos graxos e outros lipídeos presentes na banha de bacuri podem favorecer o processo cicatricial (Costa Júnior et al., 2011).

As análises macroscópicas e histológicas das feridas dos ratos tratados com o creme contendo TG1 demonstram uma possível atividade cicatrizante do composto, o que destaca um potencial econômico e biológico da flora regional, possibilitando posterior desenvolvimento de fitomedicamentos para tratamento de feridas (Mendes, 2013).

### 3.4 Atividade anticolinesterásica de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1)

Houghton e Howes (2003) revisaram as bases farmacológicas de algumas plantas e de seus constituintes ativos que têm sido usados na medicina tradicional asiática para melhorar distúrbios cognitivos, tais como ocorrem na doença de Alzheimer (DA). Estes pesquisadores sugeriram que os extratos e as substâncias isoladas que melhoravam significativamente a memória e o comportamento apresentavam atividades anticolinesterásica e antioxidante comprovadas quando de estudos científicos *in vitro* ou *in vivo*. Isto demonstra o importante papel de substâncias, com essas propriedades, na terapêutica da DA. Além disso, estudos sugerem que o *estresse oxidativo* acelera os processos patológicos de várias doenças tal como a DA. Na DA há diminuição da memória e deposição de placas amiloides, sugerindo que substâncias antioxidantes possam ser reconhecidas como uma alternativa de tratamento para essa doença (Kanamaru et al., 2015).

Feitosa e colaboradores (2016) realizaram alguns testes para analisar a atividade anticolinesterásica e efeitos sobre a memória em ratos adultos do composto TG1. Dentre os testes cita-se o teste de esQUIVA passiva, teste do labirinto de cruz elevado e labirinto aquático de Morris. Além disso, foi realizado a determinação do efeito inibitório do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE) *in vitro* e *in vivo* avaliada pelo método descrito por Ellman (1961) e colaboradores e modificado por Rhee e colaboradores (2001).

Os resultados encontrados por Feitosa e colaboradores (2016) apresentaram promissores resultados de inibição *in vitro* frente à enzima AChE foram de: 95,9; 86,92 e 77,12% quando utilizada a rivastigmina (Exelon®) (controle positivo), uma droga bastante usada no tratamento da DA, em concentrações de 0,1, 0,05, 0,025%, respectivamente. Quando avaliada a atividade inibidora do composto foi verificado seguintes resultados para TG1: 0,1% (77,12%), 0,05% (72,34%), 0,025% (61,17%) e 0,0125% (20,21%) (Feitosa, 2016).

Neste estudo, os autores analisaram a atividade da enzima AChE em três regiões diferentes do cérebro de ratos a saber: hipocampo, córtex frontal e cerebelo. Os resultados sugeriram que tratamento com TG1 causou melhoria na aprendizagem e na memória, tal como evidenciado pela diminuição significativa no tempo necessário para os animais para encontrar a localização da plataforma no labirinto aquático de Morris. O composto ativo também foi capaz de melhorar os défices de memória em uma dose testada (30 mg kg<sup>-1</sup>), a memória de curto prazo (aprendizagem depois de alguns minutos), e memória de atraso (um dia depois de aprendizagem), como mostrado nestes estudos (Feitosa, 2016).

### 3.5 Potencial antioxidante

O estudo de Feitosa e colaboradores (2016) investigou a influência do TG1 na peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito, atividade da catalase e superóxido dismutase no hipocampo de ratos submetidos a testes de memória (Tabela 2). Os resultados neuroquímicos foram obtidos com grupos de ratos tratados com TG1 com a dose de 30 mg. kg<sup>-1</sup> (v.o.) e veículo. Foi observada no grupo tratado uma diminuição significativa de 88,49% na peroxidação lipídica e 76,89% do teor de nitrito e um aumento significativo de 51,97% na atividade da catalase e 45,53% na atividade da enzima superóxido-dismutase quando comparado ao veículo.

**TABELA 2:** Determinação dos níveis de substâncias reativas ao TBARS, conteúdo de nitrito, atividades de catalase e SOD no hipocampo de ratos tratados com TG1.

PARÂMETROS				
GRUPOS	TBARS (mmol/MDA/μg proteína)	NITRITO (μM)	CATALASE (U/μg of proteína)	SOD (U/μg of proteína)
<b>VEÍCULO</b>	1,39 ± 0,15	90,41 ± 1,22	14,45 ± 0,13	2,35 ± 0,14
<b>TG1</b>	0,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	20,90 ± 0,79 <sup>a</sup>	30,09 ± 2,23 <sup>a</sup>	3,42 ± 0,28 <sup>a</sup>

Fonte: Feitosa, 2016.

Os lipídeos vêm sendo usados como carreadores de fármacos, por otimizar a distribuição e absorção, melhorando a biodisponibilidade após administração oral, uma vez que melhoram a permeabilidade intestinal dos fármacos, e promovem também uma absorção seletiva nos tecidos alvos. E quando conjugados com medicamentos para administração parenteral, prolongam a meia-vida, e facilitam a entrega no local específico de ação potencializando seus efeitos farmacológicos (Hackett et al., 2012).

O composto TG1 é um triglicerídeo da classe dos lipídeos. Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, encontram-se nas mais diferentes formas de vida, respondendo por importantes funções nas membranas celulares e nos processos metabólicos (Yehuda et al., 2002). Os ácidos graxos poliinsaturados tem sido alvo de vários estudos. Destaca-se a sua importância, em diversas doenças, principalmente as degenerativas a saber: doença de Alzheimer, Parkinson e esclerose amiotrófica (Sumiyoshi et al., 2008).

O TG1 apresentou ações contra as espécies reativas de oxigênio, sugerindo que, após estudos mais aprofundados seja possível utilização destes em futuras formulações farmacêuticas, como terapia alternativa para várias doenças relacionadas com o *stress oxidativo*, tais como a doença de Alzheimer (Feitosa, 2016).

#### 4. Conclusão

Os estudos farmacológicos já realizados com o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), composto isolado do extrato hexânico da espécie *P. insignis* Mart. (bacurizeiro) indicam que esse composto é uma fonte promissora para a elaboração de possíveis fitomedicamentos a partir desta planta bastante consumida no Nordeste do Brasil. As propriedades apresentadas a saber: não citotóxica, cicatrizante, anticolinesterásica e antioxidante são importantes para a elaboração de medicamentos que possuam uma das propriedades farmacológicas já identificadas, com ação terapêutica de diversas doenças a saber: doença de Alzheimer.

#### 5. Referências

- Agra, M. F.; Freitas, P. F.; Barbosa-Filho, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 17, n.1. p. 114-140. 2007.
- Astarita, G.; Jung, K.; Berchtold, N.C.; Nguyen, V.Q.; Gillen, D.L. Deficient liver Biosynthesis of Docosahexaenoic Acid correlates with cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*. v. 5, p. 1-8. 2010.
- Chaves, D.A.S.; Costa, S.S.; Almeida, A.P.; Frattani, F.; Assafim, M.; Zingali, R.B.; Metabólitos secundários de origem vegetal: uma fonte potencial de fármacos antitrombóticos. *Química Nova*. v. 33, n.1, p.172-180. 2010.
- Ciochina, R.; Grossman, R.B. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chemical Reviews*, v. 106, p. 3963-86, 2006.
- Cito, A.M.G.; Costa Junior, J.S.; Santana L.C.L.R. ; Freitas, R.M.; Carvalho, F.A.A.; Ferraz, A.B.F. ; Saffi, J.; Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida. 2011, Brasil. Patente: Modelo Industrial. Número do registro: PI1101608-6, data de depósito: 15/04/2011, título: "Atividade do óleo das sementes de *Platonia insignis* Mart como leishmanicida"
- Costa Júnior, J.S.; Feitosa, C. M.; Citó, A.M.G.L.; Freitas, R.M.; Henriques, J.A.P.; Saffi, J.; Evaluation of effects of ethanolic extract (EE) from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine-induced seizures. *Journal of biological Science*, Vol. 10, pp.747-753, 2010.
- Costa Júnior, J. S.; Almeida, A. A. C.; Tomé, A. R.; Citó, A. M. G. L.; Saffi, J.; Freitas, R. M.; Evaluation of possible anticonvulsant effects of ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart. on epilepsy models. *Epilepsy & Behavior*. Vol. 22, pp. 678-684, 2011a.
- Costa Júnior, J. S.; Ferraz, A.; Feitosa, C. M.; Citó, A.M.G.L.; Saffi, J.; Freitas, R. M.; Evaluation of effects of dichloromethane fraction from *Platonia insignis* Mart. on pilocarpine induced seizures. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Vol. 21, pp. 1104-1110, 2011b.

- Costa Junior, J. S.; Ferraz, A. B. F.; Filho, B.A.B.; Feitosa, C.M.; Citó, A.M.G.L.; Freitas, R.M.; Saffi, J.; Evaluation of antioxidante effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. *Journal of Medicinal Plants Research*, Vol. 5, No.2, pp.293-299, 2011c.
- Costa Junior, J.S.; Almeida, A.A.C.; Ferraz, A.B.F.; Rossatto, R.R.; Silva, T.G.; Silva, P.B.N.; Militão, G.C.G.; Cito, A.M.G.L.; Santana, L.C.L.R.; Carvalho, F.A. A.; Freitas, R.M.; Citotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Natural Product Research* Vol.27, No.4-5, Pp. 470-474, 2013a.
- Costa Júnior, J. S. ; Ferraz, A. B. F. ; Sousa, T. O. ; Silva, R. A. C. ; Lima, S. G. ; Feitosa, C. M. ; Citó, A.M.G.L.; Cavalcante, A. A. C. M.; Freitas, R. M.; Speroto, A.R.M.; Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol.112, pp. 34- 41, 2013b.
- Costa Júnior, J.S.; Almeida, A.A.; Costa, J.P.; Citó, A.M.G.L.; Saffi, J. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. *Pharmaceutical Biology*. v. 50, n. 4:453-457. 2012.
- Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R.M.; A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*.; v. 7: 88-95. 1961.
- Feitosa, C.M.; Santos, P.R.P.; Freitas, R.M.; Rodrigues, A.M.X.; Oliveira, G.A.L.; Costa Junior, J.S.; Cavalcante, N.A.; Pre-clinical trials in rats treated with 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) chemical constituent isolated from *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) specie. *ConScientiae Saúde*. In press. 2016.
- Ferreira, V.F.; Pinto, A.C.A. fitoterapia no mundo atual. *Química Nova*, v. 33, p. 1829. 2010.
- Feitosa, C.M.; Chaves, S.K.M.; Santos, P.R.G.; Cavalcante, N.A.; Costa Júnior, J.S.; Rashed, K. Anticholine terase activity and effects on memory in adult rats of 1, 3-distearoyl-2-oleoylglycerol substance is lated from *Platonia insignis* mart. (bacurizeiro). *The Pharma Research*. v. 14, n. 2. 39-52. 2016.
- Funasaki, M.; Barroso, H.S.; Valdelira, V.L.A.; Menezes, I.S. Amazon rainforest cosmetics: chemical approach for quality control. *Quimica Nova*, v. 39, n. 2, p. 194-209, 2016.
- Hackett, M.J.; Zaro, J.L.; Shen, W.C.; Guley, P.C.; Cho, M.J. Fatty acids as therapeutic auxiliaries for oral and parenteral formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012
- Houghton, P.J.; Howes, M.J.R.; Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, v. 75, n. 3, 513-527. 2003.
- Kanamaru, T.; Kamimuraa, N.; Yokota, T.; Iuchi, K.; Nishimak, K.; Takami, S.; Akashiba, H.; Shitaka, Y.; Katsura, K.; Kimura, K.; Ohta, S. Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 587, p. 126-131. 2015.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga, J.R.; Grynberg, N.F.; Echevarria, A. Plantas Mediciniais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438. 2002.



- Mendes, C.S.M. Delineamento de um fitomedicamento a partir de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol isolado de *Platonia insignis* Mart: avaliação da atividade cicatrizante. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí. Teresina. p. 80. 2013.
- Moraes, R.L.B.; Gutjahr, E.; Química de Oleogenosas - Valorização da Biodiversidade Amazônica. Agência de Cooperação Técnica Alemã, 2009.
- Pereira, N.P.; Miguel, O.G.; Miguel, M.D.; Cunico, M. Promising new oil derived from seeds of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert produced in southern Brazil. *Journal Oil Chemist's Society*, v. 85, n. 5, p. 493-494. 2008.
- Rhee, K.I.; Van Rijn, M.R.; Verpoorte, R. Qualitative Determination of false-positive effects in acetylcholinesterase assay using thin-layer chromatography. *Phytochemical Analysis.*, v. 14. 2001.
- Santos Júnior, R.Q.; Soares, L.C.; Maia Filho, A.L.M.; Araujo, K.S.; Santos, I.M.S.P.; Costa Júnior, J.S.; Saffi, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). *ConScientiae Saúde*. V. 14, n. 4. 555-567. 2011.
- Santos P.R.G.; Feitosa, C. M.; Rodrigues, A.M.X.; Oliveira, G.A.L.; Costa Júnior, J.S.; Cavalcante, A.N.; Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol derivado de *Platonia insignis* Mart. *ConScientiae Saúde*. v. 9, n. 4: 575-581. 2015.
- Santos, P.R.G.; Carvalho, R.BF.; Costa Júnior, J.S.; Freitas, R.M.; Feitosa, C.M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 94, n. 2: 161-168. 2013.
- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis. 221-320p. 2000.
- Sumiyoshi, T.; Matsui, M; Itoh, H; Higuchi, Y ; ARAY, H; Takamiya, C; Kurachi, M; Essencial polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. *Psychiatry Research*. v. 157. p. 87-93, 2008.
- Yamaguchi, K.K.L.; Pereira, C.V.L.; Lima, E.S.; Veiga Junior, V.F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). *Scientia Amazonia*, v. 3, n.2, 39 – 46. 2014.
- Yehuda, S.; Rabinovitz, S.; Carasso, R.L.; Motofsky, D. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiology of Aging*. v. 23, p. 843-853. 2002.
- Zendegs, J.C.S.; Pimentel, G.D.; Priel, M.R. Ácidos graxos Omega 3 e tratamento da esquizofrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*. v. 37, n.5. p. 223-227. 2010.

**CAPÍTULO II: Desenvolvimento de uma formulação farmacêutica: Elaboração e caracterização do complexo de inclusão do 1,3- diestearil-2-oleoilglicerol com  $\beta$ -ciclodextrina.**

## **Elaboração de um complexo de inclusão a partir de um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro).**

Junior, R.S.S. Feitosa, C. M.

Programa de Pós-graduação em Química. Centro de Ciências da Natureza. UFPI, 2018.

### RESUMO

Dentre as riquezas da flora brasileira, a espécie *Platonia insignis* Mart., conhecida como bacurizeiro, é uma planta de grande importância econômica para alguns estados da região Nordeste. O bacuri é o fruto da espécie *P. insignis* Mart., e apresenta em sua semente, dentre outros compostos, o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1). Trabalhos demonstram que TG1 em estudos *in vivo* com camundongos tem mostrado um efeito benéfico sobre o *défice* de aprendizagem e de memória, além de outras relevantes atividades farmacológicas. Diante disso, este estudo teve como objetivo obter e caracterizar uma formulação farmacêutica a partir de complexos de inclusão do composto TG1 com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) visando a melhoria de suas propriedades como sua solubilidade, já que, formação do complexo de inclusão facilita, em alguns casos, a solubilização de substâncias pouco solúveis. O preparo foi feito utilizando-se a técnica de malaxagem e a caracterização foi feita através das técnicas, a saber: espectroscopia na região do infravermelho, análise termogravimétrica, difração de raios-X e calorimetria exploratória diferencial. Estas técnicas evidenciaram a formação de complexos de inclusão entre TG1 e  $\beta$ -CD. Portanto, os resultados obtidos são promissores para elaboração de uma futura formulação farmacêutica com o complexo.

**Palavras-chave:** 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, Ciclodextrina, Complexo de inclusão, Formulação farmacêutica.

## **Elaboracion of a inclusion complex from an isolated constituent of *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro).**

Junior, R.S.S.; Feitosa, C. M.

Post-graduate Program in Chemistry. Center for Nature Sciences. UFPI, 2018.

### **ABSTRACT**

Among the riches of Brazilian flora, *Platonia insignis* Mart., known as bacurizeiro, is a plant of great economic importance for the states of the Northeast region. The bacuri is the fruit of *P. insignis*, which contains 1,3-distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1) in its seed. Studies demonstrate that TG1 in *in vivo* studies with mice has shown a beneficial effect on learning and memory deficits, in addition to other relevant pharmacological. This study was aimed to obtain and characterize a pharmaceutical formulation from inclusion complexes of TG1 with  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD). The formation of the inclusion complex facilitates in some cases the solubilization of poorly soluble substances. The preparation was done by using the technique of malaxing and the characterization was made by infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, X-ray diffraction and differential scanning calorimetry. These techniques evidenced the possible formation of inclusion complexes between TG1 and  $\beta$ -CD. The results obtained are promising for the preparation of a future pharmaceutical formulation with the complex.

**Keywords:** 1,3-diasteroyl-2-oleoylglycerol, Cyclodextrin, Inclusion complex, pharmaceutical formulation.

### **1. Introdução**

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por várias populações com o intuito de tratar diversas patologias. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam sendo utilizados e, estima-se que, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários (Calixto, 2005; Veiga Junior e Mello, 2008).

Considerando-se somente o Brasil, a magnitude de sua biodiversidade não é conhecida com precisão tal a sua complexidade, estimando-se a existência de mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos, o que o torna o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (Guerra e Nodari, 2010).

Dentre a diversidade vegetal do Brasil a família Clusiaceae compreende 49 gêneros com larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Para o Brasil, estão registradas 183 espécies, subordinadas a 21 gêneros, com ampla distribuição (Heywood, 1993). Dentre os gêneros da família Clusiaceae, *Platonia* é um dos maiores. *Platonia insignis* Mart., é uma

espécie frutífera e madeireira, tem origem na Amazônia Oriental Brasileira, no Estado do Pará e é encontrada em todos os estados da Região Norte do Brasil e no Mato Grosso, Maranhão e Piauí e fora do território Nacional (Souza et al., 2000; Moura et al., 2007; Carvalho, 2008).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com extratos e compostos isolados da espécie *P. insignis* indicam que os compostos isolados ou extratos são fontes promissoras para a elaboração de possíveis fitomedicamentos a partir dessa planta, bastante consumida no Nordeste do Brasil (Santos et al, 2012).

A literatura registra diversos estudos farmacológicos e toxicológicos da casca, da polpa e da semente do bacuri (Rufino et al., 2010; Santos *et al.*, 2010; Costa Júnior et al. 2010, 2011, 2012, 2013; Lustosa, 2012). De acordo com Costa Júnior e colaboradores (2011), o estudo fitoquímico das sementes, realizado por meio da análise do extrato hexânico (EH) revelou potencial atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *L. amazonenses*, resultado semelhante foi reportado nesse mesmo estudo para as frações acetato de etila (ACE) e diclorometano (DCM), extraídas do extrato etanólico (EE), sendo a última, de desempenho superior as identificadas.

Dentre os compostos isolados de *Platonia insignis* o composto 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol também denominado de TG1 corresponde a um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes. É um derivado da trioleína, solúvel em solventes apolares. Possui fórmula molecular  $C_{58}H_{112}O_6$ . Sua composição química é definida como C (76,93%), H (12,47%), O (10,60%), e peso molecular 856 g/mol (Costa Junior, 2011).

Os estudos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol são promissores visto que este, demonstrou potente atividade anticolinesterásica, cicatrizante e antioxidante. O composto TG1 apresentou ações contra as espécies reativas de oxigênio, sugerindo que, após estudos mais aprofundados seja possível utilização destes em futuras formulações farmacêuticas, como terapia alternativa para várias doenças relacionadas com o *stress oxidativo*, em particular para doenças relacionadas com o sistema nervoso, como a doença de Alzheimer (Feitosa, 2016). No entanto, algumas propriedades do TG1 são limitadas como, por exemplo, sua solubilidade em água, sugerindo meios alternativos para melhorar essas deficiências para esse composto.

A formação de complexos de inclusão entre fármacos pouco solúveis em meio aquoso e ciclodextrinas (CDs) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para a melhora no perfil de solubilidade de fármacos com baixa solubilidade. Alguns trabalhos demonstram que a formação do complexo de inclusão fármaco/ciclodextrina induz a um aumento significativo da biodisponibilidade, estabilidade e solubilidade de fármacos complexados (Del Valle, 2004; Loftsson, 2005).

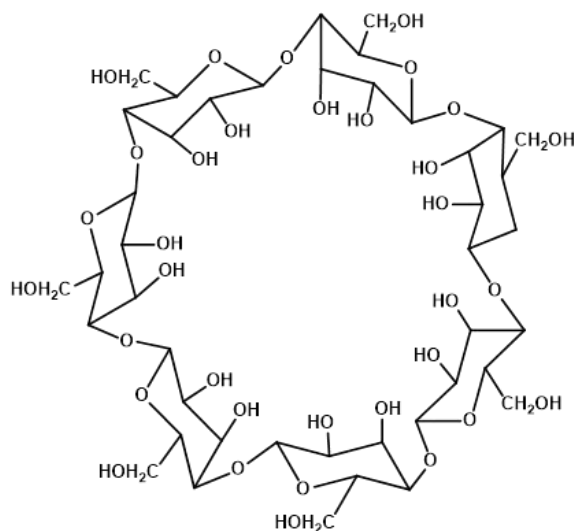
As CDs também são conhecidas como moléculas hospedeiras típicas, sendo as moléculas por elas encapsuladas designadas por moléculas hóspedes. Desta associação resultam complexos do tipo hóspede-hospedeiro ou complexo fármaco-CD, no caso da molécula hóspede ser um fármaco, também designado de complexo de inclusão. Os complexos de inclusão são, portanto sistemas compostos por duas ou mais moléculas, nas quais uma delas, a hospedeira, inclui total ou parcialmente, sem estabelecer ligações covalentes, uma molécula hóspede (Szejtli, 1988).

Sendo assim, é percebida a importância dos estudos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol provenientes da *Platonia insignis* Mart., dado o seu potencial farmacológico e terapêutico. Dessa forma, O objetivo desse estudo foi realizar o delineamento de uma formulação farmacêutica sólida a partir da elaboração de um complexo de inclusão entre a  $\beta$ -CD e o TG1 e posteriormente será realizado um teste cometa para avaliar a genotoxicidade do mesmo em camundongos.

## 1.2 Ciclodextrinas

As CDs são atualmente um dos carreadores de moléculas mais estudados, atraindo a atenção de investigadores tanto no campo de pesquisa como no campo de tecnologias aplicadas (Venturini et al., 2008). Também conhecidas como cicloamiloses ou ciclomaltoses, as CDs foram descobertas por Villiers em 1891, quando obteve uma pequena quantidade de material cristalino após a hidrólise do amido com *Bacillus amylobacter*, o qual denominou de celulosina, no entanto os primeiros detalhes de sua preparação, descrição e isolamento foram descritos por Schardinger em 1903 (Del Valle, 2004).

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos obtidos a partir da degradação enzimática do amido, possuindo estrutura cíclica formada por unidades de Dglucopiranosose ligadas através de ligações  $\alpha$  (1-4). Estas moléculas possuem conformação tronco-cônica, com superfície externa hidrofílica e cavidade interna hidrofóbica (Mura, 2014). As ciclodextrinas naturais mais comuns apresentam seis, sete ou oito unidades de D(+)-glicopiranosose unidas por ligações  $\alpha$ (1,4) e denominam-se  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -ciclodextrinas, respectivamente (Saltão & Veiga, 2001).



**Figura 3.** Estrutura da  $\beta$ -ciclodextrina

As características de inclusão das ciclodextrinas naturais podem ser alteradas pela introdução de substituintes nas hidroxilas disponíveis. A dimetil- $\beta$ -ciclodextrina normalmente apresenta melhores características de inclusão, especialmente no que diz respeito à dimensão da cavidade apolar, do que a  $\beta$ -ciclodextrina (Figura 3). O uso de derivados lipofílicos (etilados ou acetilados) permite que moléculas hidrofílicas possam ser incluídas na cavidade das ciclodextrinas a partir de solventes menos polares do que o interior da cavidade (Saltão & Veiga, 2001). Algumas propriedades físico-químicas das CDs são descritas na Tabela 3.

**TABELA 3:** Propriedades físico-químicas das Ciclodextrinas.

Propriedades	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Numero de unidades de glicose	6	7	8
Massa molar ( $\text{g mol}^{-1}$ )	972	1135	1297
Solubilidade em água a 25 °C ( $\text{g}/100 \text{ mL}$ )	14,5	1,85	23,2
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7 – 5,3	6,0 - 6,5	7,5 – 8,3
Diâmetro externo da cavidade (Å)	14,6	15,4	17,5
Volume da cavidade (Å) <sup>3</sup>	174	262	472
Forma dos cristais	Lâminas hexagonais	Paralelogramos monoclinicos	Prismas quadráticos

Fonte: Del Valle, 2004

O uso de ciclodextrinas (CDs) em aplicações farmacêuticas envolvendo solubilização, tem se expandido exponencialmente a cada década. Isto se deve ao fato das ciclodextrinas possuírem propriedades complexantes capazes de promoverem o aumento da solubilidade, dissolução e biodisponibilidade de fármacos poucos solúveis. As CDs funcionam como

transportadores moleculares, carregando as moléculas hidrofóbicas hóspedes em solução até as membranas celulares lipofílicas, facilitando sua absorção (Guedes et al., 2008).

### **1.3 Complexos de inclusão**

A habilidade das CDs de formarem complexos de inclusão depende essencialmente da compatibilidade estérica e dos critérios de polaridade existentes com a droga. Além disso, as forças que dirigem a complexação têm sido atribuídas à alta energia de repulsão da água na cavidade das CDs, às interações de Van der Waals, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (Van de Manakker et al., 2009).

As moléculas complexadas permanecem normalmente orientadas em uma posição onde há o máximo contato entre sua porção hidrofóbica e a cavidade apolar, estando sua porção hidrofílica em contato com os grupos hidroxila da CD (Frömming; Szejtli, 1994). O complexo de inclusão formado entre CDs e moléculas hóspedes é um equilíbrio dinâmico, em que se tem a molécula hóspede constantemente se associando e desassociando da cavidade da CD (Stella et al., 1999; Astray et al., 2009).

Em solução aquosa, a cavidade hidrofóbica das CDs está preenchida com moléculas de água. Por apresentar um microambiente termodinamicamente desfavorável, as moléculas de água tendem a sair e entrar com dificuldade. Assim, uma molécula hóspede, quando adicionada à solução de CD, expulsa as de água e ocupa a cavidade (Matioli, 2000).

Estudos mostram que mais de 40% dos insucessos no desenvolvimento de novos fármacos se devem a limitações farmacotécnicas como baixa capacidade de dissolução e permeabilidade (Davis; Brewster, 2004). A capacidade das CDs em modificar propriedades de moléculas pouco solúveis em água faz com que as mesmas sejam úteis no aumento da absorção de fármacos através de barreiras biológicas, podendo ser utilizadas como carreadores em formulações de liberação imediata, por exemplo (Uekama, 2004).

### **1.4 Elaboração de complexos de inclusão**

#### **1.4.1 Em estado sólido**

A estrutura sólida de misturas binárias entre fármaco e CD pode ser bastante diferente das encontradas em soluções aquosas. Nestas, há um equilíbrio dinâmico entre as moléculas em um meio polar, enquanto que os sistemas sólidos são estáticos e sofrem limitada influência do seu conteúdo aquoso residual. A maioria dos métodos de preparação de complexos sólidos



inclui diferentes graus de solubilização como etapa intermediária do seu processo de obtenção. A presença da água solubiliza os componentes e favorece a interação hidrofóbica entre a molécula hóspede e a CD. Em alguns casos, a água fomenta a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxílicos e auxilia a captação e manutenção do fármaco na cavidade da CD, fazendo parte da estrutura cristalina do complexo no estado sólido (Hedges, 1998).

Os sistemas farmacêuticos sólidos contendo fármaco e CD são estruturas heterogêneas que podem estar constituídas pelos seus componentes individuais não complexados, e/ou por diferentes tipos de associações entre eles, como na forma de complexos de inclusão de diferentes estequiometrias e níveis de inclusão ou como agregados com variável estado cristalino ou amorfo. Por esta razão, a eficiência de complexação (relação entre fármaco livre e complexado) destes sistemas é completamente dependente do processo de preparação (Cunha-Filho, 2007). Devido às características particulares inerente a cada sistema binário F-CD, não existe uma técnica geral de preparação. As condições devem ser definidas para cada molécula hóspede. Nesta seção serão discutidos os métodos mais comumente utilizados na obtenção de complexos sólidos, avaliando os diferentes aspectos envolvidos.

#### **1.4.2 Mistura física**

Este método baseia-se na simples mistura dos componentes sem adição de água. Em alguns casos são necessários vários dias para detectar-se a formação de complexos de inclusão. Em geral é um método de complexação pouco eficiente, restrito a princípios ativos líquidos, como a essência de limão, que atua como solvente, propiciando a encapsulação dos óleos essenciais em escassos minutos (Hedges, 1998).

#### **1.4.3 Malaxagem**

Consiste em formar uma pasta a partir da adição da mínima quantidade de líquido (água ou misturas etano-aquosas) suficiente para umedecer a mistura em pó de fármaco e CD. Em escala laboratorial, é realizada em um almofariz com auxílio de um pistilo (Fernandes & Veiga, 2002; Cirri et al., 2005; Cunha-Filho et al., 2007). Industrialmente, a mistura de componentes é efetuada em uma malaxadora. A secagem do material pode ser feita em estufa ou diretamente na malaxadora acompanhada de pulverização para uniformizar o tamanho de partícula. Variações desta técnica utilizando extrusores de calor ou granuladores de leito fluidizado são reportadas (Zema et al., 2001; Mura et al., 2005). Devido à simplicidade e à facilidade de

transposição de escala, este método é um dos mais utilizados na indústria farmacêutica, ainda que sua eficiência de complexação seja inferior a conseguida com outras técnicas.

## **1.5 Caracterização de complexos de inclusão**

### **1.5.1 Métodos térmicos**

Os métodos térmicos são amplamente utilizados na caracterização das CDs e dos seus complexos, principalmente pela rapidez das análises (Figueiras et al., 2007). Apesar de algumas limitações e da necessidade de utilizar outras técnicas complementares para uma informação mais precisa, este ensaio consegue, em muitos casos, proporcionar informações quantitativas quanto ao grau de complexação, além de informações valiosas da estabilidade do sistema. Conforme mostra a literatura (Cunha-Filho et al., 2007). Entre os métodos mais utilizados, pode-se citar a termogravimetria (TG), os sistemas termoanalíticos (TAS), a cromatografia pirolítica de gases e a calorimetria diferencial exploratória (DSC).

### **1.5.2 Técnicas espectroscópicas**

A técnica de espectroscopia de infravermelho é bastante utilizada para a avaliação da ocorrência de interações entre diferentes moléculas no estado sólido, mediante comparação das bandas da molécula hóspede e do carreador, com o complexo (Larkin, 2011). Melhorias importantes na precisão e sensibilidade dos equipamentos mais recentes e a utilização de modelos matemáticos, tornam possível obter informações mais confiáveis sobre a conformação espacial dos complexos de inclusão (Iliescu et al., 2004).

### **1.5.3 Técnicas cristalográficas com Raio-X**

Entre as técnicas cristalográficas, a difração de raio-x do pó (XRPD) é a mais empregada devido a sua simplicidade e rapidez. Uma comparação dos difratogramas do sistema tratado com o perfil difratométrico dos seus componentes separados é realizada. Diferenças nas amostras tratadas, como surgimento ou desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades relativas, constituem indícios de formação de complexos (Cao et al., 2005). Inferências quantitativas sobre o grau de cristalinidade dos sistemas também podem ser realizadas. Outra técnica mais sofisticada, o ensaio de difração de raios X do monocristal, é o único capaz de estabelecer com precisão a estrutura geométrica do cristal formado (Cunha-Filho et al., 2007).

#### **1.5.4 Propriedades de dissolução**

Os estudos de dissolução constituem um dos mais importantes testes *in vitro*, uma vez que fornecem informações que permitem relacionar de forma mais estreita as possíveis melhoras na biodisponibilidade do fármaco na forma de complexo. Este ensaio evidencia não somente os incrementos de solubilidade intrínseca conseguidos pela encapsulação molecular do fármaco, mas também permite o estudo cinético da liberação. O procedimento experimental costuma seguir requerimentos farmacopéicos e obedecem às condições Sink, no entanto, variações deste método são admitidas quando coerentemente justificadas segundo diferentes autores (Fernandes et al., 2002; Mura et al., 2005; Cunha-Filho et al., 2007).

### **2. Materiais e Métodos**

O TG1 foi obtido das sementes do fruto da espécie *Platonia insignis* Mart.. O isolamento e a identificação do TG1 utilizado neste estudo foram descritos (Feitosa, 2016). A  $\beta$ -ciclodextrina foi adquirida da Sigma Chemical. Utilizou-se água purificada e os outros solventes utilizados foram de grau analítico.

Os complexos de inclusão de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol/ $\beta$ -ciclodextrina foram preparados na razão molar 1:1 e 1:2 (mol/mol), utilizando-se a técnica de malaxagem. Brevemente, uma pequena quantidade de água foi adicionada a mistura de TG1 com  $\beta$ -ciclodextrina. Essa mistura foi homogeneizada por 60 minutos com auxílio de gral e pistilo e, em seguida, mantida em dessecador por 24 horas a temperatura ambiente.

#### **2.1 Caracterização do complexo 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol/ $\beta$ -ciclodextrina**

##### **2.1.1 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)**

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos nos comprimentos de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  em um aparelho Shimadzu<sup>®</sup>, modelo IR Prestige-21. As amostras foram preparadas pela técnica de pastilhas de KBr.

##### **2.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)**

A caracterização térmica através de análise termogravimétrica foi realizada em equipamento Shimadzu<sup>®</sup>, modelo TGA-50, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>, massa das amostras 3 mg ( $\pm 0,5$ ) acondicionadas em porta amostra de alumina e a faixa de temperatura foi da ambiente à 600 °C, em razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### **2.1.3 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

A caracterização térmica através de calorimetria exploratória diferencial foi realizada em equipamento Shimadzu<sup>®</sup>, modelo DSC-60, em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min<sup>-1</sup>, massa das amostras 8 mg ( $\pm 1$ ) acondicionadas em cadinhos de alumina e a faixa de temperatura foi da ambiente à 600 °C, em uma razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### **2.1.4 Difração de raios-X (DRX)**

O difratograma foi difratômetro Shimadzu<sup>®</sup> (X-Ray Diffractometer, LabX XRD-6000), equipado com ânodo de cobre, em voltagem de 40 Kv e uma corrente de 30 mA. As amostras foram preparadas em suportes de vidro com uma fina camada de material em pó sem solvente.

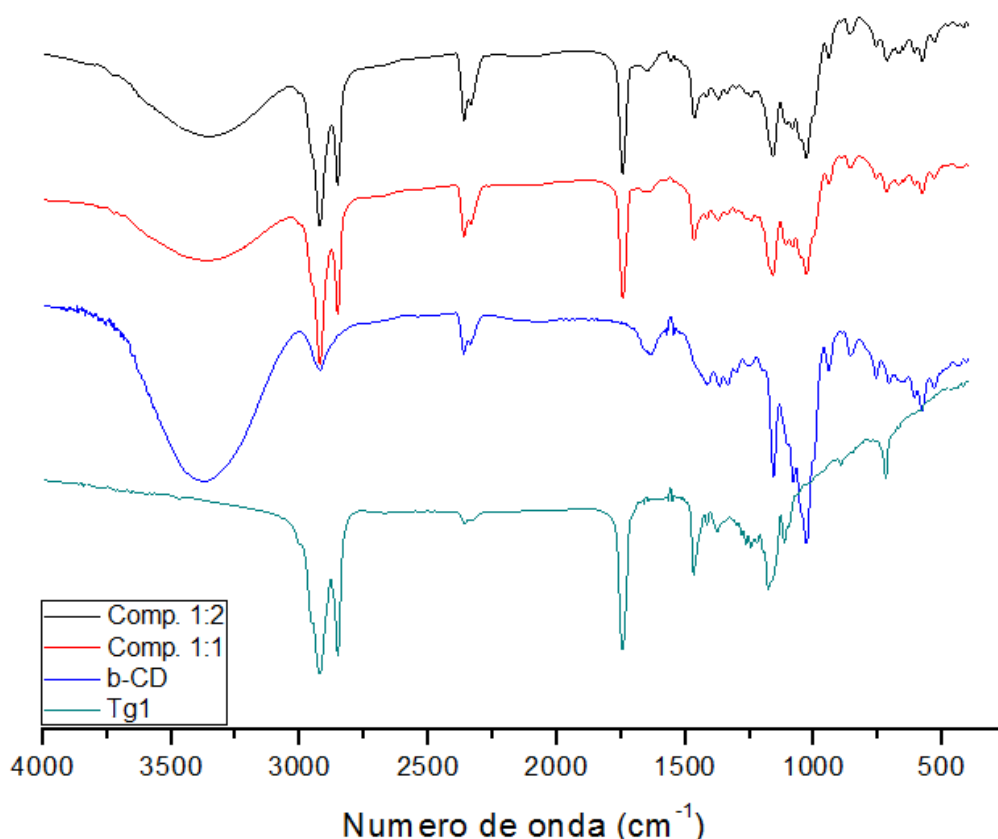
### **2.1.5 Ensaios de dissolução**

As amostras analisadas foram encapsuladas com o equivalente a 1 mg de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol e 1 mg de complexo de inclusão TG1: $\beta$ CD. Utilizou-se equipamento dissolutor (Nova Ética – Modelo 299), aparato pá a 50 rpm. O meio de ensaio foi 900 ml de solução aquosa de HCl, pH 1,3 e temperatura de 37 °C  $\pm$  0,5 °C, a fim de permitir que a realização do ensaio ocorresse em condições análogas às verificadas no trato gastrointestinal (condições *Sink*). Foram coletadas alíquotas de 5 ml, nos tempos de 5, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos e, imediatamente, filtradas em papel filtro JP 40 (25  $\mu$ m). Após filtração, as concentrações das amostras, em triplicata, foram determinadas por espectrofotometria UV-Vis (Espectrofotômetro UVmini-1240 Shimadzu<sup>®</sup>) no comprimento de onda  $\lambda=235$  nm.

## **3. Resultados e Discussão**

### **3.1. Espectroscopia na região do infravermelho**

As técnicas de espectroscopia de infravermelho são bastante utilizadas na caracterização de sistemas com CDs. A formação dos CIs na fase sólida pode ser avaliada pela comparação de espectros de IV do fármaco puro e dos complexos obtidos por diferentes métodos de preparação (Spricigo, 2008). Para isso, são verificadas interações em nível molecular, detectando as mudanças significativas na forma, posição ou intensidade das faixas de absorbância. Os espectros IV da  $\beta$ -CD, TG1 e dos complexos 1:1 e 1:2 são apresentados na Figura 4.



**Figura 4.** Espectros de infravermelho. TG1,  $\beta$ -CD, Complexos 1:1 e 1:2.

O espectro de infravermelho da  $\beta$ -CD mostrou banda de absorção próxima a  $3340\text{ cm}^{-1}$  (estiramento O – H),  $2920\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C – H), A banda em  $1633$  corresponde a deformação do tipo H-O-H, estas bandas foram confirmadas em estudos anteriores realizados por Rodrigues et al. (2010). Outras bandas também podem ser observadas com em  $1170\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C – O) e próximo a  $1000\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C – O – C).

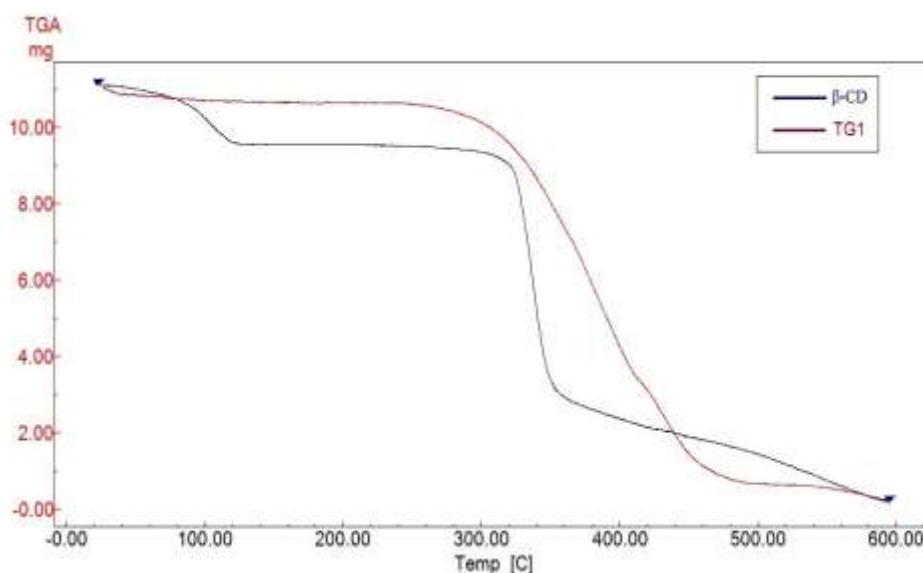
O espectro de IV do TG1 mostrou bandas de absorção entre  $2900$  e  $2700\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C – H), próximo a  $1750\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C = O), em  $1500$  (deformação  $\text{CH}_2$ ) e na região de  $1170\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C – O). Em geral, as bandas característicos das ligações duplas estão na região de  $1680\text{ cm}^{-1}$  –  $1620\text{ cm}^{-1}$  (Lopes, 2004). Para o espectro de infravermelho do TG1 não é possível notar de forma clara uma banda de absorção nessa região referente a dupla ligação da molécula, mas é possível observar um pico próximo a  $690\text{ cm}^{-1}$  que

se referem a olefinas onde as ligações C – H que participam da ligação dupla (C = C) estão fora do plano (Lopes; Fascio, 2004), este pico não está visível nos espectros do complexos sugerindo que o encapsulamento ocorre na parte do TG1 onde está a insaturação.

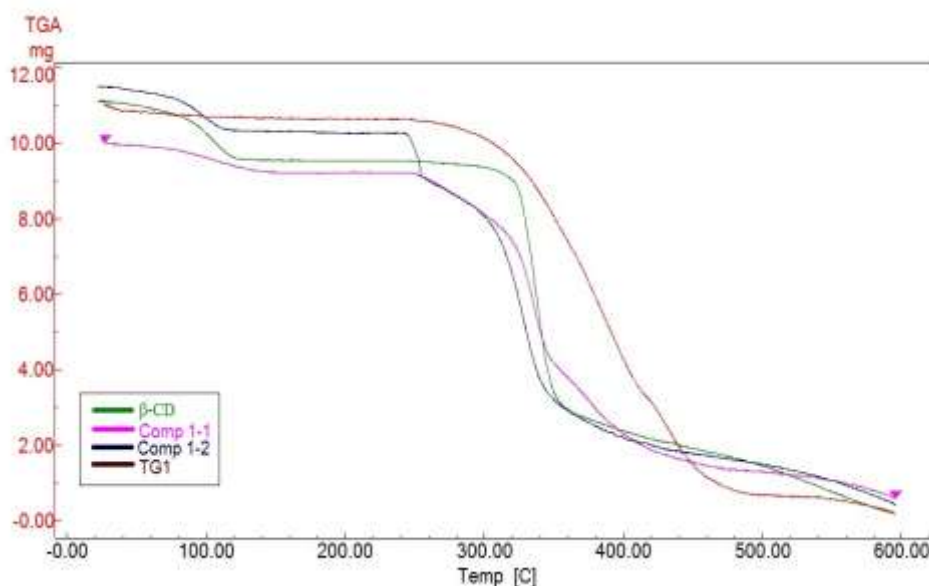
O espectro de infravermelho dos complexos de inclusão mostra picos característicos tanto da  $\beta$ -CD quanto do TG1, sugerindo pouca interação entre as moléculas. No entanto, observou-se que a banda de estiramento OH da  $\beta$ -CD próximo a  $3340\text{ cm}^{-1}$  teve uma acentuada redução de intensidade nos espectros dos complexos de inclusão nas duas frações molares, sugerindo que estas ligações possivelmente estão implicadas na formação destes complexos, visto que a inserção de uma molécula-hóspede no interior da cavidade da  $\beta$ -CD provoca uma restrição conformacional, reduzindo a movimentação das moléculas encapsuladas, reduzindo a intensidade do sinal. Alterações do espectro nessa região também foram percebido por Cao (2005), quando preparou complexos de inclusão com o sistema scutellarin/ $\beta$ -ciclodextrina.

### 3.2 Análise termogravimétrica

Uma forma muito comum de se verificar a formação de complexos de inclusão utilizando análise termogravimétrica (TGA) é comparar a temperatura de início de degradação da molécula isolada com a do suposto complexo. Caso tenha ocorrido a complexação, o início da perda de massa da molécula hóspede ocorrerá a temperaturas diferentes (Araújo et al, 2008). A Figura 5 mostra a TGA para  $\beta$ -CD, TG1 e os termogramas relacionados com os CIs.



(a)



(b)

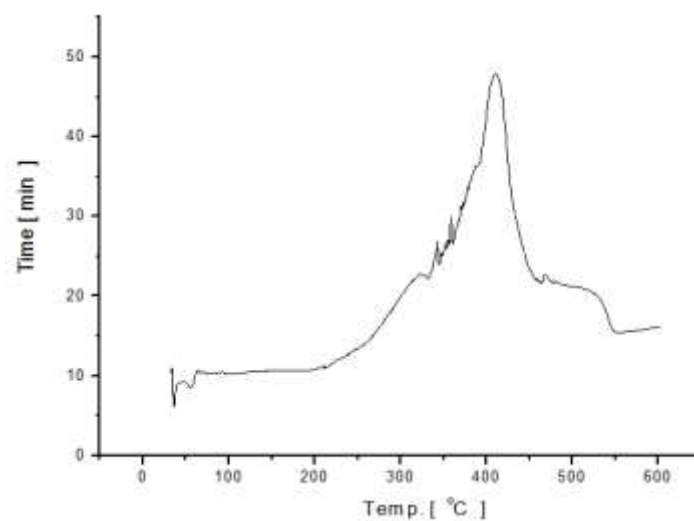
**Figura 5:** Termogramas : (a) TG1 e  $\beta$ -CD; (b) TG1,  $\beta$ -CD e Complexos de inclusão.

A TGA mostrou evidências de duas zonas em que a  $\beta$ -CD perdeu massa. A primeira zona próxima a 100 °C, com uma perda de massa de quase 1 mg que pode ser atribuída à evaporação da água superficial associada com a ciclodextrina. A segunda em torno 310 °C que pode estar relacionada com a degradação do  $\beta$ -CD ocorrendo perda de cerca de 6 mg de massa (Burgos et al., 2012). No TG1, foi possível observar um processo único a partir de 300 °C onde a massa do triglicerídeo foi reduzida. Em relação à análise TGA dos complexos de inclusão, Na Figura 5b vemos que o termograma relacionado com as substâncias individuais apresentam algumas diferenças das CIs, nas zonas em que a perda de peso é observada. Na curva de TG do CI na fração molar 1:2, notamos a presença de um evento com perda de massa acima de 200°C, sendo essa perda não muito significativa, cerca de 0,7 mg. Isso é um forte indicativo de inclusão da substância hospede e a consequente formação do complexo, comprovando a eficácia da metodologia utilizada na obtenção do mesmo (Liu et al., 2013).

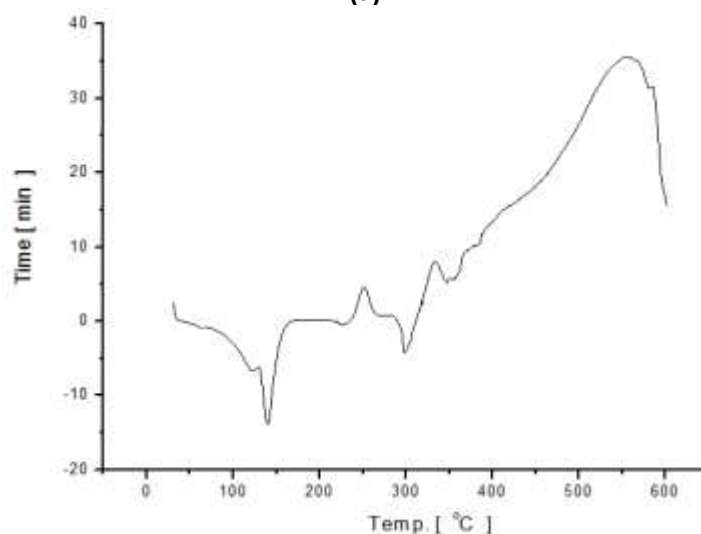
Além disso, uma ligeira modificação na temperatura de degradação é evidenciada. Entretanto, não há nenhuma evidência que a estabilidade térmica do TG1 é aumentada quando complexada. Em alguns casos a estabilidade térmica da substância encapsulada pode ser aumentada. Em estudo de Ishiguru e Agashi (1995), por exemplo, a TGA foi usado para determinar a fração de ácido linoleico (LA) e docosa-hexatíioato de etilo (ED), incluídos na  $\beta$ -CD, com base na estabilidade térmica melhorada dos ácidos gordurosos obtidos por complexos de inclusão, que mudou seu perfil de perda de peso em função da temperatura (Mura 2015).

### 3.3 Calorimetria exploratória diferencial

Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma das técnicas mais utilizadas para confirmar a formação de CIs no estado sólido, devido a sua sensibilidade em detectar alterações nos eventos térmicos característicos da molécula hóspede quando esta se encontra na cavidade da ciclodextrina, bem como a estabilidade do sistema e sua cristalinidade (Araújo, 2008).



(a)



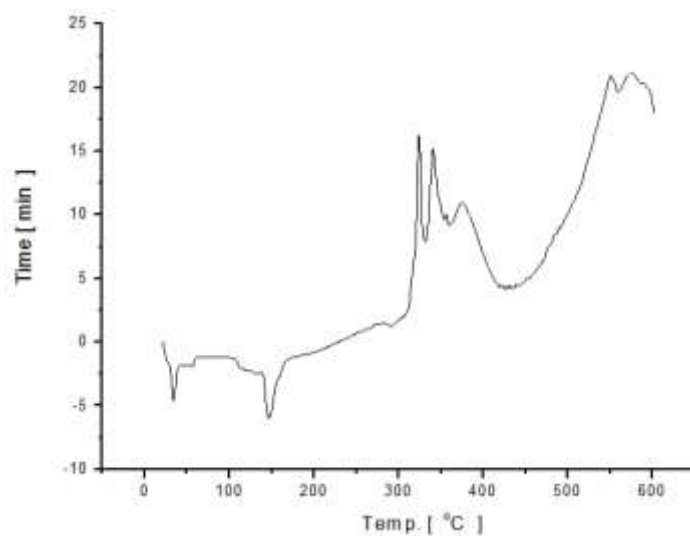
(b)

**Figura 6.** (a) Termograma do TG1; (b) Termograma da  $\beta$ -CD

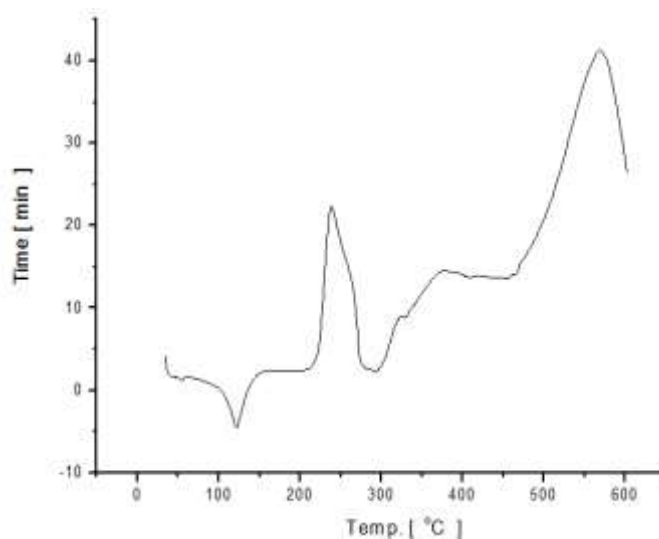
A análise por DSC da  $\beta$ -CD mostrou na Figura 6 um pico endotérmico em cerca de 140 °C que está associada com a perda de água (Pinto et al., 2005). Este pico está muito reduzido ou deslocado nos termogramas dos CI mostrado na figura 7, indicando um possível deslocamento das moléculas de água por moléculas de TG1, evidenciando que ocorreu a formação do complexo. Os picos endotérmicos e exotérmicos a partir de 300 °C estão



associados à degradação e a perda de massa da  $\beta$ -CD. Para o TG1, foi possível observar a presença de um largo pico exotérmico com um máximo a 400 °C associado a degradação do composto. É importante notar que o processo se inicia somente a partir de 200 °C, o qual coincide com a baixa volatilidade do composto.



(a)



(b)

**Figura 7.** (a) Termograma do complexo de inclusão na fração 1:1; (b) Termograma do complexo de inclusão na fração 1:2.

Na figura 7 podemos observar que os termogramas dos complexos de inclusão mostram desaparecimento do pico do TG1, o que indicaria encapsulamento molecular do agente ativo no interior da cavidade da  $\beta$ -CD e não meramente uma mistura física.

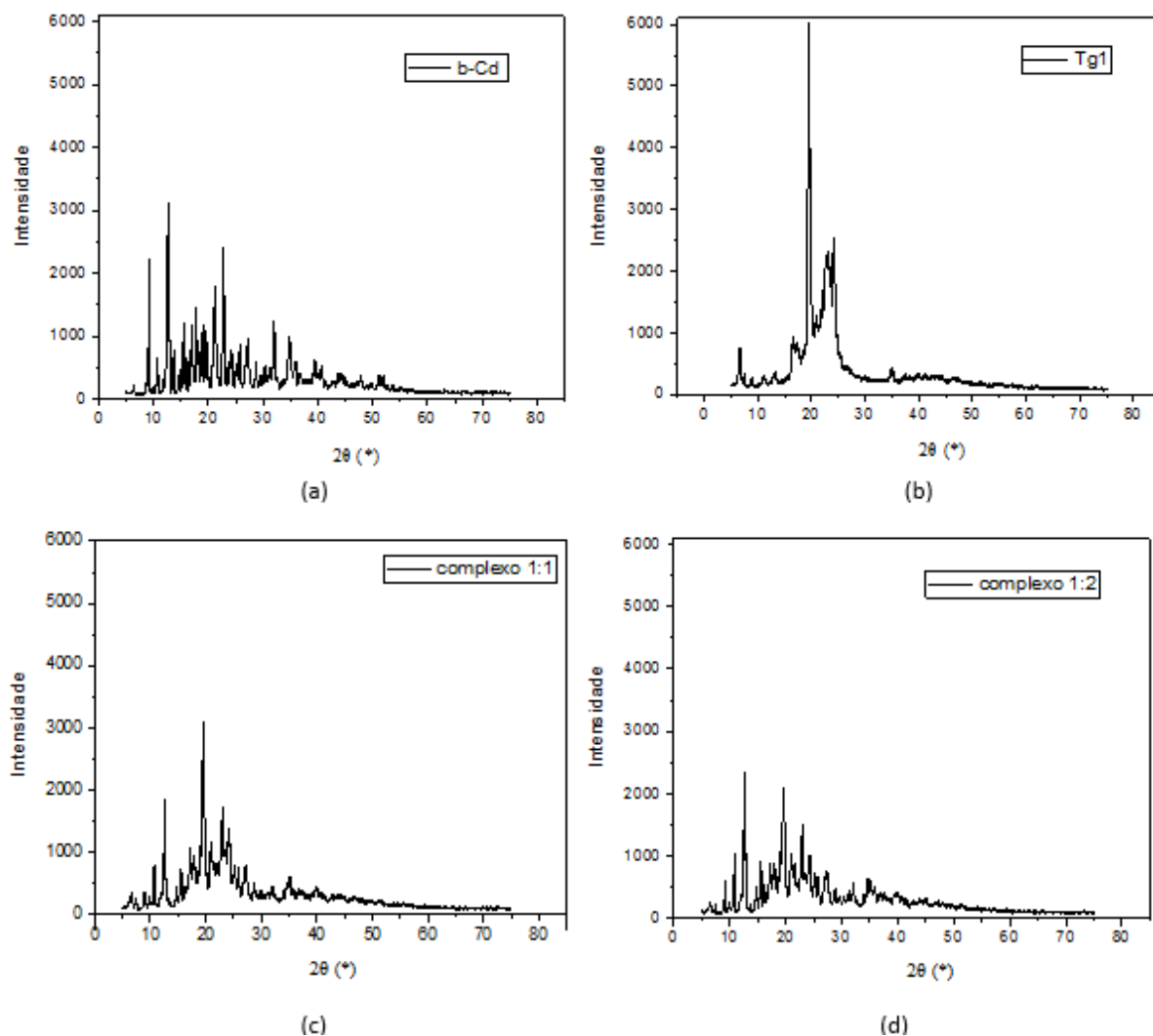
A inclusão do TG1 na cavidade da CD expulsa as moléculas de água existentes em seu interior, dessa forma esse pico é suprimido do termograma, pois no complexo de inclusão a

quantidade de água presente na cavidade na CD se torna muito reduzida. Quando presente, o pico referente à expulsão da água se encontra em temperaturas mais baixas, pois a presença de um composto mais hidrofóbico no interior da cavidade da CD faz com que as moléculas de água remanescentes fiquem mais fracamente associadas à cavidade (Carvalho, 2014).

### **3.4 Difração de raios-X**

A difração de raios-X (DRX) determina a natureza cristalina dos sólidos e é uma ótima técnica para a caracterização de complexos de inclusão (Araújo, 2008). Esta técnica mede a intensidade de raios-X difratados por uma amostra sólida sobre diferentes ângulos. Nesta análise, faz-se a comparação dos difratogramas das espécies puras com os do complexo (Cunha-Filho, 2007). A figura 8 mostra os difratogramas do TG1,  $\beta$ -CD e dos CIs.

O padrão de DRX da  $\beta$ -CD evidencia uma natureza clara cristalina, pois seus picos são intensos e afiados. Além disso, esse padrão está de acordo com uma estrutura do tipo de encapsulador na molécula de  $\beta$ -CD proposto (Pinto, 2005). Por outro lado, os padrões dos CIs mostram algumas diferenças em comparação com o padrão da ciclodextrina. O pico próximo a  $2\theta = 9,8^\circ$  desaparece e ocorre uma diminuição da intensidade do pico próximo a  $14^\circ$ . Observa-se que este pico é mais intenso para o complexo 1:2 devido a maior quantidade de  $\beta$ -CD. Estas alterações podem ser relacionadas com mudanças na organização molecular da  $\beta$ -CD que é uma forte evidência de formação de complexo de inclusão.



**Figura 8:** (a) Difratoograma do TG1; (b) Difratoograma da  $\beta$ -Ciclodextrina; (c) Difratoograma do complexo de inclusão 1:1; (d) Difratoograma do complexo de inclusão 1:2.

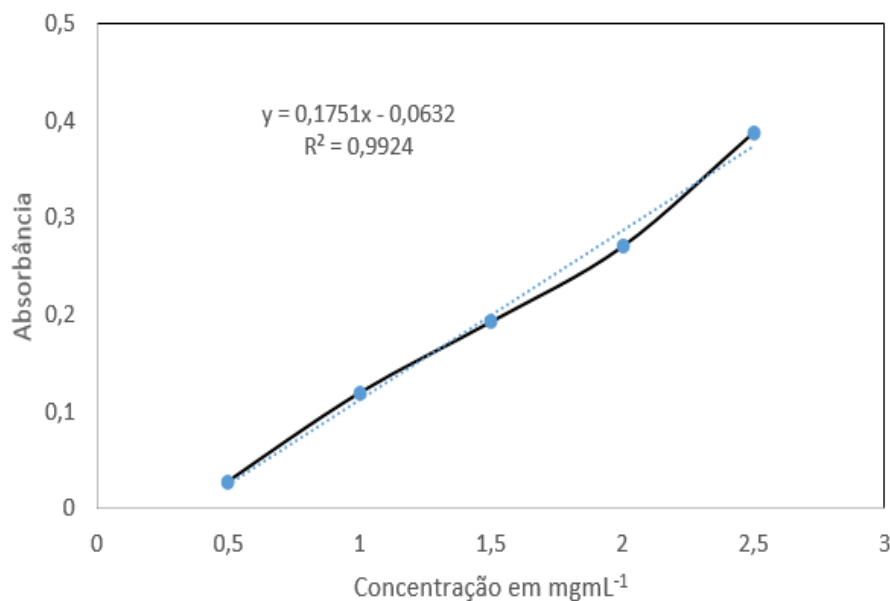
Os difratogramas dos complexos também apresentaram redução de intensidade bem ampla sob os picos quando comparado ao triglicerídeo isolado, o enorme pico em  $20^\circ$  do tg1, está bem reduzido nos difratogramas dos complexos sugerindo o encapsulamento da substancia.

### 3.5 Ensaio de dissolução

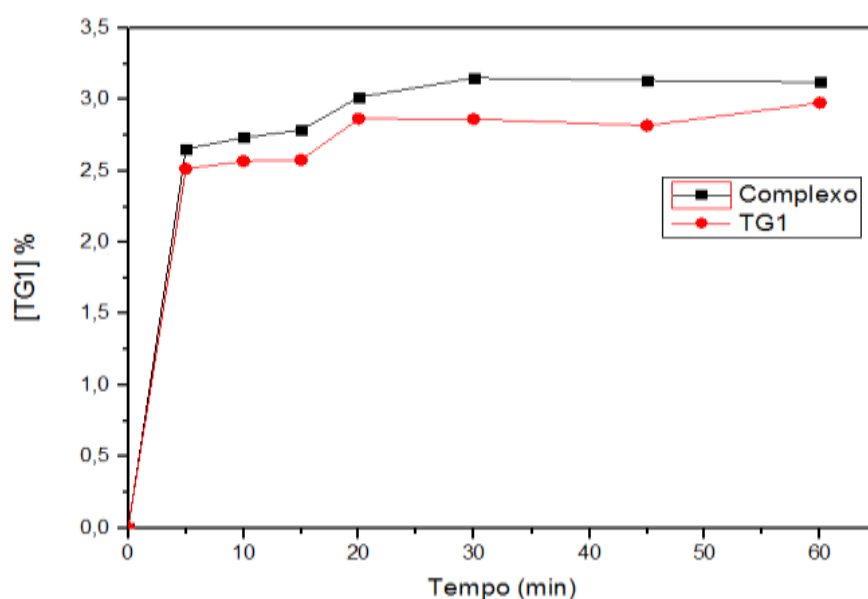
A dissolução consiste na liberação do fármaco de sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para ser absorvido pelo organismo (Chowdary e Rajyalakshmi, 1987). Dessa forma os testes de dissolução são importantes uma vez que permitem, através de ensaios *in vitro*, prever a disponibilidade do fármaco *in vivo*.

Através de espectrofotometria no UV-Vis, observou-se que a TG1 possui um pico máximo de absorvância em  $\lambda=235$  nm em diclorometano, comprimento de onda a partir do qual foi construída a curva de calibração do triglicerídeo (Figura 9), obtendo-se a seguinte equação

da reta:  $Y = 0,08756X - 0,0632$  ( $R^2 = 0,9924$ ). A partir dessa equação, calculou-se a concentração do TG1 no meio de dissolução, com e sem a presença de  $\beta$ -CD (Figura 10).



**Figura 9** – Curva de calibração do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol.



**Figura 10** – Perfil de dissolução do 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol e do complexo TG1: $\beta$ -CD.

Observa-se, através da Figura 10, que a concentração de TG1 em solução atinge seu limite máximo em 30 minutos, sendo a porcentagem dissolvida de 2,5%. Diferentemente, quando se avalia a porcentagem de complexo de inclusão dissolvida, nesse mesmo tempo, verifica-se uma concentração de 3,5%, o que corresponde a um aumento em relação à solubilidade do triglicerídeo isolado, permanecendo nesses níveis ao longo da análise.

Comparando os valores obtidos sobre o aumento da solubilidade no complexo de inclusão com a literatura é possível perceber que ele é relativamente muito baixo. Pires (2016) avaliou uma diferença significativa das porcentagens dissolvidas do Tenoxicam puro em comparação ao complexado em determinados períodos de tempo. Observou-se que a porcentagem final do fármaco puro dissolvido foi em cerca de 60% inferior a do complexo. Garcia et al (2014) em uma avaliação in vitro de albendazol complexado a  $\beta$ -CD encontraram ótimas taxas de dissolução e nível máximo de liberação do fármaco após 20 minutos, assim como Moriwaki et al. (2008) demonstraram o quanto a solubilidade de albendazol pode ser aumentada com a inclusão das  $\beta$ -ciclodextrinas.

#### 4. Conclusões

O uso de diferentes técnicas analíticas para caracterização de complexos de inclusão mostrou uma possível formação do complexo de inclusão entre o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol e a  $\beta$ -ciclodextrina, através do método de malaxagem. Portanto, esses resultados são importantes para entender melhor as propriedades deste complexo de inclusão e são promissores para a elaboração de uma formulação farmacêutica com o complexo, podendo, futuramente, ser uma alternativa para o tratamento de várias doenças neurodegenerativas.

#### 5. Referências

- Burgos, A.E., Okio, C.K.Y.A., Sinisterra, R.D. Preparação do composto de associação entre citrato de ródio(II) e  $\beta$ -ciclodextrina. *Quimica Nova*. 35 (4): 762-765. 2012.
- Cabral Marques, H.M.; Hadgraft, J.; Kellaway, I.W.; Studies of cyclodextrin inclusion complexes. I. The salbutamol/cyclodextrin complex as studied by phase solubility and DSC. *International Journal of Pharmaceutics*; v. 63, n. 3:259-66. 1990.
- Calixto, J.B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, n.1-2, p.131-4, 2005.
- Cao, F; Guo, J; Ping, Q. The physicochemical characteristics of freeze-dried scutellarin-cyclodextrin tetracomponent complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 31, p. 747-756. 2005.
- Castronuovo, G.; Niccoli, M. Thermodynamics of inclusion complexes of natural and modified cyclodextrins with propranolol in aqueous solution at 298 K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 3883-3887. 2006.
- Challa, R.; Ahuja, A.; Ali, J.; Khar, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, p. 20-57. 2005.

Costa Júnior, J.S.; Ferraz, A.B.F.; Filho, B.A.B.; Feitosa, C.M.; Citó, A.M.G.L.; Freitas, R. M.; Saffi J. Evaluation of antioxidante e fects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. *Journal of Medicinal Plants Research*, v. 5. n.2. p. 293-299. 2011.

Costa Júnior, J.S.; Almeida, A.A.; Costa, J.P.; Citó, A.M.G.L.; Saffi, J.; Freitas, R.M. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. *Pharmaceutical Biology*, v. 50, n. 4. p. 453-457. 2012.

Costa Júnior, J.S. Análise fitoquímica, farmacológica e toxicológica das sementes de *Platonia insignis* Mart. (Bacuri). 217 f. Tese (Doutorado em Genética e Toxicologia Aplicada)- Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2011.

Cunha-Filho, M.S.S.; Cunha-Marinho. B.; Torres-Labandeira, J.J.; Martínez-Pacheco, R.; Landín M. Characterization of - Lapachone and Methylated -Cyclodextrin Solid-state Systems. *AAPS PharmSciTech* [periódico on-line] 2007 v. 8, n. 3. Disponível em URL: <http://www.aapspharmscitech.org> [01 Novembro 2017]

Cunha-Filho, M.S.S.; Sá-Barreto, L.C.L.; *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 28, 1. 2007.

Davis, M.E., Brewster, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Nature Reviews Drug Discovery*; v. 3, n. 12:1023-35. 2004.

Del Valle, E.M.M. Cyclodextrins and Their uses: a review. *Process Biochemistry*. v. 39, 1033 – 1046. 2004.

Dirzo, R.; Raven, P.H. Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources*. v.28, p. 137-167, 2003.

Ellman, G.L.; Courtney, K.D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. A. new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*.; p. 88-95. 1961.

Feitosa, C.M.; Santos, P.R.P.; Freitas, R.M.; Rodrigues, A.M.X.; Oliveira, G.A.L.; Costa Junior, J.S.; Cavalcante, N.A. Pre-clinical trials in rats treated with 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) chemical constituent isolated from *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro) specie. *CnSaúde*. In press. 2016.

Feitosa, C.M.; Chaves, S.K.M.; Santos, P.R.G.; Cavalcante, N.A.; Costa Júnior, J.S.; Rashed, K. Anticholinesterase activity and effects on memory in adult rats of 1, 3-distearoyl-2-oleoylglycerol substance is lated from *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro). *The Pharma Research*, v. 14. n. 2. p. 39-52. 2016.

Feitosa, C.M.; Costa Junior, J.S.; Costa, E.V.; Cavalcante, A.N.; Silva, V.L. Compostos antioxidantes em frutas e a doença de Alzheimer. In: FEITOSA, C.M. (Org). *Plantas medicinais e a doença de Alzheimer*. 1ª ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2015.

Fernandes, C.M.; Veiga, F.J.B. Effect of the hydrophobic nature of triacetyl-b-cyclodextrin on the complexation with nicardipine hydrochloride: physicochemical and dissolution properties of the kneaded and spray-dried complexes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; v. 50, n. 12:1597-602. 2002.

- Figueiras, A.; Sarraguça, J.M.G.; Carvalho, R.A.; Pais, A.A.C.C.; Veiga, F.J.B. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of  $\beta$ -cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation, *Pharmaceutical Research*. 24(2):377-89. 2007.
- Fromming, K.; Szejtli, J. Cyclodextrin in pharmacy. Dordrecht: *Kluwer Academic*; 219p. 1994.
- García, A.; Leonardi, D.; Salazar, M.O.; Lamas, M.C. Modified  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex to improve the physicochemical properties of albendazole. Complete in vitro evaluation and characterization. *PLoS one*, v.9, e88234, 2014.
- Guedes, F.L.; Alves, G.M.C.; Santos, F.L.A.; Lima, L.F.; Rolim, L.A.; Rolim Neto, P.J.; *Revista Brasileira Farmacognosia*. 89, 220. 2008.
- Guerra, M.P.; Nodari, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis:/ Editora da UFSC, cap. 1, p. 13-16. 2010.
- Hackett, M.J.; Zaro, J.L.; Shen, W.C.; Guley, P.C.; Cho, M.J., Fatty acids as therapeutic auxiliaries for oral and parenteral formulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 65, p. 1331–1339. 2013.
- Hedges, A.R. Industrial applications of cyclodextrins. *Chemical Reviews*; v. 98, n. 5:2035-44. 1998.
- Heywood, V.H. Flowering Plants of the World. pp. 263. *B T Batsford Ltd*, London 1993.
- Iliescu, T.; Baia, M.; Miclaus, V. A Raman spectroscopic study of the diclofenac sodium- $\beta$ -cyclodextrin interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*; v. 22, n. 5:487-95. 2004.
- I. Tabushi. Cyclodextrin Catalysis as a model for enzyme action. *Accounts of Chemical Research*. 15. 66 – 72. 1982.
- Kanamaru, T.; Kamimuraa, N.; Yokota, T.; Iuchi, K.; Nishimaki, K.; Takami, S.; Akashiba, H.; Shitaka, Y.; Katsura, K.; Kimura, K.; Ohta, S. Oxidative stress accelerates amyloid deposition and memory impairment in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 587, p. 126-131. 2015.
- Kayaci, F.; Aytac, Z.; Uyar, T. Surface modification of electrospun polyester nanofibers with cyclodextrin polymer for the removal of phenanthrene from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. v.261, p.286– 294, 2013.
- Larkin, P. J.; IR and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation, Elsevier: Oxford, 2011.
- LIU, H.; YANG, G.; TANG, Y.; CAO, D.; QI, T.; QI, Y. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of  $\beta$ -caryophyllene/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 450, n. 1–2, p. 304-310, 2013.

- Loftsson, T.E.; Brewster, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 10: 1017-1025. 1996.
- Loftsson, T.E.; Duchene, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. In: *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, n 1-2: 1 -11. 2007.
- Lopes, W. A.; Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Quimica Nova*, Vol. 27, No. 4, 670-673, 2004.
- Mendes, C.S.M. de. Delineamento de um fitomedicamento a partir de 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol isolado de *Platonia insignis* Mart.: avaliação da atividade cicatrizante. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí. Teresina. p. 80. 2013.
- Mendes, M.C.S.; Oliveira, G.A.L.; Lacerda, J.S.; Rezende Junior, L.M.; Silva, M.L.G.; Evaluation of the cicatrizant activity of a semisolid pharmaceutical formulation obtained from *Platonia insignis* Mart. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2015.
- Menezes, P.P.; Serafini, M.R.; Quintans-Júnior, L.J.; Silva, G.F.; Oliveira, J.F.; Carvalho, F.M.S.; Souza, J.C.C.; Matos, J.R.; Alves, P.B.; Matos, I.L.; Hadaruga, D.I.; Araújo, A.A.S. Inclusion complex of (-)-linalool and  $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. v.115, p.2429 – 2437, 2014.
- Moriwaki, C.; Costa, G. L.; Ferracini, C.N.; De Moraes, F.F.; Zanin, G.M.; Pineda, E.A.G.; Matioli, G. Enhancement of solubility of albendazole by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.25, p.255-267, 2008.
- Moura, M.C.C.L.; Homma, A.K.O.; Menezes, A.J.E.A.; Carvalho, A.C.P.P.; Ferreira, A.; Benbadis, A.K.; Muller, C.H.; Fereira, C.A.P.; Cruz, C.D. Bacuri: Agrobiodiversidade. São Luís: Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, 210 p. 2007.
- Mura, P.; Furlanetto, S.; Cirri, M.; Maestrelli, F.; Corti, G.; Pinzauti, S. Interaction of naproxen with ionic cyclodextrins in aqueous solution and in the solid state. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; v. 37, n. 5:987-94. 2005.
- Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 101, p. 238-250, 2014.
- Mura, P. Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in the solid state: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 113, p. 226-238, 2015.
- Nascimento, W.M.O; Carvalho, J.E.U; Muller, C.H. Ocorrência e distribuição geográfica do bacurizeiro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 657-660, 2007.
- Pereira, P.R.S.; Carvalho, R.B.F.; Costa Júnior, J.S.; Freitas, R.M.; Feitosa, C.M. Survey of physicochemical and pharmacological properties of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for developing phytomedicines. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 94: 161-168. 2013.



- Pires, Y.M.S.; Almeida, L.R.; Meirelles, L.M.A. perfil de dissolução do tenoxicam em complexos de inclusão de beta-ciclodextrinas. *eletronic journal of pharmacy*, vol. 13, n.2, p. 64-70, 2016.
- Rhee, K.I.; Van, R.M.R.; Verpoorte, R. Qualitative Determination of false-positive effects in acetylcholinesterase assay using thin-layer chromatography. *Phytochemical Analytic*, p. 127. 2001.
- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E. K. Mutagênese Ambiental. Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.
- Rufino, M.S.M.; Alves, R.E.; Brito, E.S.; Pérez-Jiménez J, Sauracalixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from *Brazilian Food Chemical*. v. 121, n 4: 996-1002, 2010.
- Saltão, R.; Veiga, F. Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.37, n.1, jan-abr. 2001.
- Santos Junior, R.Q.; Soares, L.C.; Maia Filho, A.L.; Araújo, K.S.; Santos, I.M.S.; Costa Júnior, J.S. Histologic study of skin of wounds healing using the cream of bacuri (*Platonia insignis* Mart). *ConScientiae Saúde*; v. 9: 575-581. 2010.
- Santos, P.R.G.; Carvalho, R.B.F.; Costa Júnior, J.S.; Freitas, R.M.; Feitosa, C.M. Levantamento das propriedades físico-químicas e farmacológicas de extratos e compostos isolados de *Platonia insignis* Mart. uma perspectiva para o desenvolvimento de fitomedicamentos. *Revista Brasileira de Farmagnosia*. v. 94, n. 2. p. 161-168. 2013.
- Santos P.R.G.; Feitosa, C.M.; Rodrigues, A.M.X.; Oliveira, G.A.L.; Costa Júnior, J.S.; Cavalcante, A.N.; Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol derivado de *Platonia insignis* Mart. *ConScientiae Saúde*. v. 9, n. 4: 575-581. 2015.
- Souza, V.A.B.; Vasconcelos, L.F.L.; Araújo, E.C.E.; Alves, R.E. Bacurizeiro: *Platonia insignis* Mart. São Paulo: Jaboticabal, 72 p. 2000.
- Stella, V.J.; Rao, V.M. et. al. Mechanism of drug release from cyclodextrin complexes. In: *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 36, n.1. 3-16. 1999.
- Sumiyoshi, T.; Matsui, M.; Itoh, H.; Higuchi, Y.; Aray, H.; Takamiya, C.; Kurachi, M. Essencial polyunsaturated fatty acids and social cognition in schizophrenia. *Psychiatry Research*. v. 157, p. 87-93. 2008.
- Szejtli, J. Cyclodextrin complexed generic drugs are generally not bio-equivalent with the reference products: therefore the increase in number of marketed drug/cyclodextrin formulations is so slow. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*; v. 52:1-11. 2005.
- Szejtli, J. Cyclodextrin inclusion complexes In *Cyclodextrin technology*, London: *Kluwer Academic publishers*, 9-185, 1988.
- Uekama K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*; v. 52, n. 8, p. 900-15. 2004.

Veiga, F.; Pecorelli, C.; Ribeiro, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. Minerva: Coimbra, 2006.

Veiga-Junior, V.F.; Mello, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.3, p.464-71, 2008.

Venturini, C.G. et. al. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Quimica Nova*, v. 31, n. 2, p. 360 – 368, 2008.

Yamaguchi, K.K.L.; Pereira, C.V.; Lima, E.S.; Veiga Junior, V.F. Química e farmacologia do bacuri (*Platonia insignis*). *Sci Amazon*, v. 3, n. 2. p. 39 - 46. 2014.

Yehuda, S.; Rabinovitz, S.; Carasso, R.L.; Motofsky, D.I. 2002. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging*. v. 23, p. 843-853. 2002.

Zema, L. et al. Powder pelletization of a b-cyclodextrin / microcrystalline cellulose mixture in a fluid bed rotor granulator: Sequential statistical optimization of the process. *Acta Medicinæ Legalis Et Socialis*; v. 12. p. 1-14. 2001.

**CAPÍTULO III: Avaliação da atividade genotóxica de um complexo de inclusão elaborado entre a  $\beta$ -ciclodextrina e um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro).**

## **Avaliação da atividade genotóxica de um complexo de inclusão elaborado entre a $\beta$ -ciclodextrina e um constituinte isolado de *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro).**

Junior, R.S.S. Feitosa, C. M. Programa de Pós-graduação em Química. Centro de Ciências da Natureza. UFPI, 2018.

### **RESUMO**

O triglicerídeo 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1), é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* Mart. uma espécie frutífera e madeireira, com origem na Amazônia Oriental Brasileira, mais precisamente no Estado do Pará. Alguns estudos toxicológicos, histopatológicos e seu potencial terapêutico, entre outros, foram realizados com o composto isolado. Devido as suas promissoras atividades farmacológicas e a ausência de estudos genotoxicológicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade genotóxica de um complexo de inclusão elaborado por malaxagem entre o TG1 e a  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD), esta última é um carreador farmacêutico muito usado para complexar fármacos. A genotoxicidade do complexo na dose de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg foram analisadas pelo teste cometa em sangue periférico e medula óssea de camundongos. O complexo TG1: $\beta$ -CD apresentou atividade genotóxica no teste cometa em sangue periférico e medula óssea, principalmente, nas concentrações de 2000 mg/kg após 72h de administração. Portanto pode-se concluir que o complexo possui atividade genotóxica nos modelos experimentais avaliados.

**Palavras chaves:** Genotoxicidade; 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, Teste cometa.

## **Evaluation of the genotoxic activity of an included inclusion complex between $\beta$ -cyclodextrin and an isolated constituent of *Platonia insignis* Mart. (bacurizeiro).**

Junior, R.S.S. Feitosa, C. M. Graduate Program in Chemistry. Center of Natural Sciences. UFPI, 2018.

### **ABSTRACT**

The triglyceride 1,3-Distearoyl-2-oleoylglycerol (TG1), is a triglyceride isolated from the hexanic extract of the seeds of *P. insignis* Mart. a fruit and wood species, originating in the Brazilian Eastern Amazon, more precisely in the State of Pará. Some toxicological and histopathological studies and their therapeutic potential, among others, were carried out with the isolated compound. Due to its promising pharmacological activities and absence of genotoxicological studies, the objective of this work was to evaluate a genotoxic activity of an inclusion complex elaborated by malaxing between TG1 and  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ -CD), the latter being a widely used pharmaceutical carrier to complex drugs. A genotoxicity of the complex at the dose of 1000 mg / kg and 2000 mg / kg of were analyzed by the peripheral mass test and bone marrow of mice. The TG1:  $\beta$ -CD complex presented genotoxic activity without test in the peripheral market and bone marrow, mainly, in the concentrations of 2000 mg/kg after 72 hours of administration. What is the complex has the genotoxic activity in the experimental models evaluated.

**Keywords:** Genotoxicity; 1,3-Distearoyl-2-oleoylglycerol, Comet test.

### **1 Introdução**

O conhecimento sobre as plantas e a descoberta de suas possíveis propriedades curativas acompanhou a evolução do homem por meio dos tempos e têm revelado amplo potencial no tratamento de numerosas doenças (Gaspi, 2011; Kaur et al., 2012). *Platonia insignis* Mart., pertencente à família Clusiaceae, é conhecida popularmente por bacurizeiro, é uma espécie frutífera e madeireira, com centro de origem na Amazônia Oriental Brasileira, mais precisamente no Estado do Pará. Assume importância econômica nos Estados do Pará, Maranhão, Tocantins e Piauí, onde se concentram populações naturais densas e diversificadas (Lima et al., 2007). Esta espécie ocorre em áreas abertas, clareiras e principalmente na vegetação secundária. Seu período de floração acontece entre os meses de agosto a dezembro em diferentes fenofases, coincidindo com o período de estiagem e frutifica entre os meses de novembro a março (Batista et al., 2006).

O 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) é um triglicerídeo isolado do extrato hexânico das sementes *P. insignis*. No Brasil o uso na medicina popular do bacurizeiro é resultado das suas diversas propriedades, tais como, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, citotóxica e antioxidante (Santos Junior et al., 2010). Alguns estudos toxicológicos, histopatológicos e seu

potencial terapêutico, entre outros, foram realizados (Santos, 2012; Feitosa, 2016). Porém, pesquisas sobre a genotoxicidade do TG1 ainda não foram relatadas, demonstrando assim, a necessidade e importância de avaliações precisas dos efeitos biológicos desse composto.

Nos estágios iniciais de desenvolvimento de novos fármacos tem sido dada grande ênfase aos estudos de genotoxicidade, uma vez que, dentre as várias reações adversas que um medicamento pode causar, a ocorrência de efeitos genotóxicos e carcinogênicos não pode ser excluída. A fim de se avaliar o risco de efeitos genotóxicos e cancerígenos para seres humanos, as autoridades reguladoras da Europa, Japão e EUA recomendam que estudos de genotoxicidade e de carcinogenicidade sejam realizados antes da aprovação da comercialização de produtos farmacêuticos (Brambilla; Martelli, 2009).

Compreendendo a relevância de ensaios de genotoxicidade na avaliação da segurança de possíveis fármacos, faz-se o estudo de uma formulação farmacêutica sólida como o complexo de inclusão elaborado por malaxagem entre a  $\beta$ -ciclodextrina e o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol que mostrou promissoras atividades farmacológicas, a saber: mal de Alzheimer.

Diante disso, o objetivo desse estudo é avaliar o potencial genotóxico do complexo de inclusão elaborado entre o 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol e a  $\beta$ -ciclodextrina em camundongos, por meio do teste cometa.

## **1.1 Efeitos antioxidante e mutagênicos**

Diversas pesquisas têm evidenciado a caracterização e identificação de efeitos bioativos em frutos amazônicos. Muitas plantas da região amazônica são dotadas de atividade antioxidante em estudos *in vitro* (Zanatta et al., 2008). O bacurizeiro é um exemplo visto que o tg1 apresentou atividade antioxidante na peroxidação lipídica, conteúdo de nitrito, atividade da catalase e superóxido dismutase no hipocampo de ratos submetidos a testes de memória (Feitosa, 2016).

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos antioxidantes e dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, inflamação (Alvarez-González, et al., 2004). Os organismos sofrem ação constantes dos radicais livres gerados pelos processos inflamatórios ou por disfunções biológicas. Quando a produção de radicais livres é excessiva, ocorre estresse oxidativo, ou seja, os antioxidantes naturais são insuficientes para combater o excesso de espécies radicalares geradas (Andrade Junior et al., 2005)

O DNA é o principal componente celular suscetível ao ataque de radicais livres (Aruoma, 2003). Na presença de agentes físicos, químicos e biológicos, podem ocorrer danos

ao DNA que, se não forem reparados, podem causar mutações celulares em um organismo, denominado efeito mutagênico ou genotóxico. Mutações são alterações súbitas e hereditárias no material genético de um organismo (Nelson e Cox, 2014). Para avaliar este efeito são utilizados testes como teste de micronúcleo e teste cometa (Kovacicca e Somanathana, 2014).

Mutações atuam em diversas etapas do processo de carcinogênese (Yong et al., 2014) A mutação pode ser o primeiro estágio no processo de formação de um tumor (O'Connor, 2015). Dessa forma, ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial para desenvolvimento de neoplasias nos seres humanos. Isso revela a importância de trabalhos de avaliação da genotoxicidade de diferentes compostos.

## 1.2 Teste cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SGE)

O Teste cometa ou ensaio cometa, também chamado *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*, é amplamente aceito como um método padrão para avaliar danos no DNA (McKenna et al., 2008). O ensaio cometa foi primeiramente descrito por Ostling e Johanson (1984) e foi denominado como “estudo microeletroforético” de danos no DNA em células individuais. Essa técnica tem sido modificada e extensivamente validada ao longo dos anos, e é agora comumente referida como ensaio cometa (Wong et al., 2005).

Esse teste pode ser aplicado em qualquer tecido *in vivo*, desde que uma suspensão de células individuais nucleadas possa ser obtida (Hartmann et al., 2003). Devido às numerosas vantagens do ensaio cometa, essa técnica tem sido amplamente utilizada na avaliação da genotoxicidade de medicamentos, alimentos, agroquímicos, em sistemas *in vitro* e/ou *in vivo*, bem como nos estudos de reparo do DNA, estudos de ecotoxicologia, biomonitoramento humano e ambiental (Wong et al., 2005; Piperakis, 2009; Liao et al., 2009).

É uma ferramenta confiável que tem sido utilizada para investigação de compostos antioxidantes. É uma técnica muito válida para verificar se as interações entre os compostos antioxidantes e micronutrientes são capazes de proteger a integridade do material genético (Cemeli, et al., 2008).

No teste, ocorre a detecção de quebras de fita simples e duplas, ligações cruzadas, sítios de reparo por excisão e/ou lesões alcali-lábeis. Nesse ensaio, as células são englobadas em gel, espalhadas sobre uma lâmina e o genoma nuclear é desenrolado e submetido a uma corrente elétrica que proporciona a migração de segmentos de DNA livres para fora do núcleo.

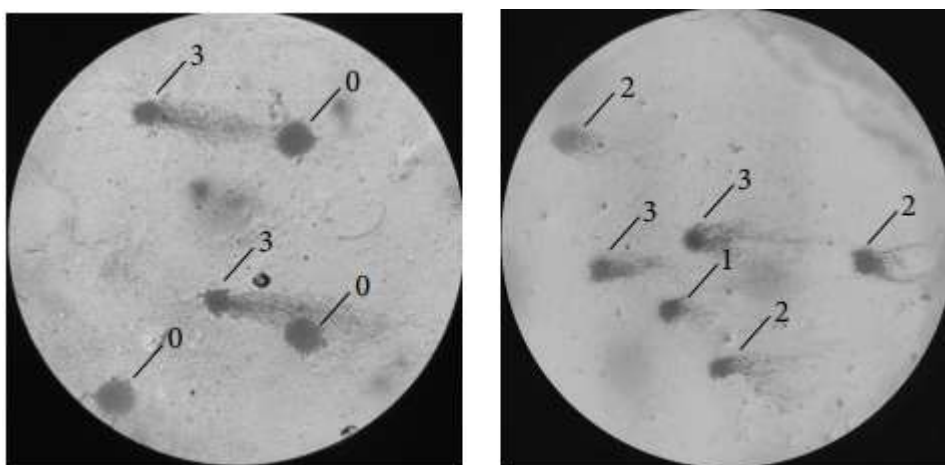
Quebras no DNA causam um relaxamento local do material genético superenrolado, permitindo que alças de DNA sejam arrastadas durante a eletroforese. As células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA.

Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA ( Figura 1) (Tice et al., 2000; Azqueta et al., 2009; Oliveira et al., 2009).

Este teste também pode ser utilizado para estudos de reparo de DNA, visto que as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção. Embora impossibilite inferir a fidelidade do processo de reparo, pode trazer informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada (Tice, 2000; Silva et al., 2007).

**Figura 11:** Fotomicrografia do teste de cometa indicativo dos tipos de danos.

FONTE: Gomes, 2015.



O uso de ensaio cometa associado ao teste de micronúcleo é recomendado. Enquanto o ensaio do cometa detecta lesões reversíveis, o teste de micronúcleo detecta lesões mais persistentes no DNA ou efeitos aneugênicos que não podem ser reparados (Hartmann et al., 2003; Rothfuss et al., 2011).

## 2 Materiais e métodos

O TG1 foi obtido das sementes do fruto da espécie *Platonia insignis* Mart.. O isolamento e a identificação do TG1 utilizado neste estudo foram descritos (Feitosa, 2016). A  $\beta$ -ciclodextrina foi adquirida da Sigma Chemical. Utilizou-se água purificada e os outros solventes utilizados foram de grau analítico.

Os complexos de inclusão de 1,3-diésteril-2-oleil-glicerol/ $\beta$ -ciclodextrina foi preparado na razão molar 1:2 (mol/mol), utilizando-se a técnica de malaxagem. Brevemente, uma pequena quantidade de água foi adicionada a mistura de TG1 com  $\beta$ -ciclodextrina. Essa



mistura foi homogeneizada por 60 minutos com auxílio de gral e pistilo e, em seguida, mantida em dessecador por 24 horas a temperatura ambiente.

## 2.1 Animais e Tratamentos

Nos experimentos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus Swiss*, com  $35 \text{ g} \pm 5 \text{ g}$  de peso, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina-PI, Brasil, concedidos após aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa dessa instituição. Em todos os experimentos, o número de camundongos por grupo foi de 05 (cinco) machos, Foram utilizados 04 (Quatro) grupos, o Controle Negativo (CN) usando solução salina, o grupo controle tratado com DMSO 0,5% (G1), e os outros dois grupos tratados através da administração por gavagem, nas concentrações de 1000 mg/kg (G2) e 2000 mg/kg (G3).

Todos os animais foram mantidos sem restrições alimentar (ração Labine-PURINE) e de ingestão de líquidos, durante todo o experimento, com ciclo claro/escuro de 12 h, e em caixas de polipropileno adequadas a sua manutenção.

## 2.2 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com o protocolo de Singh et al. (1988), com pequenas alterações (Tice, 1995). Após o tratamento dos animais foram realizadas 3 coletas de sangue periférico por punção caudal em intervalos de 0, 24 e 48 h após a administração. Após 48 horas os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e procedeu-se a coleta da medula óssea. As células da medula foram extraídas dos dois fêmures, com 0,5 mL de soro bovino fetal, sendo preparadas duas lâminas por animal. As lâminas foram previamente cobertas com agarose (1,5%) em tampão fosfato salino livre de cálcio e magnésio (PBS). Em seguida 10  $\mu\text{L}$  do sangue coletado foi misturado a 190  $\mu\text{L}$  de agarose *Low melting* (1,5%) e transferidas para duas lâminas pré-cobertas e coberta com lamínula. Depois da solidificação da agarose (5 min em uma bandeja sob refrigeração), as lâminas foram mergulhadas em solução de lise recém-preparada e resfriada (10% DMSO, 1% Triton X-100, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10,0 – 10,5) por 72 h a 4 °C. Posteriormente, as lâminas foram acondicionadas em cuba de eletroforese horizontal e cobertas com tampão de eletroforese fresco (0.0075 M, 1mM EDTA, pH 13) por 20 min.

A eletroforese foi realizada por 20 min a 25 V e 300 mA. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas com solução de Tris 400 Mm (pH 7,5), fixadas (15%, v/v, ácido tricloroacético, 5%, v/v, sulfato de zinco, glicerol 5%), lavadas com água destilada e postas

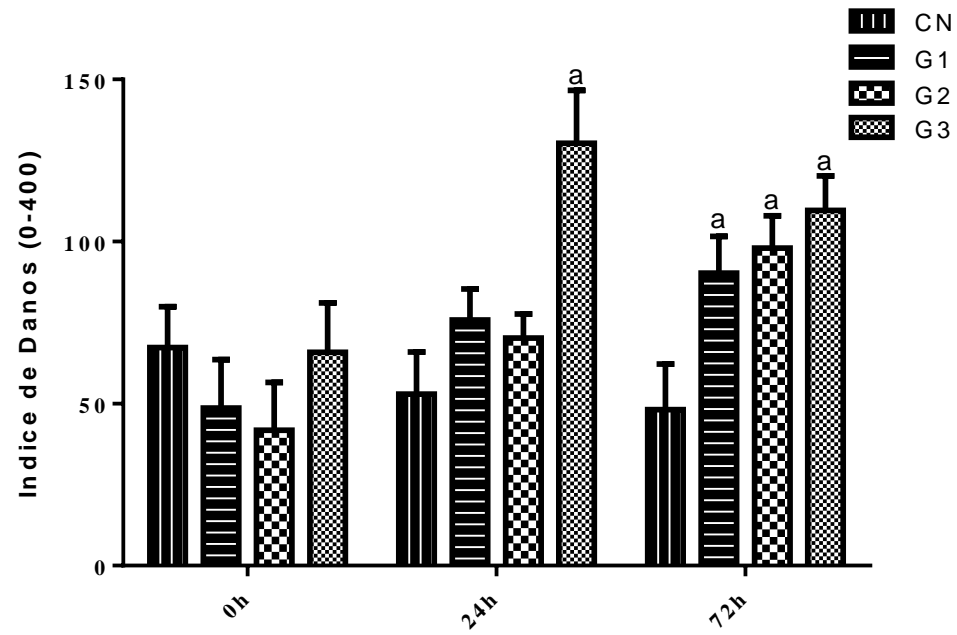
para secar durante a noite. Os géis foram corados por 15 min (37 °C) com uma solução contendo a seguinte sequência: 34 mL de solução B (0,2%, v/v, amonionitrato, 0,2%, v/v, nitrato de prata, 0,5%, v/v, ácido tungstosalisílico, 0,15%, v/v, formaldeído, 5%, v/v, carbonato de sódio) e 66 mL de solução A (carbonato de sódio 5 %). A coloração foi interrompida com uma solução de ácido acético 1 % e os géis postos para secar à temperatura ambiente. Um total de 100 células foram analisadas randomicamente por tratamento.

Foram considerados dois parâmetros o índice de danos –ID (0-400) e frequência de danos – FD (0- 100%). Para o cálculo ID, as células foram, visualmente, classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda dos cometas (0 = sem cauda; 4 = máximo comprimento da cauda), o que resultou em um escore único de danos ao DNA de cada amostra e, conseqüentemente, para cada grupo estudado. A Frequência de danos em % foi calculada para cada amostra, com base no número de células com cauda em relação às células com dano.

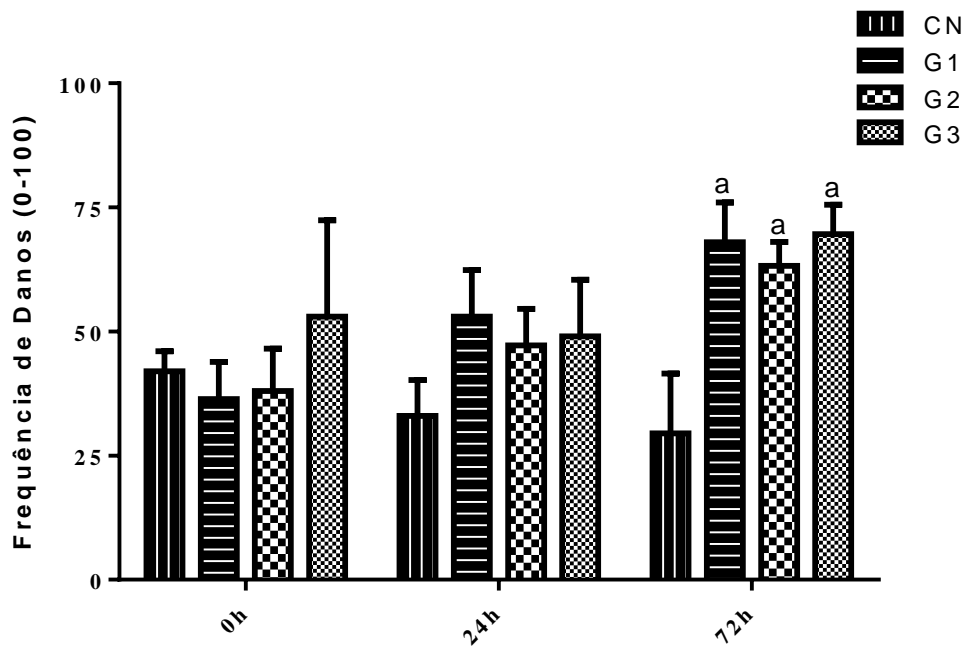
### **3 Resultados e discussão**

Tendo em vista que o ensaio cometa é um biomarcador de genotoxicidade que indica danos recentes ao DNA (Collins, 2008), o presente estudo com a aplicação do referido ensaio, identificou os possíveis danos em células de medula óssea de camundongos induzidos pelo complexo TG1/β-CD. Os testes estatísticos foram realizados com o software Graphical Pad Prisma 6.0 com a aplicação do teste de Newman-Keuls e significância de 95%.

Através da realização do teste cometa em sangue periférico é possível observar na figura 12 que a substância testada não ocasiona danos ao DNA pelo índice e frequência de danos nas primeiras 24 horas após a administração, exceto na dose 2000 mg/kg (G3) que ocorreu um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) do índice de dano em relação ao grupo CN de 24h. Entretanto 72 horas após o tratamento foi verificado um aumento significativo ( $P > 0,05$ ) do índice e frequência de danos para todos os grupos (G1, G2 e G3) quando comparado com o CN de 72h.



(A)

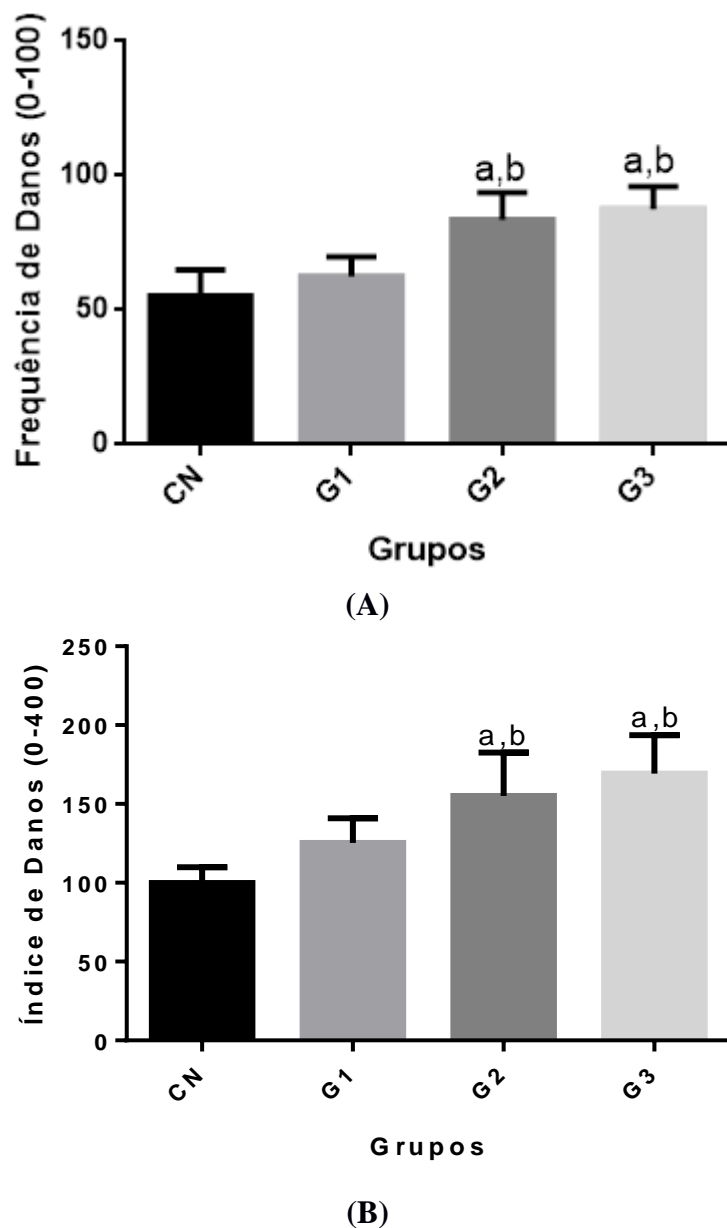


(B)

**Figura 12.** Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média  $\pm$  desvio padrão) em sangue periférico de camundongos, após 0h, 24h e 72h horas da administração do complexo. (software Graphic Pad Prisma 6.0).

Com a realização do teste cometa com células da medula óssea 72 horas após o tratamento é possível observar na figura 13 que tanto para o índice de danos quanto para a frequência de danos o resultado foi similar, demonstrando que as duas maiores doses (G2 e G3) ocasionaram um aumento significativo ( $p > 0,05$ ) destes parâmetros (ID e FD) em comparação

com o CN. As duas doses do complexo que fora administradas (G2 e G3) também apresentaram um aumento significativo em relação ao níveis de danos do G1.



**Figura 13.** Índice de Danos (A) e Frequência de Danos (B) por grupo (média  $\pm$  desvio padrão) teste cometa com células da medula óssea 72 horas após o tratamento. (software Graphic Pad Prisma 6.0).

No presente estudo verificamos que na concentração 2000 mg/kg o complexo TG1/ $\beta$ -CD apresentou diferença significativa no índice de danos quando comparada com a concentração CN, demonstrando assim que este complexo é uma substância genotóxica.

O grupo G3, quanto ao dano e ao tempo de exposição, podemos constatar que mesmo tendo sido submetido a um tempo de exposição curto, o grupo apresentou dano no material genético. Diferente do estudo de Freitas (2010), que em estudos com Aripiprazol um fármaco utilizado para o tratamento da esquizofrenia e outros distúrbios (Abilify, 2008) percebeu a partir

do teste cometa realizado, que esse fármaco não foi genotóxico, após administração aguda em camundongos visto que a frequência de danos nas células do sangue dos camundongos para essa substância não foi significativo.

Diante do exposto, é possível indicar os riscos da aplicação farmacológica do complexo TG1/ $\beta$ -CD ou do composto isolado 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol, devido às atividades observadas para genotoxicidade. Entretanto, novos testes devem ser feitos para melhor averiguar os mecanismos de indução de danos ao material genético pelo composto em foco, tendo em vista inúmeros relatos sobre a ação de lesões ao DNA, tais como quebras e inativação de genes de reparo de vários fármacos com atividades carcinogênicas (Brambilla e Martelli, 2009).

#### **4 Conclusão**

Os testes de genotoxicidade são de importância fundamental no desenvolvimento de novos fármacos, eles ajudam a traçar um perfil de segurança e eficácia destes compostos. Com os resultados obtidos, podemos concluir que a administração por gavagem do complexo de inclusão TG1/ $\beta$ -CD em camundongos nas doses de 1000 mg/kg e 2000 mg/kg apresentam atividade genotóxica em células do sangue periférico e da medula óssea. Alguns estudos complementares como teste de micronúcleo devem ser realizados no sentido de confirmação dos resultados e elucidação dos possíveis mecanismos causadores dos danos.

#### **5 Referências**

Abilify. Monografia – Aripiprazol. Bristol Mayers Squibb, 2008.

Alvarez-González, I.; Madrigal-Bujaidar, E.; Martino-Roaro, L.; Espinosa-Aguirre, L. Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 154, 2004

Andrade Junior, D. R.; Souza, R.B.; Santos, S.A.; Andrade D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasilia*, v. 31, p. 60-68. 2005.

Aruoma, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*. Amsterdam, v. 523, p.9-20, 2003.

Batista, J. F.; Jardim, G. A. M. Notas sobre a morfologia floral e a fenologia do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) Clusiaceae, no município de Bragança, estado do Pará. Museu Paraense Emílio Goeldi. *Ciências Naturais*, Belém, v. 1, n. 1, p. 183-186, 2006.

Brambilla, G. e Martelli, A. Genotoxicity and carcinogenicity studies of antihypertensive agents. *Mutation Research*. v.612, p.115–149, 2009.

Da Silva, L.B., Bortoli, M. G., Azevedo, M. B . Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers. *Mutation Research*. v. 675, 2009.

Dhawan, A.; Bajpayee, M.; Parmar, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *cell Biology and toxicology*, v. 25, p. 5-32, 2009.

Feitosa, C.M.; Costa Junior, J.S.; Costa, E.V.; Cavalcante, A.N.; Silva, V.L. Compostos antioxidantes em frutas e a doença de Alzheimer. In: FEITOSA, C.M. (Org). *Plantas medicinais e a doença de Alzheimer*. 1ª ed. Campinas, SP: Editora Átomo, 2015.

Freitas, T. M.; Celso, F. B.; Silva, T. G.; Pereira, P.; Nascimento, J. Avaliação do efeito genotóxico do aripiprazol em camundongos. *Revista de Iniciação Científica da ULBRA - 2009/2010*

Hartmann, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, V. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

Gaspi, F.O.G. Atividade Antioxidante, Cicatrizante e Antiulcerogênica dos Extratos e das Frações das Folhas de *Oncidium flexuosum* sims. (orchidaceae). 2011. Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

Gomes Júnior, A.L.; Paz, M.F.; da Silva, L.I.; Carvalho, S. C.; Sobral, A.L.; Machado, K. C.; Ferreira, P.M.; Satyal, P.; Freitas, R.M.; Cavalcante, A.A. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015.

Kaur,P.; Kumar, M.; Singh, B.; Kumar, S.; Kaur, S. Amelioration of oxidative stress induced by oxidative mutagens and COX-2 inhibitory activity of umbelliferone isolated from *Glycyrrhiza glabra* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012 v.1: p.120-126.

Kovacic P, Somanathana R. Nitroaromatic compounds: Environmental toxicity, carcinogenicity, mutagenicity, therapy and mechanism. *Journal of Applied Toxicology*. 2014; 1: 1-15.

Lima, M. M. A.; Vieira, L. F.; Costa Junior, J. S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2., 2007, João Pessoa.

Mavournin KH,et al .The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mutation Research*, v. 239, p. 29-80, 1990.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5. ed, Porto Alegre: *Artmed*, 2014. p. 1274.

O'Connor MJ. Targeting the DNA damage response in cancer. *Mol Cell*. 2015; 60: 547-560.

Santos Junior, R. Q.; Soares, L. C.; Maia Filho, A. L.; Araújo, K. S.; Santos, I. M. S.; Costa Júnior, J. S. Histologic study of skin of wounds healing using the cream of bacuri (*Platonia insignis* Mart). *ConScientiae Saúde*; v. 9: 575-581. 2010.

Santos, P. R. G. Estudos farmacológicos e ensaios pré-clínicos com 1,3-diestearil-2-oleil-glicerol (TG1) derivado de *Platonia insignis* Mart. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí. Teresina-PI, 2012.

Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R. and Levis AG. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, v. 2, p.11–17, 1987

Silva, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. *SBG*, v. 02, n .02. p. 30-33. 2007.

Singh, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*. v.175, p.184–191, 1988.

Tice, R.R. Applications of the single cell gel assay to environmental biomonitoring for genotoxic pollutants, IN: B.E. Butterworth, L.D. Corkum, J. Guzmán-Rincón (Eds.), *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*, Plenum Press, New York, pp. 69–79, 1995.

Tolbert, P.E. et al. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Research*, v. 271, 669–677, 1992.

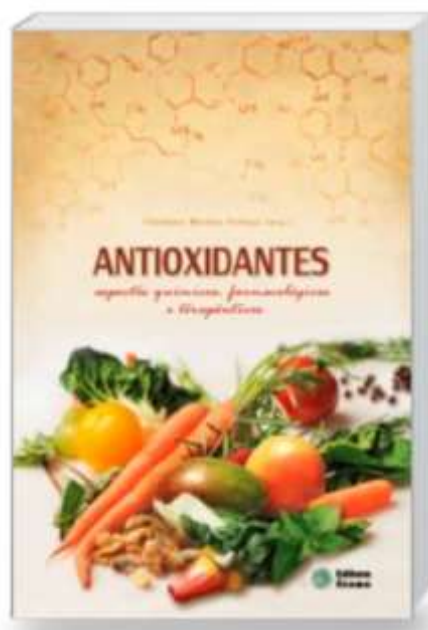
Thompson, D.O. Cyclodextrins- Enabling Excipients: Their Present and Future Use in Pharmaceuticals. *Therapeutic Drug Carrier Systems*, v.14, n.1, p. 1-104, 1997.

Yong Zwe, Zaini ZM, Kallarakkal TG, Karen-NG LP, Rahman ZAA, Ismail SM, Sharifah NA, Mustafa WMW, Abraham M, Tay KK, Zain RB. Genetic alterations of chromosome 8 genes in oral cancer. *Scientific Reports*. 2014; 1: 1-9

Zanatta, C.F.; Mitjans, M.; Ugartondo, V.; Rocha-Filho, P.A.; Vinardell, B.M.P. Protective potential of emulsion formulated with buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v. 48, p.70-75, 2010.

**CAPÍTULO IV: Estrutura de Produtos naturais antioxidantes extraídos de plantas.**

Publicação no livro “Antioxidantes: Aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos”.





## **Estrutura de Produtos naturais antioxidantes extraídos de plantas**

Chistiane Mendes Feitosa, Ronaldo dos Santos Sousa Junior, Francisco José Borges dos Santos e Valéria Lima Silva

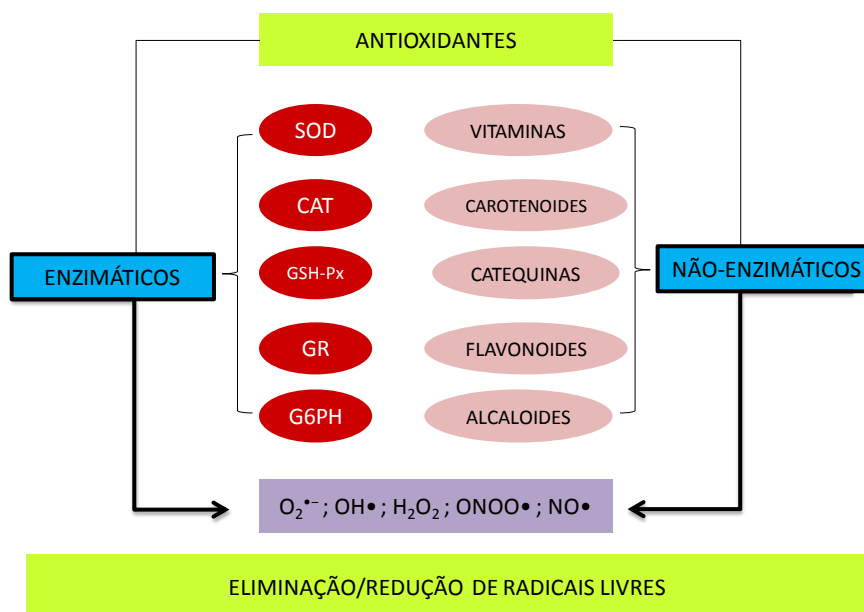
### **Introdução**

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (como, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio - EROs) e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos. Em humanos, o excesso de EROs pode danificar moléculas lipídicas, proteínas ou DNA, inibindo suas funções. Tais danos oxidativos geralmente não agem diretamente no início da doença crônica, mas podem ser um dos promotores da doença (Jun et al., 2008; Tavares et al., 2010). Assim, devido ao seu grande potencial de dano, os radicais livres e as EROs são produzidos no organismo sob rigoroso controle de sistemas de defesa, os quais incluem enzimas e outros antioxidantes (Halliwell; Gutteridge; Cross, 1992); porém nem sempre esse controle é mantido e, para evitar a produção excessiva de substâncias pró-oxidantes, a suplementação com compostos antioxidantes naturais derivados de plantas é benéfica, pois previne danos celulares causados por radicais livres. Dessa forma, considerando-se a implicação dos efeitos negativos do estresse oxidativo sobre várias doenças, o propósito deste capítulo é abordar as substâncias antioxidantes naturais, estudadas em parâmetros *in vitro* e *in vivo*.

### **Substâncias naturais antioxidantes**

Antioxidantes reduzem o estresse oxidativo provocado por radicais livres nas células e são amplamente utilizados no tratamento de muitas doenças humanas, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias e doenças neurodegenerativas (Krishnaiah; Sarbatly; Nithyanandam, 2011). Como existe possibilidade de efeitos colaterais e risco de carcinogênese no uso de antioxidantes sintéticos, vem crescendo o interesse de substituí-los por antioxidantes naturais provenientes de plantas medicinais (Zhang et al., 2009). Assim, a suplementação de antioxidantes no sistema de defesa do organismo com compostos antioxidantes naturais, derivados de plantas, é benéfica, pois previne danos causados por radicais livres (Oh et al., 2001). As substâncias antioxidantes naturais podem ser divididas em dois grupos: o grupo enzimático, composto pelas enzimas superóxido dismutase, glutational-

peroxidase e catalase, por exemplo, e o grupo não-enzimático, composto pelos carotenóides, ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol, por exemplo (Figura 3) (Boonmee et al., 2011).



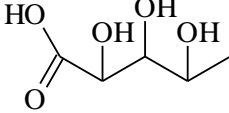
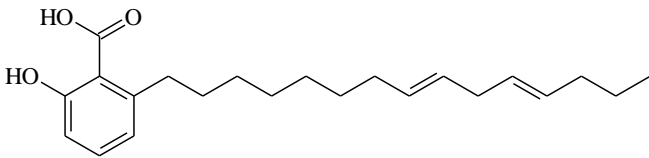
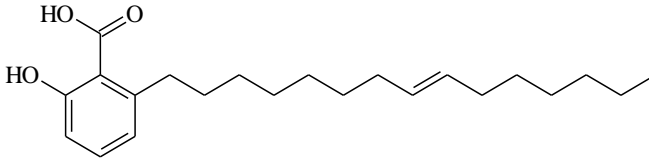
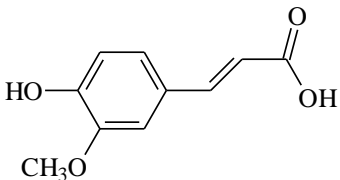
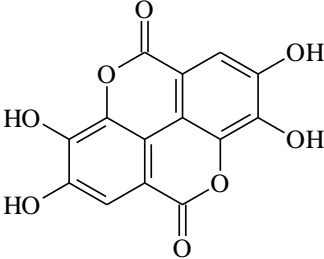
**Figura 3.** Representação das principais substâncias antioxidantes e seus alvos. SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); GSH-Px (glutaciona peroxidase); GR (glutaciona redutase); G6PH (glucose-6-fosfato-desidrogenase).

Dentre as várias espécies vegetais, pertencentes a variadas famílias, destacam-se: Asteraceae, Leguminosae, Labiateae, Lamiaceae e Polygonaceae. Esse destaque justifica-se pela presença, registrada na literatura, de constituintes químicos com atividade antioxidante, pertencentes às classes de ácidos e derivados, catequinas, esteróides, lignanas, pterocarpanos, taninos, triterpenos (Quadro 1), flavonóides (Tabela 3), dentre outras.

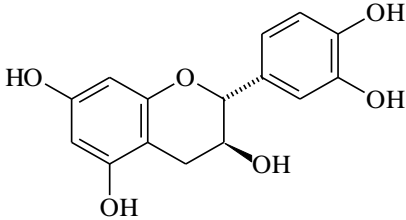
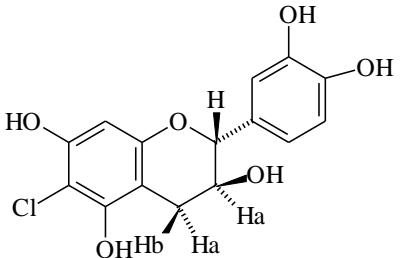
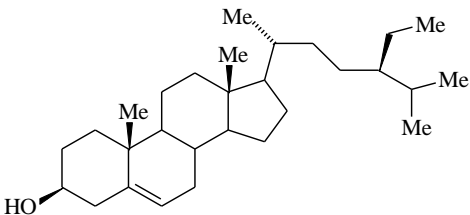
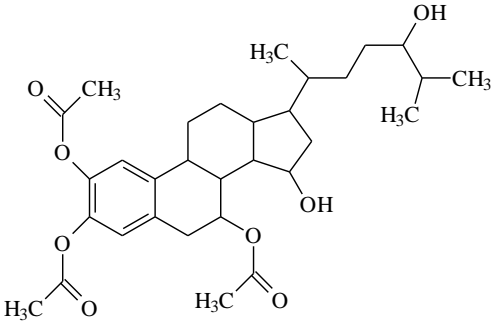
Derivados do ácido *p*-cumárico são citados como detentores de potencial antioxidante maior que o tocoferol e o ácido ascórbico sobre o peroxinitrito, mediante nitratação lipoproteína. Tal propriedade sugere que esses derivados são bastante benéficos contra danos causados pela oxidação (Hirschmann et al., 2004).

O esteróide  $\beta$ -sitosterol e o limonóide limonin, presentes na espécie *Citrus grandis* Osbeck, foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante em comparação com o poderoso antioxidante  $\alpha$ -tocoferol. Esses compostos, individualmente, apresentaram menor ação antioxidante do que quando presentes na mistura em um extrato acetato de etila, com significativa ação antioxidante. Esses compostos encontram-se presentes em várias espécies de *Citrus* (Hashinaga et al., 2006).

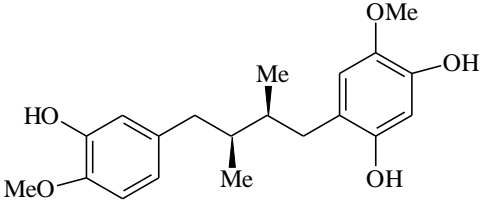
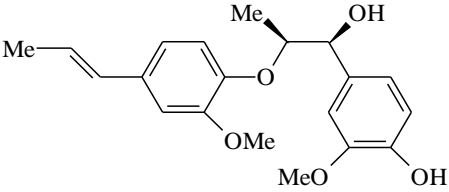
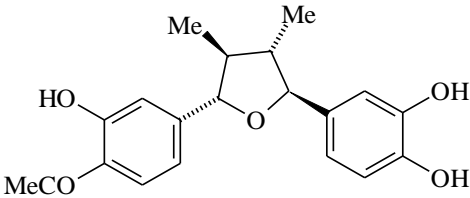
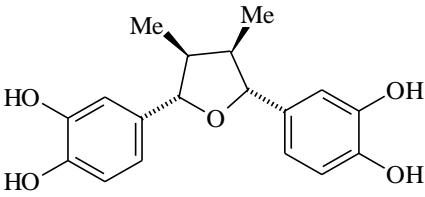
**Quadro 1.** Alguns metabólitos secundários isolados de plantas com atividade antioxidante.

Classe de substâncias	Estrutura	Espécie vegetal	Referência
Ácidos e derivados			
Ácido 2S,3S,4S-triidroxipentanoico		<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Ácido anacárdico 2		<i>Anacardium occidentale</i>	(Trevisan et al., 2006)
Ácido anacárdico 3		<i>Anacardium occidentale</i>	(Trevisan et al., 2006)
Ácido felúrico		<i>Rubus ulmifolius</i>	(Dall'Acqua et al., 2008)
Ácido elágico		<i>Terminalia horrida</i>	(Pfundstein et al., 2010)

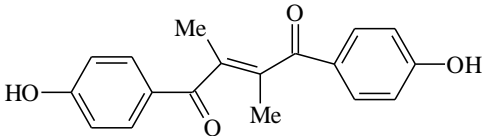
**Quadro 1.** (Continuação) Alguns metabólitos secundários isolados de plantas com atividade antioxidante.

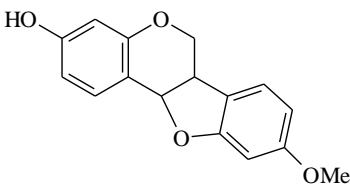
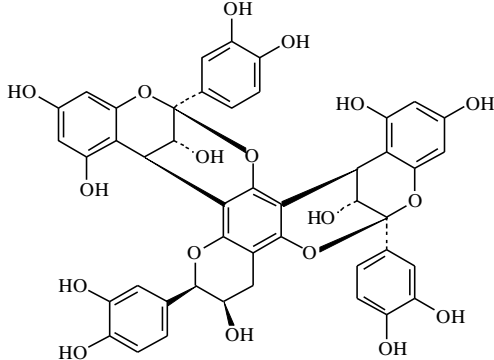
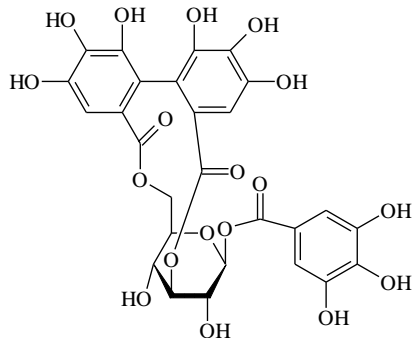
Classe de substâncias	Estrutura	Espécie vegetal	Referência
<i>Catequinas</i>			
(+) Catequina		<i>Polygonum paleaceum</i>	(Yang et al., 2005)
6-Clorocatequina		<i>Rumex patientia</i>	(Demirezer et al., 2001)
<i>Esteroides</i>			
$\beta$ -Sitosterol		<i>Citrus grandis</i>	(Hashinaga et al., 2006)
17-(4-hidróxi-1,5-dimetil-hexil)-2,3,7-(acetilóxi) gona-1,3,5(10)-trien-15-ol)		<i>Cleome arabica</i>	(Djeridane et al., 2010)

**Quadro 1.** (Continuação) Alguns metabólitos secundários isolados de plantas com atividade antioxidante.

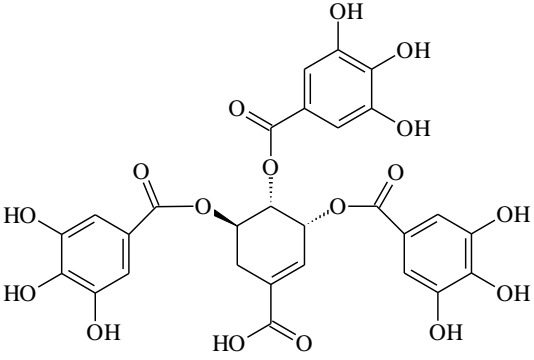
Classe de substâncias	Estrutura	Espécie vegetal	Referência
<i>Lignan</i>			(Jeong et al., 2004)
Ácido 2'-hidroxi dihidroguaiarético		<i>Saururus chinensis</i>	(Jeong et al., 2004)
Machilina D		<i>Saururus chinensis</i>	(Jeong et al., 2004)
(7S,8S,7'S,8'S)-3,3',4'-trihidroxi-4-metoxi-7,7'-epoxilignana		<i>Larrea tridentata</i>	(Khan et al., 2004)
Meso-(rel 7S,8S,7'R,8'R)-3,4,3',4'-tetrahidroxi-7,7'-epoxilignana		<i>Larrea tridentata</i>	(Khan et al., 2004)

**Quadro 1.** (Continuação) Alguns metabólitos secundários isolados de plantas com atividade antioxidante.

Classe de substâncias	Estrutura	Espécie vegetal	Referência
<i>Lignan</i>			(Khan et al., 2004)
(E)-4,4'-dihidroxi-7,7'-dioxolign-8-(8')-ene		<i>Larrea tridentata</i>	(Khan et al., 2004)
<i>Pterocarpanos</i>			

Medicarpina		<i>Dalbergia odorifera</i>	(Chen et al., 2000)
<b>Taninos</b>		<i>Ixora coccinea</i>	(Idowu et al., 2010)
Ixoratannin A-2			
Corilagina		<i>Terminalia catappa</i>	(Kinoshita et al., 2007)

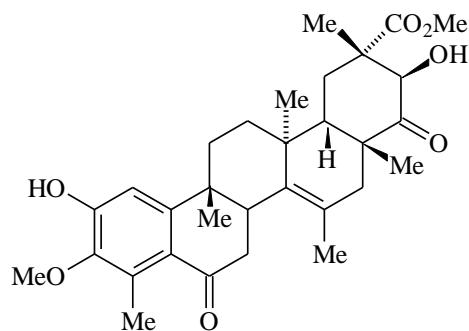
**Quadro 1.** (Continuação) Alguns metabólitos secundários isolados de plantas com atividade antioxidante.

Classe de substâncias	Estrutura	Espécie vegetal	Referência
<b>Taninos</b>			
Ácido 3,4,5-Tri-O-galoil-(3R,4S,5R)-chiquímico		<i>Terminalia chebula</i>	(Pfundstein et al., 2010)

---

**Triperpenos**

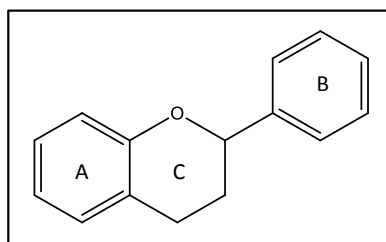
Cognatina

*Cheilochlinium  
cognatum*(Furlan et al.,  
2004)

---

Compostos minoritários, como os antioxidantes feniletanoides glicosilados, foram registrados na espécie *Eremostachys glabra* Boiss (Lamiaceae) (Sarker et al., 2005).

Os flavonóides são compostos conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes significativas e são amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas. São metabólitos secundários que consistem de uma ampla classe de compostos polifenólicos com baixo peso molecular que partilham um núcleo flavano, composto por dois anéis fenil (A e B) ligados através de um anel pirano (C) (Figura 4) (Ferreira et al., 2015).



**Figura 4.** Estrutura química do esqueleto flavano apresentado pelos flavonoides.

Os flavonóides apresentados na tabela 3, foram registrados como constituintes antioxidantes majoritários. As atividades antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, anticâncer, antialérgica, dentre outras, também são citadas para estes compostos.

Achados indicam os flavonóides ugonins J-L, como compostos com atividade antioxidante maior que o trolox, composto conhecido pelo grande potencial antioxidante (Chen et al., 2003). Os flavonóides 6-metóxi-luteolin-7-glicosídeo e 2'-hidróxi-5'-metóxi-biochanin A, isolados de várias espécies, como *Salvia plebeia*, apresentaram, em ensaios, maior potencial antioxidante que o butil-hidróxi-tolueno (BHT) e o  $\alpha$ -tocoferol, antioxidantes sintéticos que são adicionados a alimentos (Weng et al., 2000).

**Tabela 3.** Alguns flavonoides com propriedades antioxidantes.

<b>Flavonoides</b>	<b>Espécie vegetal</b>	<b>Referência</b>
<b>Ugonin G</b>	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)
<b>Ugonin H</b>	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)
Ugonin I	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)
Ugonin J	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)
Ugonin K	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)
Ugonin L	<i>Helminthostachys zeylanica</i>	(Chen et al., 2003)



6-metoxi-luteolin-7-glicosídeo	<i>Salvia plebeia</i>	(Weng et al., 2000)
2'-hidroxi-5'-metoxibiochanin A	<i>Salvia plebeia</i>	(Weng et al., 2000)
Luteolina-7-O-β-D-glicopiranosídeo	<i>Lawsonia inermis</i>	(Hsouna et al., 2011)
Quercetina-3-O-α-L-raminopiranosídeo	<i>Ixora coccínea</i>	(Idowu et al. 2010)
	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Miricetina 3-O-(3"-O-acetil)-α-L-raminosídeo	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Miricetina 3-O-α-L-raminosídeo	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Miricetina 3-O-β-D-glicosídeo	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Quercetina 3-O-(3"-O-acetil)-α-L-raminosídeo	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Quercetina 3-O-β-D-glicosídeo	<i>Nymphaea caerulea</i>	(Agnihotri et al., 2008)
Quercetina 3-β-D-glicopiranosídeo	<i>Phyllanthus emblica</i>	(Liu et al., 2008)
Canferol	<i>Phyllanthus emblica</i>	(Liu et al., 2008)
Quercetina 3-O-arabinopiranosídeo	<i>Polygonum sachalinensis</i>	(Fan et al., 2010)
Canferol 3-O-isoramininosídeo	<i>Rhamnus alaternus</i>	(Ammar et al., 2009)
Raminocitrina 3-O-isoramininosídeo	<i>Rhamnus alaternus</i>	(Ammar et al., 2009)
Raminetina 3-O-isoramininosídeo	<i>Rhamnus alaternus</i>	(Ammar et al., 2009)
Kurilensina A	<i>Sasa kurilensis</i>	(Hasegawa et al., 2008)
Kurilensina B	<i>Sasa kurilensis</i>	(Hasegawa et al., 2008)
Canferol 3-O-glicuronídeo	<i>Rubus ulmifolius</i>	(Dall'Acqua et al., 2008)
Canferol-3-O-(6''-p-cumaroil)-β-D-glicopiranosídeo	<i>Rubus ulmifolius</i>	(Dall'Acqua et al., 2008)

Uma classe de compostos que teve suas propriedades antioxidantes estudadas somente mais recentemente foram os alcaloides. Atualmente, os alcaloides têm muitas aplicações farmacológicas devido aos seus efeitos, tais como: analgésico ( morfina), antiasmático (efedrina), antiarrítmico (quinidina), anticâncer (berberina), anti-hipertensivo (reserpina), antipirético (quinina), antibacteriano (ciprofloxacina), hipoglicemiante (piperina), psicotrópico (psilocina) e estimulante do sistema nervoso central (cocaína, cafeína e nicotina). (Ng; Or; Ip, 2015).

Apesar da longa história e das muitas aplicações clínicas dos alcaloides, apenas poucos são comercializados como medicamentos (Amirkia e Heinrich, 2014). Coincidentemente, dois dos inibidores de colinesterases aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da doença de Alzheimer, galantamina (isolada de plantas da família Amaryllidaceae) e rivastigmina (um derivado sintético da fisostigmina, isolada de *Physostigma venenosum*), são alcaloides (Konrath et al., 2013; Feitosa et al., 2015a), destacando a importância deste grupo de compostos como fonte de substâncias promissoras na terapêutica da doença de Alzheimer.

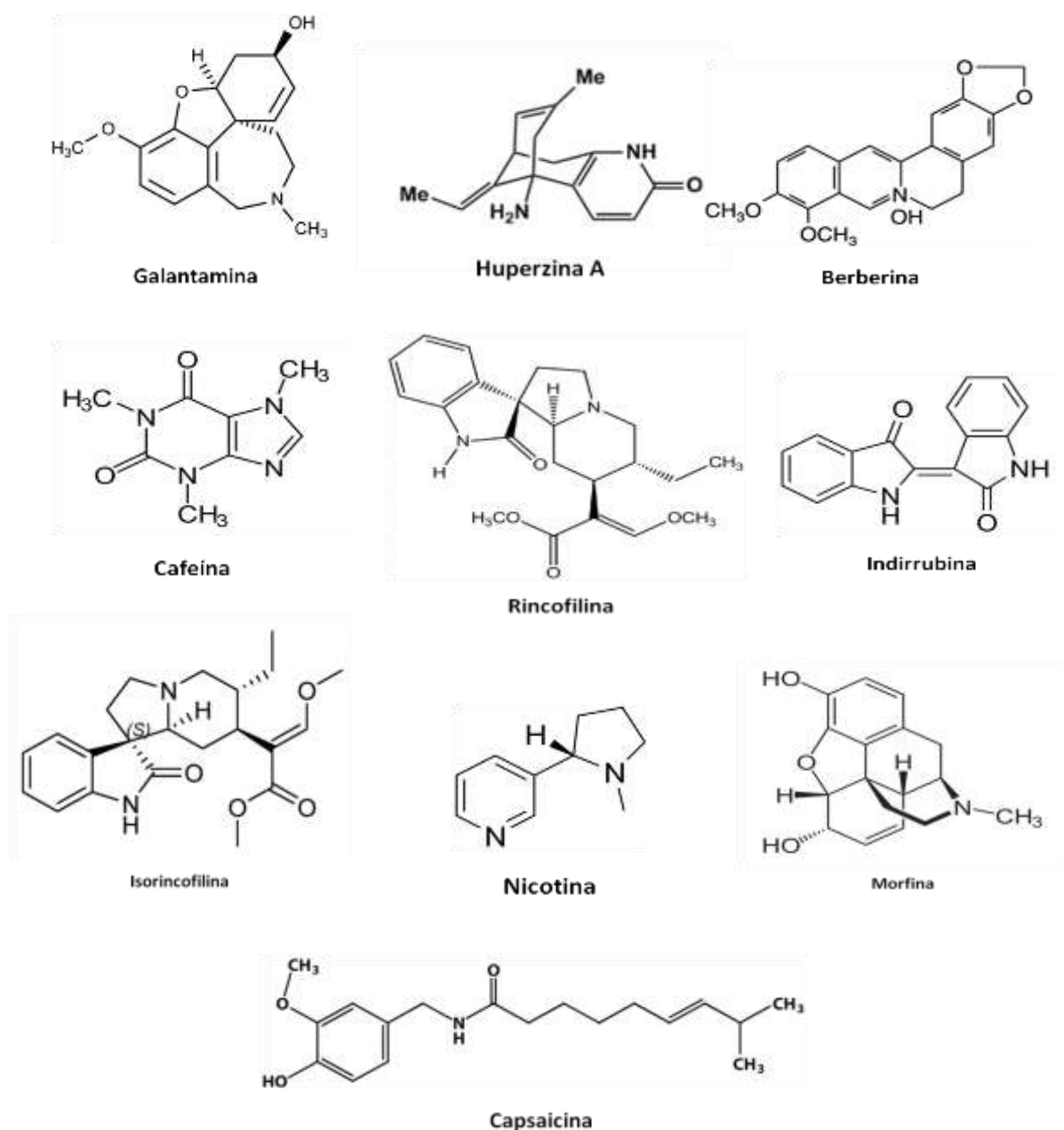
Diante do uso secular de alcaloides no tratamento de distúrbios diversos, essa classe de compostos merece destaque em estudos sobre substâncias antioxidantes.

### **Alcaloides com propriedades antioxidantes**

Os alcaloides são uma classe de compostos orgânicos nitrogenados que são encontrados principalmente em angiospermas (Simões et al., 2010). O Dicionário de Produtos Naturais cataloga mais de 27.000 alcaloides (<http://dnp.chemnetbase.com/intro/>). Uma única espécie de planta geralmente contém poucos alcaloides, mas certas famílias de plantas, tais como Annonaceae (Castedo et al., 1991), Papaveraceae, Ranunculaceae, Solanaceae e Amaryllidaceae possuem espécies ricas em alcaloides. Alguns alcaloides podem ser encontrados em animais, tais como a latrunculina A, isolada de esponjas (*Negombata magnifica*) e a batracotoxina, isolada de sapos venenosos do gênero *Phyllobates* (Ng; Or; Ip, 2015).

Os alcaloides isolados de plantas utilizados atualmente no tratamento da DA são: galantamina, huperzina A, berberina, cafeína, rincofilina, isorincofilina, indometacina, indirrubina, capsaicina, morfina e nicotina (Figura 5) (Ng; Or; Ip, 2015). Todos esses alcaloides também apresentam atividade antioxidante (Leon-Carmona e Galano, 2011; Abd El-Wahab et al., 2013; Jiang et al., 2013; Tsvetkova et al., 2013; Jaskóla; Jasiewicz; Mrówezynska, 2016),

exceto a indometacina, para a qual não foram encontrados estudos antioxidantes na literatura consultada.



**Figura 5.** Substâncias naturais com ação antioxidante e que são utilizadas no tratamento da doença de Alzheimer.

Os efeitos neuroprotetores da galantamina (alcaloide isolado de plantas da família Amaryllidaceae) são atribuídos à sua capacidade de inibir a agregação  $\beta$ -amiloide e a citotoxicidade (Matharu et al., 2009; Melo et al., 2009). Ela pode eliminar as espécies reativas de oxigênio protegendo os neurônios contra danos oxidativos (Tsvetkova et al., 2013) e

promover a neurogênese em hipocampo de ratos adultos através de receptores de acetilcolina nicotínicos e muscarínicos (Kita et al., 2014).

A berberina é um alcaloide isoquinolínico comumente utilizado na medicina tradicional chinesa e indiana. Pode ser encontrada em muitas plantas medicinais, tais como *Berberis spp.*, *Hydrastis canadensis* e *Coptidis rizoma* (Ye et al., 2009). As seguintes atividades farmacológicas são atribuídas à berberina: anti-inflamatória, cardioprotetora, neuroprotetora, antitumoral e antimalárica (Ma et al., 1999; Küpeli et al., 2002; Tran et al., 2003; Zheng et al., 2003; Kettmann et al., 2004; Racková et al., 2004; Letasiová et al., 2006).

Os efeitos benéficos da berberina na doença de Alzheimer (DA) ocorrem devido a esse alcaloide inibir as enzimas acetilcolinesterase-AChE (CI<sub>50</sub> 0,37 mmol/L) e butirilcolinesterase-BUChE (CI<sub>50</sub> 18,21 mmol/L) (Abd El-Wahab et al., 2013; Bonesi et al., 2013; Su et al., 2013) e de efeitos antioxidantes comprovados através de ensaios de óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrogênio, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (Racková et al., 2004; Jung et al., 2009; Abd El-Wahab et al., 2013) e peroxidação lipídica (Racková et al., 2004; Abd El-Wahab et al., 2013), além de aumentar as atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e glutathione peroxidase (Abd El-Wahab et al., 2013). Esses mecanismos são importantes na terapêutica da DA porque nessa doença ocorre redução do neurotransmissor acetilcolina-ACh nas sinapses nervosas, dessa forma inibindo-se as enzimas AChE e BUChE é possível manter níveis adequados de ACh nessas sinapses, uma vez que essas enzimas são responsáveis pela hidrólise de ACh em colina e acetato. Já os mecanismos antioxidantes são capazes de prevenir e de reduzir a formação das placas de peptídeo β-amiloide, alteração característica da DA (Feitosa et al., 2015a).

A cafeína é um alcaloide do grupo das xantinas, pode ser encontrada em várias espécies de plantas e está presente em fontes alimentares incluindo café (*Coffea arabica*), chá (*Camellia sinensis*), cola (*Cola acuminata*), cacau (*Theobroma cacao*), guaraná (*Paulinia cupana*), dentre outras (Nehlig, 1999). Seus efeitos antioxidantes incluem a capacidade para eliminar os radicais livres hidroxila (OH) e metoxila (OCH<sub>3</sub>) (Leon-Carmona e Galano, 2011), além de suprimir os níveis de RNA mensageiro de vários marcadores de estresse oxidativo em modelos experimentais de doença de Alzheimer (camundongos THY-Tau22) (Laurent et al., 2014). Por ser um potente inibidor da enzima AChE, a cafeína é utilizada como padrão positivo em ensaios *in vitro* para detecção de substâncias anticolinesterásicas (Feitosa et al., 2015b).

A capsaicina é um capsaicinoide primário encontrado em pimentas. Ela exibe algumas atividades biológicas atuando como hipolipidêmico, antioxidante e anti-inflamatório, além de melhorar os danos sinápticos e a hiperfosforilação da proteína tau em modelos experimentais (Jiang et al., 2013). A morfina é um antagonista dos receptores opioides, sendo portanto

utilizada como potente analgésico. Alguns estudos demonstraram que a morfina protege os neurônios contra neuroinflamação mediada pela microglia e contra o estresse oxidativo (Rambhia et al., 2005; Qian et al., 2007)

A nicotina é um alcaloide que pode ser obtido de qualquer parte da planta *Nicotiana tabacum* e, por ser o princípio ativo do tabaco, seus supostos benefícios à saúde humana permanecem controversos. Alguns estudos, por exemplo, investigaram os efeitos neuroproterores da nicotina e testes *in vivo* sugeriram que esses efeitos nas doenças de Parkinson e de Alzheimer podem ser devidos a mecanismos antioxidantes, enquanto que outros estudos relataram que a nicotina induziu o estresse oxidativo em diferentes tecidos (Wetscher et al., 1995; Linert et al., 1999; Yildiz et al., 1999).

Em estudos realizados por Jaskóla; Jasiewicz; Mrówezynska (2016) uma série de análogos da nicotina [cotinina; tio-análogo de cotinina; seleno-analógico de cotinina; anabasina; anabasamina; 2-benzil-tio-nicotina; 2-(2-metóxi-benzil-tio)-nicotina; 2-(4-metóxi-benzil-tio)-nicotina; 2-(ciclopentil)-nicotina; 2-(ciclo-hexil)-nicotina] bem como a própria nicotina, tiveram suas atividades antioxidantes estudadas. Foram aplicados ensaios de potencial redutor, 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), quelação de íons ferro e ensaio de hemólise. Esses autores encontraram que a nicotina e seus análogos exibiram atividade antioxidante de forma dose-dependente e que a capacidade de proteger as hemácias da hemólise induzida por danos oxidativos foi dependente do tempo de incubação dessas células. Diante disso, alguns estudiosos concordam que a nicotina em si, não é prejudicial à saúde e que os males provocados pelo consumo do cigarro são devidos a outras substâncias presentes no cigarro como monóxido de carbono, alcatrão e elementos radioativos (Fowler et al., 1996).

Atividades antioxidantes de alcaloides carbazólicos e de alguns de seus precursores sintéticos foram verificadas no estudo de Hieda et al. (2014). Nesse estudo, ensaios de eliminação de radicais ABTS [(ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] e DPPH mostraram que os carbazoles carbazomadurin A e B e os seus precursores sintéticos 2a e 3a exibiram melhor poder antioxidante do que o carbazol carazostatin e do que os precursores sintéticos 4a e 4b de carquinostatin A. Os precursores sintéticos 2a e 3a exibiram atividade de eliminação forte devido à presença do grupo formil na posição C-5 desses carbazoles.

No ensaio de potencial antioxidante total, os carbazoles carbazomadurin A e B e os precursores sintéticos 2a e 3a também mostraram melhor poder antioxidante do que todos os outros carbazoles testados. O carbazol carquinostatin A, no entanto, teve o menor potencial antioxidante total dentre os oito carbazoles testados. A capacidade antioxidante exibida por esses alcaloides carbazólicos pode ser devida a contribuição de um átomo de nitrogênio

localizado no anel pirrole para formar uma estrutura iminoquinona doando um radical hidrogênio ou um elétron para o radical livre (Hieda et al., 2014).

Alcaloides  $\beta$ -carbolínicos ocorrem em plantas, alimentos e também em tecidos e fluidos biológicos (Rommelspacher; May; Susilo, 1991; Herraiz, 1998, 2004; Robinson et al., 2003; Herraiz et al., 2010; Zhao et al., 2012). São produzidos a partir de aldeídos e indolaminas ou  $\alpha$ -cetoácidos (Herraiz, 2004). Estes alcaloides exibem algumas atividades farmacológicas, a saber: inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), absorção de monoaminas, capacidade de se ligar a receptores benzodiazepínicos e serotoninérgicos (Rommelspacher et al., 1991; Robinson et al., 2003; Herraiz e Chaparro, 2006; Cao et al., 2007; Herraiz et al., 2010) e ações antioxidantes (Kim et al., 2001; Herraiz e Galisteo, 2003; Herraiz e Chaparro, 2006; Bi et al., 2007; Moura et al., 2007; Herraiz e Guillén, 2011; El-Gendy et al., 2012).

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos norarmano; harmano; 1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina (TH $\beta$ C); 1-metil-1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina (MeTH $\beta$ C) e pinolina são capazes de eliminar radicais hidroxila. Enquanto que os ácidos 1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (THCA) e 1-metil-1,2,3,4-tetra-hidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (MTCA) são ativos contra a hidroxilação de 2-desóxi-guanosina a 8-hidróxi-2'-desóxi-guanosina, um biomarcador de dano oxidativo ao DNA. Esses alcaloides também são ativos em sistemas de Fenton na presença de 6-hidróxi-dopamina e ácido ascórbico como pró-oxidantes. A atividade das  $\beta$ -carbolinas como eliminadoras de radicais hidroxila também é comparável à da melatonina, que é um antioxidante eficaz em sistemas *in vitro* e *in vivo* (Herraiz e Galisteo, 2015).

Alcaloides esteroidais são metabólitos secundários característicos de plantas da família Solanaceae, esses alcaloides possuem algumas atividades, tais como: antiviral, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, redução do colesterol e imunopotenciação. *Lycopersicon esculentum* Mill. (tomateiro), uma Solanaceae, possui conteúdo rico em alcaloides esteroidais, sendo a tomatina o principal deles (Friedman 2002, 2013; Khalid et al., 2004; Milner et al., 2011; Singh et al., 2013). A tomatina possui atividade de inibição sobre as enzimas AChE (CI<sub>25</sub> 49,7  $\pm$  4,10  $\mu$ M) e BUCHE (CI<sub>25</sub> 10,9  $\pm$  0,99  $\mu$ M) e capacidade de reduzir espécies oxidativas. (Taveira et al., 2014). Entretanto, a despeito dessas propriedades, os alcaloides esteroidais são conhecidos pelo seus efeitos tóxicos (Simões et al., 2010; Milner et al., 2011), porém o estudo de Taveira et al. (2014) mostrou que a tomatina exibe efeito neuroprotetor sobre a toxicidade induzida pelo glutamato em células SH-SY5Y (neuroblastoma), além de ausência de toxicidade gastrointestinal.

As folhas de Boldo (*Peumus boldus* Mol., Monimiaceae) são utilizadas na medicina popular, em todo o mundo, para o tratamento de desordens do fígado (Speisky e Cassels, 1994; Simirgiotis e Schmeda-Hirschmann, 2010; Soto et al., 2013). A infusão das folhas de boldo

possui componentes ativos que podem estar envolvidos em seus efeitos farmacológicos, como alcaloides, flavonoides e óleos essenciais (Fuente; Quezada; Valle, 2005). No entanto, a(s) substância(s) específica(s) que promove(m) os efeitos hepatoprotetores de *P. boldus* ainda não está(ão) elucidada(s) (Pithayanukul; Nithitanakool; Bavovada, 2009).

Tanto os extratos das folhas quanto o alcaloide boldina, o principal alcaloide presente no boldo e que representa 12-19% do conteúdo total de alcaloides (O'Brien; Carrasco-Pozo; Speisky, 2006), têm sido mostrados como potentes antioxidantes em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* (Jang et al., 2000; Jiménez et al., 2000; Schmeda-Hirschmann et al., 2003; Soto et al., 2013; Zielinski et al., 2013). O extrato aquoso bruto das folhas é a forma mais popular de consumo do boldo o qual possui propriedades antioxidantes importantes contra a peroxidação lipídica da membrana mitocondrial dos hepatócitos de fígado de ratos, enquanto que a boldina tem atividade modesta contra essa lipoperoxidação (Klimaczewski et al., 2014). Isso sugere que os efeitos hepatoprotetores de extratos de *P. boldus* são devidos às substâncias antioxidantes presentes (catequina, boldina, ácido cafeico, rutina, quercitrina, quercetina e kaempferol) que, provavelmente, funcionam de forma sinérgica.

Portanto, observa-se que os alcaloides obtidos a partir de plantas medicinais possuem uma gama de atividades biológicas sendo que muitos deles têm potencial antioxidante podendo, assim, ser aplicados na terapêutica de diversas doenças seja na prevenção, como adjuvantes ao tratamento ou até mesmo na cura de patologias.

## Referências.

Abd El-Wahab, A.E.; Ghareeb, D.A.; Sarhan, E.E.; Abu-Serie, M.M.; El-Demellawy, M.A. *In vitro* biological assessment of berberis vulgaris and its active constituent, berberine: antioxidants, anti-acetylcholinesterase, antidiabetic and anticancer effects. *BMC Complementar. Alternative Medicine*, v. 13, n. 218, 2013.

Agnihotri, V.K.; El Sohly, H.N.; Khan, S.I.; Smillie, T.J.; Khan, I.A.; Walker, L.A. Antioxidant constituents of *Nymphaea caerulea* flowers. *Phytochemistry*, v. 69, p. 2061-2066, 2008.

Amirkia, V.; Heinrich, M. Alkaloids as drug leads e a predictive structural and biodiversity based analysis. *Phytochemistry Letters*, v. 10, p.48-53, 2014.

Ammar, R.B.; Bhourri, W.; Sghaier, M.B.; Boubaker, J.; Skandrani, I.; Neffati, A.; Bouhlel, I.; Kilani, S.; Mariotte, A.; Chekir-Ghedira, L.; Dijoux-Franca, M.; Ghedira, K. Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chemistry*, v. 116, p. 258-264, 2009.

Bi, W.; Cai, J.; Liu, S.; Baudy-Floc'h, M.; Bi, L. Design, synthesis and cardioprotective effect of a new class of dual-acting agents: phenolic tetrahydro- $\beta$ -carboline RGD peptidomimetic conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 6909-6919, 2007.

Bonesi, M.; Loizzo, M.R.; Conforti, F.; Passalacqua, N.G.; Saab, A.; Menichini, F.; Tundis, R. *Berberis aetnensis* and *B. libanotica*: a comparative study on the chemical composition, inhibitory effect on key enzymes linked to Alzheimer's disease and antioxidant activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 12, p. 1726-1735, 2013.

Boonmee, A.; Srisomsap, C.; Karnchanatat, A.; Sangvanich, P. An antioxidant protein in *Curcuma comosa* Roxb. rhizomes. *Food Chemistry*, v. 124, p. 476-480, 2011.

Cao, R.H.; Peng, W.L.; Wang, Z.H.; Xu, A.L.  $\beta$ -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, v. 14, p. 479-500, 2007.

Castedo, L.; Granja, J.A.; Lera, A.R.; Villaverde, M.C. Alkaloids from *Guatteria goudotiana*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 2781-2783, 1991.

Cheng, D.; Weng, X.; Wang, W. Antioxidant activities of natural phenolic components from *Dalbergia odorifera* T. Chen. *Food Chemistry*, 71, p 45-49, 2000.

Chen, C.C.; Shen, C.C.; Yeh, P.Y.; Huang, Y.L. Antioxidant flavonoids from the rhizomes of *Helminthostachys zeylanica*. *Phytochemistry*, 64, p 1277-1283, 2003.

Dall'Acqua, S.; Cervellati, R.; Loi, M.C.; Innocenti, G. Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, v. 106, p. 745-749, 2008.

Demirezer, L. O.; Uz, A.K.; Bergere, I.; Schiewe, H.J.; Zeeck, A. The structures of antioxidant and cytotoxic agents from natural source: anthraquinones and tannins from roots of *Rumex patientia*. *Phytochemistry*, 58, p 1213-1217, 2001.



- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Brunel, J.M.; Stocker, P. Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 2599-2606, 2010.
- El Gendy, M.A.M.; Soshilov, A.A.; Denison, M.S.; El-Kadi, A.O.S. Harmaline and harmalol inhibit the carcinogen-activating enzyme CYP1A1 via transcriptional and posttranslational mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 353-362, 2012.
- Fan, P.; Terrier, L.; Hay, A.; Marston, A.; Hostettmann, K. Antioxidant and enzyme inhibition activities and chemical profiles of *Polygonum sachalinensis* F.Schmidt ex Maxim (Polygonaceae). *Fitoterapia*, v. 81, p. 124-131, 2010.
- Feitosa, C.M.; Brito, F.C.; Moita Neto, J.M.; Sucupira, A.C.C. Ensaio para detecção de inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BUChE). In: Feitosa, C.M. (Org). *Plantas medicinais e a doença de Alzheimer*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2015b.
- Feitosa, C.M.; Feitosa, D.M.; Melo, C.H.S.; Chaves, S.K.M. Considerações sobre a doença de Alzheimer. In: Feitosa, C.M. (Org). *Plantas medicinais e a doença de Alzheimer*. Campinas, SP: Editora Átomo, 2015a.
- Ferreira, R.Q.; Greco, S.J.; Delarmelina, M.; Weber, K.C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochimica Acta*, v. 163, p. 161-166, 2015.
- Fowler, J.S.; Volkow, N.D.; et al. Inhibition of monoamine oxidase B in the brains of smokers. *Nature*, v. 379, n. 733-736, 1996.
- Friedman, M. Anticarcinogenic, cardioprotective, and other health benefits of tomato compounds lycopene, alpha-tomatine, and tomatidine in pure form and in fresh and processed tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, p. 9534-9550, 2013.
- Friedman, M. Tomato glycoalkaloids: role in the plant and in the diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 5751-5780, 2002.
- Fuente, J.C.; Quezada, N.; Valle, J.M. Solubility of boldo leaf antioxidant components (Boldine) in high-pressure carbon dioxide. *Fluid Phase Equilibria*, v. 235, p. 196-200, 2005.
- Furlan, M.; Bolzani, V. S.; Lião, L. M.; Silva, D. H. S.; Jeller, A.H. Antioxidant phenolic and quinonemethide triterpenes from *Cheiloclinium cognatum*. *Phytochemistry*, 65, p 1977-1982, 2004.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.; Cross, C.E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992.
- Hasegawa, T.; Tanaka, A.; Hosoda, A.; Takano, F.; Ohta, T. Antioxidant C-glycosyl flavones from the leaves of *Sasa kurilensis* var. *gigantea*. *Phytochemistry*, v. 69, p. 1419-1424, 2008.
- Hashinaga, F.; Mokbel, M. S. Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chemistry*, 94, p 529-534, 2006.

- Herraiz, T. Occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid and 1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid in fruit juices, purees, and jams. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 46, p. 3484-3490, 1998.
- Herraiz, T. Relative exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke. *Food Additives & Contaminants*, v. 21, p. 1041-1050, 2004.
- Herraiz, T.; Chaparro, C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and  $\beta$ -carbolines norharman and harman isolated from coffee. *Life Sciences*, v. 78, p. 795-802, 2006.
- Herraiz, T.; Galisteo, J. Hydroxyl radical reactions and the radical scavenging activity of  $\beta$ -carboline alkaloids. *Food Chemistry*, v. 172, p. 640-649, 2015.
- Herraiz, T.; Galisteo, J. Tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids occur in fruits and fruit juices - activity as antioxidants and radical scavengers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 51, p. 7156-7161, 2003.
- Herraiz, T.; González, D.; Ancín-Azpilicueta, C.; Arán, V. J.; Guillén, H.  $\beta$ -carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, p. 839-845, 2010.
- Herraiz, T.; Guillén, H. Inhibition of the bioactivation of the neurotoxin MPTP by antioxidants, redox agents and monoamine oxidase inhibitors. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 1773-1781, 2011.
- Hieda, Y.; Anraku, M.; Choshi, T.; Tomida, H.; Fujioka, H.; Hatae, N.; Hori, O.; Hirose, J.; Hibino, S. Antioxidant effects of the highly-substituted carbazole alkaloids and their related carbazoles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 24, p. 3530-3533, 2014.
- Hirschmann, G. S.; Feresin, G. E.; Lopez, S.; Theoduloz, C.; Rodriguez, J.; Tapia, A. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, p 155-161, 2004.
- Hsouna, A.B.; Trigui, M.; Culioli, G.; Blache, Y.; Jaoua, S. Antioxidant constituents from *Lawsonia inermis* leaves: Isolation, structure elucidation and antioxidative capacity. *Food Chemistry*, v. 125, p. 193-200, 2011.
- Idowu, T.O.; Ogundaini, A.O.; Salau, A.O.; Obuotor, E.M; Bezabih, M.; Abegaz, M. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. *Phytochemistry*, v. 71, p. 17-18, 2010.
- Jang, Y.Y.; Song, J.H.; Shin, Y.K.; Han, E.S.; Lee, C.S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacological Research*, v. 42, n. 361-371, 2000.
- Jaskóla, K.M.; Jasiewicz, B.; Mrówczyńska, L. Nicotine alkaloids as antioxidant and potential protective agents against *in vitro* oxidative haemolysis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 243, p. 62-71, 2016.
- Jeong, T. S; Sok, D.E; Cho, K.H.; Kim, J. R.; Baek, J.H.; Lee, W.S. Antioxidant activities of a new lignan and a neolignan from *Sarururus chinensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14, p 5623-5628, 2004.

Jiang, X.; Jia, L.W.; Li, X.H.; Cheng, X.S.; Xie, J.Z.; Ma, Z.W.; Xu, W.J.; Liu, Y.; Yao, Y.; Du, L.L.; Zhou, X.W. Capsaicin ameliorates stress-induced Alzheimer's disease-like pathological and cognitive impairments in rats. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 35, n. 1, p. 91-105, 2013.

Jiménez, I.; Garrido, A.; Bannach, R.; Gotteland, M.; Speisky, H. Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. *Phytotherapy Research*, v. 14, p. 339-343, 2000.

Jun, H.; Xiaoling, Y.; Wei, W.; Hao, W.; Lei, H.; Lijun, D. Antioxidant activity *in vitro* of three constituents from *Caesalpinia sappan* L. *Tsinghua Science and Technology*, v. 13, n. 4, p. 474-479, 2008.

Jung, H.A.; Min, B.S.; Yokozawa, T.; Lee, J.H.; Kim, Y.S.; Choi, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of coptidis rhizoma alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 32, n. 8, p. 1433-1438, 2009.

Kettmann, V.; Kosfálová, D.; Jantová, S.; Cernáková, M.; Drímal, J. *In vitro* cytotoxicity of berberine against HeLa and L1210 cancer cell lines. *Pharmazie*, v. 59, n. 7, p. 548-551, 2004.

Khalid, A.; Zaheer Ul, H.; Ghayur, M.N.; Feroz, F.; Atta Ur, R.; Gilani, A.H.; Choud-Hary, I. Cholinesterase inhibitory and spasmolytic potential of steroidal alkaloids. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 92, p. 477-484, 2004.

Khan et al., 2004

Kim, D.H.; Jang, Y.Y.; Han, E.S.; Lee, C.S. Protective effect of harmaline and harmalol against dopamine- and 6-hydroxydopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosomes, and viability loss of PC12 cells. *European Journal of Neuroscience*, v. 13, n. 1861-1872, 2001.

Kinoshita, S.; inouea, Y.; Nakamaa, S.; Ichibab, T.; Aniya, Y. Antioxidant and hepatoprotective actions of medicinal herb, *Terminalia catappa* L. from Okinawa Island and its tannin corilagin. *Phytomedicine*, v. 14, p. 755-762, 2007.

Kita, Y.; Ago, Y.; Higashino, K.; Asada, K.; Takano, E.; Takuma, K.; Matsuda, T. Galantamine promotes adult hippocampal neurogenesis via M<sub>1</sub> muscarinic and  $\alpha$ 7 nicotinic receptors in mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, v. 17, n. 12, p. 1957-1968, 2014.

Klimaczewski, C.V.; Saraiva, R.A.; Roos, D.H.; Boligon, A.; Athayde, M.L.; Kamdem, J.P.; Barbosa, N.V.; Rocha, J.B.T. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, v. 54, p. 240-247, 2014.

Konrath, E.L.; Passos, C.O.S.; Klein, L.C.; Henriques, A.T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 65, n. 12, p. 1701-1725, 2013.

Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

Küpeli, E.; Kosçar, M.; Yesçilada, E.; Hüsnü, K.; Başçer, C.A. Comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects of isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish berberis species. *Life Sciences*, v. 72, n. 6, p. 645-657, 2002.

Laurent, C.; Eddarkaoui, S.; Derisbourg, M.; Leboucher, A.; Demeyer, D.; Carrier, S.; Schneider, M.; Hamdane, M.; Müller, C.E.; Buée, L.; Blum, D. Beneficial effects of caffeine in a transgenic model of Alzheimer's disease-like tau pathology. *Neurobiology of Aging*, v. 35, n. 9, p. 2079-2090, 2014.

Leon-Carmona, J.R.; Galano, A. Uric and 1-methyluric acids: metabolic wastes or antiradical protectors? *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 115, n. 51, p. 15430-15438, 2011.

Letasiová, S.; Jantová, S.; Cipák, L.; Múcková, M. Berberine antiproliferative activity *in vitro* and induction of apoptosis/necrosis of the U937 and B16 cells. *Cancer Letters*, v. 239, n. 2, p. 254-262, 2006.

Linert, W.; Bridge, M.H.; Hubert, M.; Bjugstad, K.B.; Grossman, S.; Arendash, G.W. *In vitro* and *in vivo* studies investigating possible antioxidant actions of nicotine: relevance to Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1454, p. 143-152, 1999.

Liu, X.; Cui, C.; Zhao, M.; Wang, J.; Luo, W.; Yang, B.; Jiang, Y. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 109, 909-915, 2008.

Ma, L.; Xiao, P.; Guo, B.; Wu, J.; Liang, F.; Dong, S. Cerebral protective effects of some compounds isolated from traditional Chinese herbs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, v. 24, n. 4, p. 238-239, 1999.

Matharu, B.; Gibson, G.; Parsons, R.; Huckerby, T.N.; Moore, S.A.; Cooper, L.J.; Millichamp, R.; Allsop, D.; Austen, B. Galantamine inhibits beta-amyloid aggregation and cytotoxicity. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 280, n. 1-2, p. 49-58, 2009.

Melo, J.B.; Sousa, C.; Garção, P.; Oliveira, C.R.; Agostinho, P. Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons. *European Journal of Neuroscience*, v. 29, n. 3, p. 455-464, 2009.

Milner, S.E.; Brunton, N.P.; Jones, P.W.; O'Brien, N.M.; Collins, S.G.; Maguire, A.R. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, p. 3454-3484, 2011.

Moura, D.J.; Richter, M.F.; Boeira, J.M.; Henriques, J.A.P.; Saffi, J. Antioxidant properties of beta-carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis*, v. 22, p. 293-302, 2007.

Nehlig, A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 23, n. 4, p. 563-576, 1999.

Ng, Y.P.; Or, T.C.T.; Ip, N.Y. Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, v. 89, p. 260-270, 2015.

O'Brien, P.; Carrasco-Pozo, C.; Speisky, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, v. 159, p. 1-17. 2006.

Oh, T.Y.; Lee, J.S.; Ahn, B.O.; Cho, H.; Kim, W.B.; Surch, Y.J.; Cho, S.W.; Hahm, K.B. Oxidative damages are critical in pathogenesis of reflux esophagitis implication of antioxidants in its treatment. *Free Radical Biology and Medicine* 30, p 905–915, 2001.

Pfundstein, B.; Desouky, S.K.E.; Hull, W.E.; Haubner, R.; Erben, G.; Owen, R.W. Polyphenolic compounds in the fruits of Egyptian medicinal plants (*Terminalia bellerica*, *Terminalia chebula* and *Terminalia horrida*): Characterization, quantitation and determination of antioxidant capacities. *Phytochemistry*, v. 71, 1132-1148, 2010.

Pithayanukul, P.; Nithitanakool, S.; Bavovada, R. Hepatoprotective potential of extracts from seeds of *Areca catechu* and nutgalls of *Quercus infectoria*. *Molecules*, v. 14, p. 4987-5000, 2009.

Qian, L.; TAN, K.S.; Wei, S.J.; Wu, H.M.; Xu, Z.; Wilson, B.; Lu, R.B.; Hong, J.S.; Flood, P.M. Microglia-mediated neurotoxicity is inhibited by morphine through an opioid receptor-independent reduction of NADPH oxidase activity. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 2, p. 1198-1209, 2007.

Racková, L.; Májeková, M.; Kost'álová, D.; Stefek, M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium* - structural aspects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 17, p. 4709-4715, 2004.

Rambhia, S.; Mantione, K.J.; Stefano, G.B.; Cadet, P. Morphine modulation of the ubiquitin-proteasome complex is neuroprotective. *Medical Science Monitor*, v. 11, n. 11, p. 386-396, 2005.

Robinson, E.S.J.; Anderson, N.J.; Crosby, J.; Nutt, D.J.; Hudson, A.L. Endogenous  $\beta$ -carbolines as clonidine-displacing substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1009, p. 157-166, 2003.

Rommelspacher, H.; May, T.; Susilo, R.  $\beta$ -carbolines and tetrahydroisoquinolines: detection and function in mammals. *Planta Medica*, v. 57, p. 85-92, 1991.

Sarker, S.D.; Kumarasamy, Y.; Shoeb, M.; Celik, S.; Yucel, E.; Middleton, M.; NAHAR, L. Antibacterial and antioxidant activities of three Turkish species of the genus *Centaurea*. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, v. 5, p. 246-250, 2005.

Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J.A.; Theoduloz, C.; Astudillo, S.L.; Feresin, G.E.; Tapia, A. Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol (Boldo). *Free Radical Research*, v. 37, p. 447-452, 2003.

Simirgiotis, M.J.; Schmeda-Hirschmann, G. Direct identification of phenolic constituents in boldo folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 443-449, 2010.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed, Porto Alegre, RS: Editora da UFRGS, 2010.

Singh, M.; Kaur, M.; Kukreja, H.; Chugh, R.; Silakari, O.; Singh, D. Acetyl-cholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins toneuroprotection. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 70, p. 165-188, 2013.

Soto, C.; Caballero, E.; Perez, E.; Zuniga, M.E. Effect of extraction conditions on total phenolic content and antioxidant capacity of pretreated wild *Peumus boldus* leaves from Chile. *Food and Bioproducts Processing*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.002>.

Speisky, H.; Cassels, B.K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. *Pharmacological Research*, v. 29, p. 1-12, 1994.

Su, T.; Xie, S.; Wei, H.; Yan, J.; Huang, L.; Li, X. Synthesis and biological evaluation of berberine-thiophenyl hybrids as multi-functional agents: inhibition of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and A $\beta$  aggregation and antioxidant activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 18, p. 5830-5840, 2013.

Tavares, L.; Carrilho, D.; Tyagi, M.; Barata, D.; Serra, A.T.; Duarte, C.M.M.; Duarte, R.o.; Feliciano, R.P.; Bronze, M.R.; Chicau, P.; Espírito-Santo, M.D.; Ferreira, R.B.; Dos Santos, C.N. Antioxidant capacity of Macaronesian traditional medicinal plants. *Molecules*, v. 15, p. 2576-2592, 2010.

Taveira, M.; Sousa, C.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Teixeira, J.P.; Andrade, P.B. Neuroprotective effect of steroidal alkaloids on glutamate-induced toxicity by preserving mitochondrial membrane potential and reducing oxidative stress. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 140, p. 106-115, 2014.

Tran, Q.L.; Tezuka, Y.; Ueda, J.Y.; Nguyen, N.T.; Maruyama, Y.; Begum, K.; Kim, H.S.; Wataya, Y.; Tran, Q.K.; Kadota, S. *In vitro* antiplasmodial activity of antimalarial medicinal plants used in vietnamese traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 86, n. 2-3, p. 249-252, 2003.

Trevisan, M.T.S.; Pfundstein, B.; Haubner, R.; Würtele, G.; Spiegelhlder, B.; Bartsch, H.; Owen, R.W. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 188-197, 2006.

Tsvetkova, D.; Obreshkova, D.; Zheleva-Dimitrova, D.; Saso, L. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, v. 20, n. 36, p. 4595-4608, 2013.

Weng, X. C.; Wang, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. *Food Chemistry*, 71, p 489-493, 2000.

Wernicke, C.; hellmann, J.; Zieba, B.; Kuter, K.; Ossowska, K.; Frenzel, M.; et al. 9-Methyl- $\beta$ -carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease. *Pharmacological Reports*, v. 62, p. 35-53, 2010.

Wetscher, G.J.; Bagchi, M.; Bagchi, D.; Perdakis, G.; Hinder, P.R.; Glaser, K.; Hinder, R.A. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue, Free Radic. *Biology and Medicine*, v. 18, p. 877-882, 1995.

Yang, C. R.; Zhang, Y. J.; Wang, K. J. Antioxidant phenolic constituents from *Fagopyrum dibotrys*. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, p 259-264, 2005.

Ye, M.; Fu, S.; Pi, R.; He, F. Neuropharmacological and pharmacokinetic properties of berberine: a review of recent research. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, n. 7, p. 831-837, 2009.

Yildiz, D.; Liu, Y.S.; Ercal, N.; Armstrong, D.W. Comparison of pure nicotine and smokeless tobacco extract-induced toxicities and oxidative stress. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 37, p. 434-439, 1999.

Zhang, Z.; Liao, L.; Moore, J.; Wua, T.; Wang, Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chemistry*, v. 113, p. 160-165, 2009.

Zhao, T.; Zheng, S.S.; Zhang, B.F.; Li, Y.Y.; Bligh, S.W.A.; Wang, C.H.; et al. Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. *Food Chemistry*, v. 134, p. 1096-1105, 2012.

Zheng, L.; Zhou, Z.; Tao, D.; Lan, T. Protective effect of berberine on cardiac myocyte injured by ischemia-reperfusion. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, v. 34, n. 3, p. 452-454, 2003.

Zielinski, A.A.F.; Haminiuk, C.W.I.; Alberti, A.; Nogueira, A.; Demiate, I.M.; Granato, D. A comparative study of the phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>.