



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

GISLÁINE CORREA DA SILVA

IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES, QUANTIFICAÇÃO DE ISOVITEXINA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA *IN VITRO* DOS EXTRATOS METANÓLICO E GLICÓLICO DE *Passiflora coccinea* (AUBL.)

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.

ORIENTADORA: Profa. Dra. CARLA BEATRIZ GRESPAN BOTTOLI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCOS JOSÉ SALVADOR

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR GISLÁINE CORREA DA SILVA, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CARLA BEATRIZ GRESPAN BOTTOLI.

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si38i Silva, Gisláine Correa da (1985-).
Identificação de flavonoides, quantificação de isovitexina e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* dos extratos metanólico e glicólico de *Passiflora coccinea* (Aubl.) / Gisláine Correa da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientadora: Carla Beatriz Grespan Bottoli.
Coorientador: Marcos José Salvador

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Passiflora coccinea*. 2. Flavonoides. 3. Isovitexina. 4. Antioxidante. 5. Fotoproteção. I. Bottoli, Carla Beatriz Grespan. II. Salvador, Marcos José. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Identification of flavonoids, quantification of isovitexin and evaluation of antioxidant and photoprotective *in vitro* activities of methanolic and glycolic *Passiflora coccinea* (Aubl.) extracts

Palavras-chave em inglês:

Passiflora coccinea
Flavonoids
Isovitexin
Antioxidants
Photoprotection

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Carla Beatriz Grespan Bottoli [Orientadora]
Isabel Cristina Sales Fontes Jardim
Juliana de Azevedo Lima-Pallone

Data de defesa: 25/05/2012

Programa de pós-graduação: Química

À Deus,

aos meus pais, Luzia F. C. Silva e Wiliam R. P. Silva,
responsáveis por me darem as condições para
chegar o mais longe que eu poderia,

à Dra. Carla B. G. Bottoli,
por confiar na ideia e viabilizar a execução deste projeto
com companheirismo e profissionalismo indiscutíveis,
e aos seus pequeninos Murilo e Mateus, como um incentivo
para que sejam grandes homens de bem,
íntegros e batalhadores,

dedico todos os esforços despendidos.

AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora, pela força e companhia diárias, independentemente do meu merecimento,

Aos funcionários da Biblioteca do Instituto de Química da Unicamp, por me permitirem utilizar as instalações do local para o estudo para a prova de ingresso no mestrado (diariamente e em tempo integral), mesmo eu não tendo vínculo formal com a Unicamp naquele período,

À Dra. Carla B. G. Bottoli, por todo apoio, orientação, confiança, amizade e por ter sido fonte de motivação (a única) para que esse trabalho chegasse até seu final,

Ao Dr. Marcos J. Salvador, por permitir o uso de seus equipamentos para os experimentos deste trabalho,

Ao Dr. Marcelo Dornellas, por permitir o uso do exemplar de *Passiflora coccinea* (Aubl.) para este estudo,

Aos técnicos Rita C. Z. Sousa e Ricardo Pereira, por todo auxílio com a espectrometria de massas e cromatografia líquida de alta eficiência, respectivamente,

Ao Dr. Fabio Gozzo, pela ajuda prestada no entendimento dos espectros de massas,

À Lucília V. Melo e Caroline C. Lourenço, por todo suporte prestado e pela grande amizade,

À minha irmã, Jéssica C. Silva, pelo suporte artístico prestado em diferentes etapas do trabalho,

Ao grupo do prof. Fábio Augusto, por me agregar com muito carinho. Em especial aos membros do “trio”, do qual sou muito feliz em ser parte: Soraia C. G. N. Braga e Gabriela “Slazer” Salazar,

À Alessandra Vieira, pela amizade,

À INOVA – UNICAMP, pela oportunidade de trabalho e pela excelente acolhida nessa nova carreira,

Ao CNPq pela bolsa concedida,

Às instituições Fapesp, Capes, CNPq e INCT-Bioanalítica pelo fomento à pesquisa.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

*“Nove entre dez de meus experimentos falham
e isto é considerado um resultado
muito bom entre os cientistas.”*

Sir Harold Kroto,
Ganhador do prêmio Nobel de química em 1996

*“If we’re not failing ten times more than succeeding,
it means we’re not taking enough risks.”*

Mary Murphy-Hoye
Engenheira, Intel Corp.

CURRICULUM VITAE

Formação acadêmica:

Graduação em Farmácia – Universidade Estadual de Campinas – SP
2005-2009.

Experiência em pesquisa:

* Prestação de serviço: Levantamentos bibliográficos para a Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, 2012.

* Trabalho de conclusão do curso de Farmácia: Preparo de extratos de cinco espécies de *Passiflora* e elaboração de creme hidratante com atividade antioxidante *in vitro*, 2009. Orientador: Dr. Marcos José Salvador.

* Estágio no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – Unicamp): Obtenção, fracionamento e análise de óleos essenciais de plantas da família *Myrtaceae* por GC-MS, 2009. Orientadora: Dra. Vera Lucia Garcia Rheder.

* Iniciação científica em Microbiologia (Instituto de Biologia - Unicamp) para os cumprimentos das disciplinas BS325 e BS425 (iniciação científica em ciências farmacêuticas) do curso de Farmácia – Unicamp. Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite:

- Controle de qualidade microbiológica de matérias primas vegetais, 2007;
- Qualidade microbiológica de sucos vendidos na Unicamp, 2008.

Experiência adicional:

* INOVA – UNICAMP - Analista de Propriedade Intelectual, Campinas, SP. Atual.

* Ao Farmacêutico – Farmácia de manipulação, Campinas, SP. 2008-2009

* Hospital Estadual de Sumaré – Estágio voluntário, Sumaré, SP. 2009

Cursos:

* Workshop em avanços recentes no preparo de amostras, USP, Ribeirão Preto, SP, 2012.

* Minicurso: Calibração multivariada, 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, SP, 2011

* Especialização em Cosmetologia clínica e dermocosméticos.
Instituto Maurício Pupo, IPUPO, 2011-2012

* Curso básico de propriedade intelectual.
INOVA UNICAMP, 2010

*Prática Cosmética.
Instituto Maurício Pupo, IPUPO, 2010

*Propriedade Intelectual e Busca em Bases.
INOVA UNICAMP, 2010

Disciplinas cursadas durante o mestrado:

- QP219 Técnicas de Eletromigração em Capilares
- QP227 Fundamentos de Química Analítica
- QP313 Métodos Espectroquímicos de Análise
- TP333 Planejamento Experimental e Otimização de Processos
- QP216 Técnicas Cromatográficas e Eletroforéticas
- QP812 Tópicos Especiais em Química Analítica VIII (Introdução a métodos quimiométricos)
- QP418 Tópicos Especiais em Química Analítica IX (Microextração em fase sólida – SPME)

Participação em congressos:

* 35ª RASBQ, Águas de Lindóia, SP, 2012: “Identificação de flavonoides e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora direta *in vitro* de cremes contendo extratos glicólico e metanólico de *Passiflora coccinea* (Aubl.)”. Apresentação de pôster.

* 16º Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, SP, 2011: “Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de *Passiflora coccinea* (Aubl.) e caracterização dos flavonoides por ESI-MS/MS e HPLC-DAD.” Apresentação oral e sob a forma de pôster.

* 5º Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Rio de Janeiro, RJ, 2009: “Avaliação da atividade antimicrobiana e composição química de óleos essenciais de cinco espécies de plantas do gênero *Eugenia*.” Apresentação de pôster.

RESUMO

As espécies do gênero *Passiflora* são ricas em flavonoides, que apresentam atividade antioxidante e, por isso, têm potencial para uso em formulações que combatam o envelhecimento extrínseco da pele. Esse envelhecimento está ligado à formação de espécies reativas de oxigênio pela absorção da radiação ultravioleta. Neste contexto, formulações fotoprotetoras contendo antioxidantes podem contribuir para com a defesa da pele contra essas espécies reativas. Com isso, este trabalho visou à identificação e quantificação de flavonoides nos extratos metanólico (rico em flavonoides) e glicólico (empregável em fitocosméticos), de folhas *Passiflora coccinea* (Aubl.) obtidos por ultrassom ou maceração à temperatura ambiente ou a 30 °C. Avaliaram-se as atividades antioxidantes, pelos métodos DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil) e ORAC- FL (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, realizado com fluoresceína), e fotoprotetoras direta *in vitro* dos extratos dentro e fora de uma formulação creme. Os extratos metanólicos apresentaram atividades antioxidantes semelhantes entre si, enquanto que, dentre os extratos glicólicos, o de maior atividade, inferior a dos extratos metanólicos, foi obtido por maceração a 30 °C por 72 h. Os extratos foram individualmente incorporados a um creme e não apresentaram fotoproteção direta. Apenas o creme contendo o extrato metanólico a 1,0% (m/m) apresentou atividade antioxidante, mensurável pelo DPPH. Foi constatada a possível presença dos flavonoides vitexina, isovitexina e 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina por espectrometria de massas (ESI(-)-MS/MS) e a confirmação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Quantificou-se a isovitexina nos extratos de maior atividade por HPLC-DAD, encontrando-se $(2,28 \pm 0,06)$ mg g⁻¹ no extrato metanólico e $(0,18 \pm 0,01)$ mg g⁻¹ no extrato glicólico, revelando o menor poder extrator do propilenoglicol. O método de quantificação foi validado de acordo com o ICH (2005) e os flavonoides encontrados foram descritos pela primeira vez em *Passiflora coccinea* por este trabalho.

Palavras chave: *Passiflora coccinea*, flavonoides, antioxidante, fotoproteção, isovitexina

ABSTRACT

Passiflora genus comprises flavonoid-rich species. Flavonoids present antioxidant activity and, thus, are potentially useful in anti-aging formulations. The skin ageing process can be linked to reactive oxygen species formation due to UV radiation absorption. In this context, photo protective formulations containing antioxidants may contribute to the skin's defense against these reactive species. Therefore, the present work aimed at the identification and quantification of flavonoids in methanolic (flavonoid-rich) and glycolic (used in phytocosmetics) *Passiflora coccinea* (Aubl.) extracts obtained by ultrasound assisted extraction, maceration at room temperature and maceration at 30 °C. The antioxidant activity through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical) and ORAC-FL (Oxygen Radical Absorbance Capacity, using fluorescein as a probe) and the *in vitro* sunscreen activity of the extracts outside of and in a cosmetic formula were evaluated. The methanolic extracts presented similar antioxidant activities, while among the glycolic extracts, the most active one, although presenting inferior performance in relation to the methanolic extracts, was the one obtained by maceration at 30°C for 72 h. All the extracts were individually incorporated into a moisturizing cream and did not present sunscreen activities. Only the methanolic extract cream at 1.0 % (w/w) showed measurable antioxidant activity by the DPPH test. The possible presence of vitexin, isovitexin and 2''-O-β-D-glucopyranosyl-vitexin were established by mass spectrometry (ESI(-)-MS/MS) and confirmed by high performance liquid chromatography coupled with a diode array detector (HPLC-DAD). Isovitexin was quantified in the most active extracts by HPLC-DAD, revealing (2.28 ± 0.06) and (0.18 ± 0.01) mg g⁻¹ of isovitexin in the methanolic and glycolic extracts, respectively, and showing the lower extraction power of propylene glycol. The quantification method was validated according to ICH (2005). The flavonoids found in this work are identified for the first time in *Passiflora coccinea*.

Key words: *Passiflora coccinea*, flavonoids, antioxidant, photoprotection, isovitexin

LISTA DE ABREVIATURAS

- AAPH** - Diidrocloridrato de 2,2'-azobis-2- metilpropionamidina
- ACN** - Acetonitrila
- DAD** - Detector por arranjo de diodos (do inglês *Diode Array Detector*)
- DPPH** - Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
- EROs** - Espécies reativas de oxigênio (ou, em inglês, **ROs**, Reactive Oxygen Species)
- ESI(-)-MS/MS** - Espectrometria de massas com analisadores sequenciais e ionizador por eletronebulização no modo negativo.
- ET** - Transferência de elétrons (do inglês *Electron Transfer*)
- FE** - Fase estacionária
- FL** - Fluorescência
- FPS** - Fator de proteção solar
- HAT** - Transferência de átomo de hidrogênio (do inglês *Hydrogen Atom Transfer*)
- HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)
- ICH** - Conferência internacional em harmonização (do inglês *International Conference on Harmonization*)
- INCI** - International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
- LD** - Limite de detecção
- LQ** - Limite de quantificação
- m/z** - Razão massa/carga
- MS** - Espectrometria de massas (do inglês *Mass Spectrometry*)
- ORAC-FL** - Do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, realizado com fluoresceína
- THF** - Tetrahidrofurano
- TFA** - Ácido trifluoracético
- SPE** - Extração em fase sólida (do inglês *Solid Phase Extraction*)
- UV** - Ultravioleta
- UV/Vis** - Ultravioleta / visível
- UVA** - Faixa do ultravioleta entre 320-400 nm
- UVB** - Faixa do ultravioleta entre 280-320 nm

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Benefícios dos flavonoides em formulações tópicas

Tabela 2: Extratos com atividade antioxidante empregados em formulações tópicas

Tabela 3: Flavonoides encontrados em *Passiflora*

Tabela 4: Condições de análise dos flavonoides das espécies mais utilizadas de *Passiflora* por HPLC

Tabela 5: Composição da emulsão base

Tabela 6: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade solar em cada comprimento de onda (Mansur *et al.*, 1986) ^[62]

Tabela 7: Condição de extração em fase sólida de flavonoides em *Passiflora* ssp. (adaptação de Pereira *et al.*, 2004) ^[21]

Tabela 8: Razões m/z observadas nos espectros e possíveis compostos presentes.

Tabela 9: Resolução dos picos de interesse

Tabela 10: Resoluções do pico da isovitexina

Tabela 11: Parâmetros das curvas analíticas

Tabela 12: Comparação dos coeficientes angulares das curvas construídas por adição de padrão com relação à curva construída no solvente

Tabela 13: Recuperação e eficiência de extração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O núcleo flavan

Figura 2: Exemplos de filtros UVB. A) Octil metoxicinamato. B) Octil salicilato C) Octocrileno

Figura 3: Estrutura da avobenzona

Figura 4: Estrutura da oxibenzona

Figura 5: Filtros solares de amplo espectro. A) Ácido tereftalidênico dicânfora sulfônico. B) Drometrizol trissiloxânico.

Figura 6: A) Tinossorb M. B) Tinossorb S

Figura 7: A) Ácido ascórbico. B) Ascorbil palmitato

Figura 8: As 8 formas de vitamina E

Figura 9: A) O núcleo flavan. B) Rutina: um flavonoide glicosilado. C) Quercetina: um flavonoide aglicona

Figura 10: Flores de *Passiflora sp.* A) *P. alata* B) *P. edulis*

Figura 11: A) Apigenina B) Luteolina C) Vitexina: um derivado C-glicosilado da apigenina

Figura 12: A) Glicerina B) Propilenoglicol

Figura 13: *Passiflora coccinea* (Aubl.)

Figura 14: Cinética de reação dos extratos ($12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do padrão rutina ($6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) com o radical DPPH. MeOH: extrato metanólico; PPG: extrato glicólico

Figura 15: Curvas de decaimento da fluorescência ao longo do tempo. Diluição 1:1000.

Figura 16: Espectros de absorção UV. A) extratos metanólicos (1 mg mL^{-1}) de *P. coccinea* em etanol. B) Glicólicos (10 mg mL^{-1}) de *P. coccinea* em etanol

Figura 17: Fotografia dos cremes formulados com os extratos. Não houve separação de fases em nenhum dos casos

Figura 18: Espectros de absorção dos cremes na região do UV, na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ em etanol. Os valores em parênteses indicam a porcentagem do extrato na formulação (m/m)

Figura 19: Curva de decaimento dos cremes com extratos metanólicos 1 % (m/m). Diluição 1:1000

Figura 20: Fingerprint dos extratos metanólicos. A) Ultrassom. B) Maceração a temperatura ambiente. C) Maceração a 30°C. Condições descritas no item 4.2.1

Figura 21: Fingerprint dos extratos glicólicos. A) Ultrassom. B) Maceração a temperatura ambiente. C) Maceração a 30°C. Condições descritas no item 4.2.1

Figura 22: A) Extrato metanólico ultrassom. B) Extrato glicólico maceração 30°C. Notar a semelhança no perfil de ambos os extratos (destaque em vermelho)

Figura 23: Fragmentação do pico de razão m/z 593. A) fração do extrato metanólico. B) padrão de 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina. Energia de colisão: 15 V

Figura 24: Fragmentação do pico de razão m/z 431. A) fração do extrato metanólico. B) isovitexina. C) vitexina. Energia de colisão: 20 V

Figura 25: Cromatogramas da separação dos flavonóides: 1) 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina (16,699 min) , 2) vitexina (18,842 min) e 3) isovitexina (20,141 min). A) Extrato metanólico ultrassom. B) Extrato glicólico maceração 30 °C. PPG: propilenoglicol. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher RP-18e (Merck) (250 mm x 4 mm), 5 mm de partícula, volume de injeção: 5 mL . Fase móvel: H₂O:H₃PO₄ pH 2,65 (A) e ACN:THF 95:5 (v/v) (B). Eluição por gradiente: 0-11 min, 5-18 % B; 11-35 min, 18-19 % B; 35-36 min, 19-5 % B e 37 min, 5 % B. Vazão de 1 mL min⁻¹. UV: 330 nm

Figura 26: Espectro dos picos correspondentes aos flavonóides nas amostras com e sem fortificação: 1) 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina. 2) Vitexina. 3) Isovitecina

Figura 27: A) Cromatograma do extrato metanólico (ultrassom) com destaque para a isovitexina em azul (dir). Espectros do pico da isovitexina em 3 regiões (início, ápice e cauda). B) Idem para o extrato glicólico. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher RP-18e (Merck) (250 mm x 4 mm), 5 mm de partícula, volume de injeção: 5 mL . Fase móvel: H₂O:H₃PO₄ pH 2,65 (A) e ACN (B). Eluição por gradiente: 0-15 min, 5-16 % B; 15-37 min, 16-17 % B; 37-39 min, 17-5 % B e 39-40 min, 5 % B. Vazão de 1 mL min⁻¹. UV: 330 nm

Figura 28: A. Curvas analíticas da isovitexina em solvente, no extrato metanólico (ultrassom) e no extrato glicólico (maceração 30°C). B, C e D: gráficos de distribuição dos resíduos das curvas da isovitexina em solvente, no extrato metanólico e no extrato glicólico, respectivamente

ÍNDICE

Resumo	ix
Abstract	x
Lista de abreviaturas	xi
Lista de tabelas	xii
Lista de figuras	xiii
Introdução Geral	1
Capítulo 1: Revisão bibliográfica	5
1.1 A pele e o estresse oxidativo	6
1.2 Fotoproteção	8
1.3 Os flavonoides e a fotoproteção	15
1.4 O gênero <i>Passiflora</i>	18
1.4.1 Características e relevância do gênero	18
1.4.2 Flavonoides de <i>Passiflora</i>	20
1.4.2.1 Descrição dos flavonoides	20
1.4.2.2 Extração e análise dos flavonoides	21
1.4.2.3 Atividade antioxidante e fotoprotetora de <i>Passiflora</i>	27
1.4.2.4 <i>Passiflora coccinea</i> (Aubl.)	29
Capítulo 2: Objetivos	31
Capítulo 3: Preparo dos extratos e avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora de <i>P. coccinea</i>	33
3.1 INTRODUÇÃO	34
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.2.1 Coleta e preparo do material vegetal	34
3.2.2 Otimização da extração	34
3.2.2.1 Extração por ultrassom	35
3.2.2.2 Extração por maceração à temperatura ambiente	35
3.2.2.3 Extração por maceração em temperatura controlada (30°C)	36
3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos produzidos	36
3.2.3.1 DPPH	36
3.2.3.1.1 Extratos metanólicos	36
3.2.3.1.2 Extratos glicólicos de <i>P. coccinea</i> e chá verde	37
3.2.3.1.3 Avaliação dos resultados	38

3.2.3.2	ORAC-FL	38
3.2.4	Ensaio de fotoproteção direta <i>in vitro</i>	39
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos incorporados em emulsão base	41
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.3.1	Atividade antioxidante	41
3.3.2	Atividade fotoprotetora direta	45
3.3.3	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos incorporados a uma formulação base	47
3.4	CONCLUSÃO	48
Capítulo 4:	Identificação de flavonoides e quantificação de isovitexina nos extratos metanólico e glicólico de <i>P. coccinea</i>	50
4.1	INTRODUÇÃO	51
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.2.1	Caracterização dos extratos por espectrometria de massas com ionização por eletronebulização	51
4.2.2	Desenvolvimento de um método de separação por HPLC-DAD para os flavonoides identificados	52
4.2.3	Otimização da extração em fase sólida (SPE)	53
4.2.4	Desenvolvimento e validação de um método para a quantificação de isovitexina nos extratos por HPLC-DAD	54
	4.2.4.1 Seletividade	55
	4.2.4.2 Efeito de matriz	55
	4.2.4.3 Linearidade	56
	4.2.4.4 Limites de detecção e de quantificação	56
	4.2.4.5 Repetibilidade e exatidão	56
	4.2.4.6 Eficiência de extração	57
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.3.1	Caracterização dos extratos por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS	57

4.3.2	Desenvolvimento de um método de separação por HPLC-DAD dos flavonoides identificados por ESI(-)-MS	63
4.3.3	Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da Isovitexina	66
4.4	CONCLUSÕES	72
	Capítulo 5: Conclusões Gerais	73
	BIBLIOGRAFIA	76

INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Passiflora* compreende aproximadamente 500 espécies, as quais se distribuem principalmente pelas regiões temperadas e tropicais das Américas ^[1]. Algumas espécies de *Passiflora*, tais como *P. edulis*, *P. alata* e *P. incarnata*, são popularmente utilizadas principalmente como sedativas e ansiolíticas ^[2-4], sendo que essas duas últimas espécies são drogas vegetais oficiais das Farmacopéias Brasileira e Européia, respectivamente ^[5,6].

De fato, a maior parte dos dados descritos na literatura sobre *Passiflora* foca nos compostos presentes em suas folhas, devido aos seus efeitos sobre o sistema nervoso central ^[7], porém outro potencial apresentado pelas espécies desse gênero é a atividade antioxidante. Estudos fitoquímicos indicam que os flavonóides são a maior parte dos constituintes desse gênero ^[1,4] e esta classe de compostos polifenólicos pode apresentar atividade antioxidante por diferentes mecanismos, como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestradores de oxigênio singlete e quelantes de metais ^[8]. A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo flavan, constituído de quinze átomos de carbono dispostos em três anéis (Figura 1). A diversidade estrutural dos flavonóides emana dos diferentes padrões e graus de hidroxilação, metoxilação, prenilação ou glicosilação do núcleo flavan, dividindo os flavonóides em diferentes subclasses como as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis, antocianinas e anticianidinas ^[8, 9]. Em *Passiflora*, as flavonas C-glicosiladas derivadas de apigenina e luteolina, tais como a vitexina, a orientina, o schaftosídeo e outros, são a principal subclasse de flavonóides encontrada ^[1,4]. As atividades antioxidantes *in vitro* do extrato de algumas espécies, tais como o aquoso ^[2] e hidroalcoólico a 40% ^[3] das folhas de *P. edulis*, o hidroalcoólico a 40% ^[2] das folhas de *P. alata* e o hidroalcoólico a 70% ^[10] de *P. incarnata* já foram descritas.

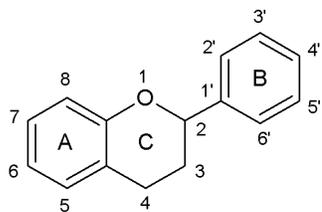


Figura 1: O núcleo flavan ^[9]

A atividade antioxidante dos flavonóides pode ser explorada na prevenção de várias patologias associadas ao estresse oxidativo, como as desordens neurodegenerativas e cardiovasculares ^[2]. Outra condição ligada ao estresse oxidativo é o envelhecimento cutâneo. A pele, além de sofrer as alterações cronológicas características do envelhecimento intrínseco (determinado geneticamente), está exposta a uma variedade de espécies nocivas, tais como a radiação ultravioleta (UV) solar. Os raios UV causam eritema (vermelhidão, que é uma resposta inflamatória decorrente da exposição a essa radiação), dano ao DNA e câncer de pele. Os processos desencadeados pela exposição à radiação UV causam o envelhecimento denominado extrínseco, que pode ser entendido como um acúmulo de mudanças oxidativas na estrutura da pele ^[11,12].

A prevenção ao envelhecimento extrínseco pode ser feita através da fotoproteção, que pode ser atingida por meio de formulações contendo filtros solares orgânicos, os quais absorvem a radiação UV e devolvem a energia absorvida ao ambiente sob a forma de calor, ou inorgânicos, que tanto podem absorver quanto refletir a radiação. Entretanto, os antioxidantes devem ser considerados como agentes fotoprotetores indiretos devido ao fato de a radiação UV promover a formação de radicais livres na pele ^[13]. Apesar de possuir mecanismos de defesa para a proteção contra essas espécies reativas, a pele exposta cronicamente à radiação UV tem sua capacidade de defesa ultrapassada, o que culmina em danos e depleção das substâncias antioxidantes naturais. É neste contexto que formulações contendo uma combinação de antioxidantes podem melhorar o mecanismo de defesa da pele contra os prejuízos causados pelos radicais livres ^[12].

Atualmente, vários extratos vegetais são explorados em formulações por suas propriedades antioxidantes. O extrato de chá verde (*Cammelia sinensis* (L.) Kuntze), por exemplo, é um dos antioxidantes de origem vegetal mais estudados cientificamente e é um efetivo sequestrador de radicais livres, parecendo ser benéfica a sua aplicação quando administrado por via oral ou tópica^[14]. Fatos como esses despertam o interesse pela busca por novos produtos naturais antioxidantes com potencial para uso em formulações de prevenção aos danos causados por ação de espécies reativas sobre a pele. No caso do presente trabalho, tomou-se por base um estudo prévio com cinco diferentes espécies do gênero *Passiflora*, que revelou uma potencial atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico das folhas de *P. coccinea* (Aubl)^[15], uma espécie de *Passiflora* encontrada no norte da América do Sul^[16].

Para o aproveitamento e análise das substâncias antioxidantes de origem vegetal, faz-se necessária uma etapa de extração. O processo de extração é o principal passo para a recuperação e o isolamento de compostos bioativos de materiais vegetais previamente às análises químicas. Após a secagem, moagem e homogeneização, os materiais vegetais podem ser submetidos à extração sólido-líquido, seja por técnicas clássicas como a maceração, a percolação e a extração por Soxhlet, ou por técnicas mais modernas de extração, como as assistidas por micro-ondas ou ultrassom^[9]. Os alcoóis, principalmente o metanol e o etanol, são os solventes mais empregados na extração de compostos polifenólicos de diferentes plantas, mas uma variedade de solventes, tais como acetona e acetato de etila, já foi utilizada com esse mesmo objetivo^[8,9]. No entanto, para uso em formulações fitocosméticas, os extratos glicólicos, que são preparados a partir do propilenoglicol ou da glicerina, são os mais comumente veiculados^[17] e não foram encontrados relatos do estudo das atividades antioxidantes de extratos glicólicos até o presente momento.

Para a determinação e quantificação de substâncias polifenólicas em extratos de *Passiflora*, diferentes técnicas de separação vêm sendo empregadas como a eletroforese capilar (CE, do inglês *Capillary Electrophoresis*), com detector de

ultravioleta-visível (CE-UV/Vis) ^[18] ou por arranjo de diodos (CE-DAD) ^[19, 20] e, com maior frequência, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*), com detectores de ultravioleta-visível (HPLC-UV/Vis) ^[10, 21], por arranjo de diodos (HPLC-DAD) ^[4] ou por espectrometria de massas (HPLC-MS) ^[3, 22]. O uso do detector por fluorescência também já foi descrito para a análise do extrato de folhas de *P. incarnata* ^[23]. Até então, a presença do glicosídeo passiccocina ^[24] é o único relato sobre a composição química de *P. coccinea* e, sabendo-se da atividade antioxidante potencial dos extratos foliares deste gênero, o presente trabalho buscou, principalmente, a identificação e quantificação de flavonoides de seus extratos glicólico e metanólico pelas técnicas de espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (ESI(-)-MS/MS) e HPLC-DAD, além da avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* dos extratos produzidos tanto por um método clássico (maceração) quanto por uma técnica recente de extração (ultrassom).

Este trabalho está dividido em 5 capítulos, em que o capítulo 1 mostra o estado da arte em proteção solar, onde os antioxidantes se enquadram, e o que há de mais recente sobre as espécies do gênero *Passiflora* focando o conceito de fotoproteção, também evidenciando o que vem sendo feito para a extração e análise de flavonoides, avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro*.

No capítulo 2, descrevem-se, com maior detalhamento, os objetivos do presente trabalho, enquanto que o capítulo 3 mostra os resultados da avaliação das atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* dos extratos de *P. coccinea*.

O capítulo 4 trata da avaliação da composição química dos extratos no que diz respeito aos flavonoides e, fechando o trabalho, o capítulo 5 conclui e dá as considerações finais sobre os resultados obtidos.

CAPÍTULO 1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A pele e o estresse oxidativo

A pele, por ser o órgão mais externo do corpo humano, é a principal candidata ao estresse oxidativo. Este órgão funciona como uma proteção física e bioquímica para os órgãos internos, atuando também como uma interface biológica com o meio ambiente. Por este motivo, a pele está exposta a uma variedade de espécies nocivas que, em conjunto, formam um ambiente pró-oxidativo composto pela poluição do ar, pela radiação, por bactérias patogênicas, viroses, substâncias químicas e toxinas. Dentre esses fatores exógenos potencialmente prejudiciais, acredita-se que o maior mediador de danos seja a radiação ultravioleta (UV) ^[25,26,27].

A radiação UV (200-400 nm) corresponde a 5% do total de todo o espectro emitido pelo sol. Tradicionalmente, divide-se a faixa que compreende os comprimentos de onda correspondentes ao UV em UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) e UVA (320-400 nm). A radiação UVC não chega à superfície terrestre, uma vez que é amplamente absorvida pela camada de ozônio. Entretanto, as radiações UVB e UVA atingem a Terra e podem ser absorvidas por diferentes cromóforos da pele, como a melanina, o DNA, o RNA, proteínas, lipídeos, ácido trans-urocânico e outros, gerando uma variedade de efeitos adversos ^[28, 29].

Os primeiros resultados da absorção dos raios UV pelos cromóforos da pele são o desencadeamento de diferentes reações fotoquímicas e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O DNA é a principal molécula a sofrer as lesões fotoquímicas, o que pode resultar em mutações malignas e o surgimento do câncer de pele. Já as EROs podem danificar as estruturas celulares diretamente ou agir como segundos mensageiros nas cascatas de sinalização intracelular, as quais podem induzir ou manter fenótipos celulares oncogênicos ^[28, 29].

A denominação EROs designa os radicais livres formados por meio do oxigênio e as espécies não radicalares que participam ativamente das reações de geração dos radicais. Os radicais livres são átomos ou moléculas contendo um elétron

desemparelhado em um orbital externo. Por terem a tendência de ceder esse elétron ou de captar um elétron de outra molécula para adquirirem configuração eletrônica estável, são espécies extremamente reativas e de vida curta, reagindo próximos ou no local onde são gerados [30, 31]. Dentre as espécies radicalares do oxigênio citam-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e os radicais hidroxila ($\cdot OH$), alcóxila ($RO\cdot$), peróxila ($ROO\cdot$) e óxido nítrico ($NO\cdot$). Quanto às espécies não radicalares, têm-se o ozônio (O_3), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o hidroperóxido e o ácido hipocloroso ($ROOH$ e $HOCl$), o ânion peroxinitrilo ($ONOO^-$) e o oxigênio singlete (1O_2) [30, 32, 33].

A formação de radicais livres em organismos dependentes de oxigênio é fisiológica e, portanto, ocorre continuamente. Essas espécies são geradas em processos controlados, tais como a cadeia respiratória, que gera energia a partir da redução do oxigênio molecular, e o sistema imune, em que macrófagos e neutrófilos as produzem para o ataque a patógenos. Mas, por serem altamente instáveis e inespecíficos, os radicais livres podem reagir com os mais diversos constituintes celulares do próprio organismo (proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos) causando dano estrutural e/ou funcional em nível celular. Apesar desse fato, em condições normais do metabolismo, danos causados ao próprio corpo pela geração endógena de radicais são mínimos, pois sistemas enzimáticos e não enzimáticos atuam neutralizando suas ações nocivas [15].

Na pele, enzimas antioxidantes como a catalase, presentes em peroxissomos, e as glutatona redutase e peroxidase, citoplasmáticas, são responsáveis por destruírem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima superóxido dismutase (SOD), existente nas formas intra e extracelular, também é igualmente importante no processo de inativação de radicais livres por gerar H_2O_2 a partir do ânion superóxido. A atividade enzimática é maior na epiderme, especialmente a da catalase. Já o sistema não enzimático forma uma rede em que os agentes antioxidantes presentes na fase aquosa (glutaciona e ácido ascórbico) interagem com os componentes de fase lipossolúvel (tocoferol e ubiquinol), buscando impedir a peroxidação lipídica e, com isso, a alteração da fluidez das membranas celulares. A concentração desses antioxidantes também é maior na epiderme [30, 32, 34].

Apesar de a pele apresentar um sistema antioxidante para a proteção contra os efeitos danosos das EROs, as situações de estresse oxidativo podem transpor a capacidade enzimática e depletar os antioxidantes naturais. Os efeitos da ação exacerbada dos radicais livres sobre a pele incluem, além da carcinogênese, o envelhecimento extrínseco, caracterizado pela produção de elastina distrófica e de colágeno aberrante em decorrência à exposição crônica à radiação UV, o que culmina em espessamento da epiderme, rugas, aspereza, imunossupressão e pigmentação irregular [35, 36, 37]. É neste contexto em que a fotoproteção se torna importante, servindo como um suporte aos mecanismos naturais de proteção contra o excesso das EROs.

1.2 Fotoproteção

A fotoproteção pode ser atingida por meio de vestimentas, acessórios e pelo uso de protetores solares, que são a principal abordagem contra os efeitos da radiação UV. Protetores solares são preparações cosméticas que podem ser encontradas sob a forma de loções hidroalcoólicas, óleos, géis oleosos, emulsões óleo em água, emulsões água em óleo, bastões, aerossóis e outras. Esses cosméticos atuam protegendo a pele diretamente contra os malefícios causados pelos raios UV por conterem, primordialmente, moléculas capazes de absorver, refletir ou dispersar a radiação. O comércio das primeiras formulações data de 1928 e essas continham cinamato de benzila e salicilato de benzila em suas composições [36, 37].

Nos dias atuais, existem 14 ingredientes ativos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso, comparados com 25 aprovados na Austrália e 23 na União Européia. Esses compostos podem ser divididos em filtros inorgânicos e orgânicos, sendo que cada um deles recebe vários nomes, incluindo as marcas e a nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI, do inglês *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*) [36].

Os filtros inorgânicos agem refletindo ou dispersando a radiação incidida por meio de uma barreira opaca, formada por um filme de partículas sobre a pele. Nos dias de

hoje, o dióxido de titânio (TiO_2) e o óxido de zinco (ZnO) são os filtros inorgânicos mais utilizados, sendo o primeiro um eficiente protetor contra a radiação UVB e, o segundo, um melhor protetor contra UVA. Apesar da segurança do uso desses filtros, inclusive sendo preferíveis em se tratando de crianças e indivíduos alérgicos aos filtros solares orgânicos, alguns dos seus inconvenientes são a coloração opaca esbranquiçada residual sobre a pele após a aplicação, o favorecimento do surgimento de cravos (comedogênese) e a transferência do produto para as vestimentas. O aprimoramento dos filtros solares inorgânicos vem ocorrendo desde o início dos anos 90 com a micronização dos pós, já havendo, inclusive, nanopartículas de TiO_2 e ZnO disponíveis para uso nos dias atuais. Em consequência da diminuição do tamanho das partículas, esses filtros passaram a ser mais aceitos esteticamente por apresentarem menor efeito esbranquiçado, além de terem desempenho superior em fotoproteção com relação às partículas maiores. Em contrapartida, micropartículas tendem a se agregarem, levando à redução da eficácia fotoprotetora. Para prevenir o problema, a estratégia adotada é o recobrimento das partículas com dimeticone ou sílica, também sendo relatado o encapsulamento com cera de carnaúba. Neste último caso, a presença de cinamatos na composição química da cera aumenta tanto a proteção solar na região do UVB quanto na do UVA [36, 37, 38].

Diferentemente dos inorgânicos, os filtros solares orgânicos atuam absorvendo a radiação UV por meio de suas estruturas aromáticas ou conjugadas, devolvendo a energia absorvida sob a forma de calor ao ambiente. Existem três categorias em que esses protetores se enquadram, sendo elas: filtros UVB, filtros UVA e filtros de amplo espectro.

Os cinamatos e os salicilatos fazem parte da categoria dos filtros UVB. Os cinamatos (Figura 2A) são os mais frequentemente usados em formulações por raramente irritarem a pele. Entretanto, são pouco resistentes à água, necessitando de várias reaplicações. Além disso, essas moléculas se degradam com a exposição solar ao longo do tempo, sendo a encapsulação a estratégia adotada para ampliar suas fotoestabilidades. Os salicilatos (Figura 2B) também são seguros e podem

ajudar a solubilizar outros filtros da formulação, inclusive ajudando a evitar a fotodegradação de outros ingredientes fotoprotetores [28,36,37].

O octocrileno (Figura 2C) também é tido como um filtro UVB, apesar de absorver fracamente nessa região do espectro. É um filtro caro e de difícil incorporação em formulações, mas pode colaborar com a fotoestabilidade do produto [36].

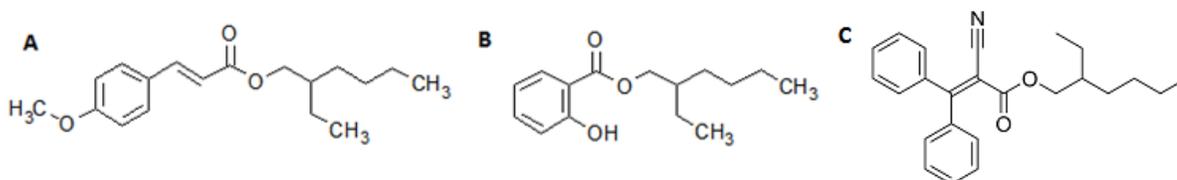


Figura 2: Exemplos de filtros UVB. A) Octil metoxicinamato. B) Octil salicilato. C) Octocrileno

A avobenzona, uma oxibenzona (Figura 3), é um potente filtro UVA. Contudo, sua molécula é extremamente foto lábil: mais da metade de sua capacidade fotoprotetora é perdida após 1 h de exposição solar. Além disso, a avobenzona afeta a estabilidade de outros filtros da formulação e, com isso, esforços vêm sendo feitos para o desenvolvimento de formulações que a estabilizem. Uma alternativa para a solução do problema é a sua combinação com o octocrileno (Figura 2C) [36].

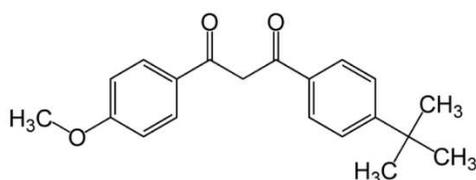


Figura 3: Estrutura da avobenzona

Na classe dos filtros de amplo espectro, capazes de absorver nas regiões do UVB e do UVA, podem-se citar outras benzofenonas, o ácido tereftalidênico dicânfora sulfônico e o drometrizol trissiloxano. Dentre as benzofenonas, a mais utilizada como filtro de amplo espectro é a oxibenzona (Figura 4). No entanto, essa molécula é a que gera a mais alta incidência de dermatites fotoalérgicas de contato [36].

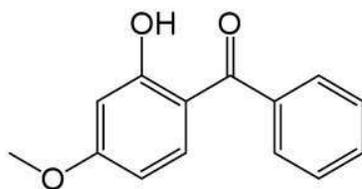


Figura 4: Estrutura da oxibenzona

O ácido tereftalidênico dicânfora sulfônico (Figura 5A) é um filtro solar fotoestável que absorve entre 290 e 390 nm, com pico máximo de absorção em 345 nm. Estudos *in vivo* revelaram sua proteção contra o desenvolvimento de fotodermatoses e fotoenvelhecimento. Esse filtro é frequentemente associado à avobenzona e a filtros UVB para a formulação de protetores solares de amplo espectro [28, 37]. Também pode ser formulado em associação com o drometrizol trissiloxano (Figura 5B), que também absorve nas duas regiões do espectro UV [28].

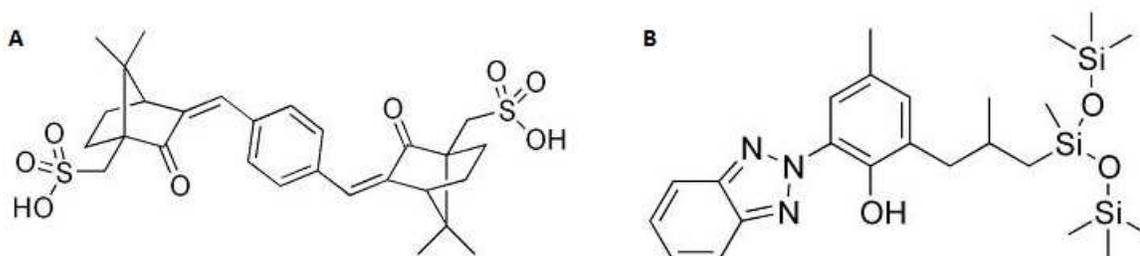


Figura 5: Filtros solares de amplo espectro. A) Ácido tereftalidênico dicânfora sulfônico. B) Drometrizol trissiloxânico

Outros dois filtros de amplo espectro disponíveis atualmente e que merecem destaque são os de nome comercial Tinosorb M (INCI: methylene bis-benzotriazolyl tetramethylbutylphenol) e Tinosorb S (INCI: bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl triazine) (Figura 6). O Tinosorb M é composto de partículas orgânicas microfinas do filtro, dispersáveis na fase aquosa das emulsões dos protetores solares. Já o Tinosorb S é um filtro de alta massa molar, que tem a vantagem de não penetrar na pele e cujo mecanismo de ação é duplo, ocorrendo tanto a absorção quanto a reflexão da radiação UV. O Tinosorb S, ainda, confere fotoestabilidade aos filtros solares contendo avobenzona [28].

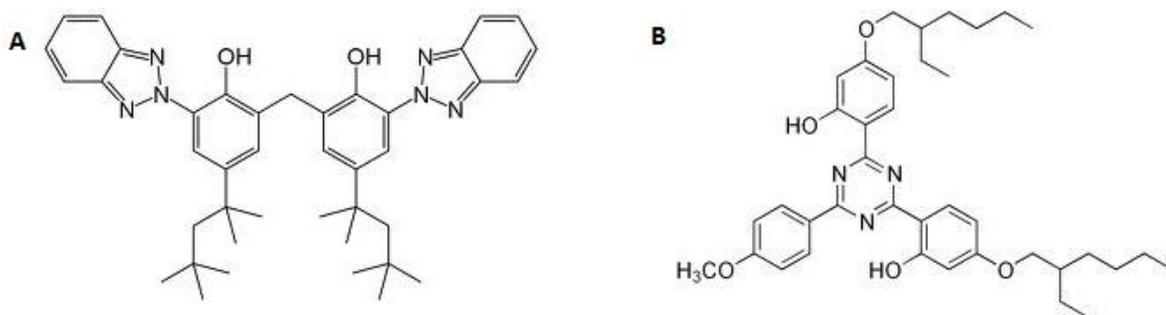


Figura 6: A) Tinosorb M. B) Tinosorb S

O desenvolvimento de filtros solares orgânicos está caminhando para a incorporação das partículas em carreadores como sílica, ciclodextrinas, polímeros e lipídeos. Os filtros encapsulados apresentam maior fotoestabilidade e menor potencial alergênico, além de menor permeação cutânea [37].

À parte do emprego de filtros orgânicos e inorgânicos em formulações cosméticas, uma terceira abordagem em fotoproteção vem sendo empregada atualmente. Trata-se de uma proteção indireta por meio do uso de substâncias antioxidantes, em uma tentativa de reestabelecer os reservatórios naturais da pele e de combater as EROs geradas durante à exposição solar [35]. Um antioxidante pode agir tanto inibindo o processo de ativação da formação dos radicais livres quanto sequestrando-os, sendo a utilização de antioxidantes considerada como uma das alternativas terapêuticas e profiláticas na redução dos danos causados pela exposição aos raios UV [25,26]. Os antioxidantes classicamente veiculados em protetores solares incluem as vitaminas C e E, cujos efeitos contra UVB e UVA já são bem caracterizados [28].

A vitamina C (ácido ascórbico), um antioxidante fisiológico hidrossolúvel participante do sistema não enzimático, é capaz de reduzir o radical hidroperóxido nos compartimentos aquosos da pele e de regenerar a vitamina E foto-oxidada, sendo um composto importante no contrabalanço ao estresse oxidativo cutâneo. Esta vitamina não é sintetizada pelo corpo humano, sendo necessária a sua reposição seja tópica, seja pela alimentação. Outras funções benéficas da vitamina C sobre a pele são a redução da formação de manchas pela inibição da enzima

tirosinase, uma das principais enzimas na via de síntese da melanina, a manutenção da hidratação cutânea e a crucial participação na síntese do colágeno, que é a principal proteína de sustentação da pele. O ácido ascórbico tópico apresenta ações fotoprotetoras, incluindo a redução do eritema e da imunossupressão. Contudo, para veiculação tópica, o ácido deve ser incluído em uma formulação em pH menor que 3,5, de forma que o ativo esteja em sua forma não ionizada para penetrar a pele. Como alternativa a esse desafio, formuladores vêm utilizando substitutos esterificados da vitamina C como o ascorbil-6-palmitato, apesar de sua atividade antioxidante *in vivo* ser inferior à apresentada pela vitamina C em sua forma original [35, 39].

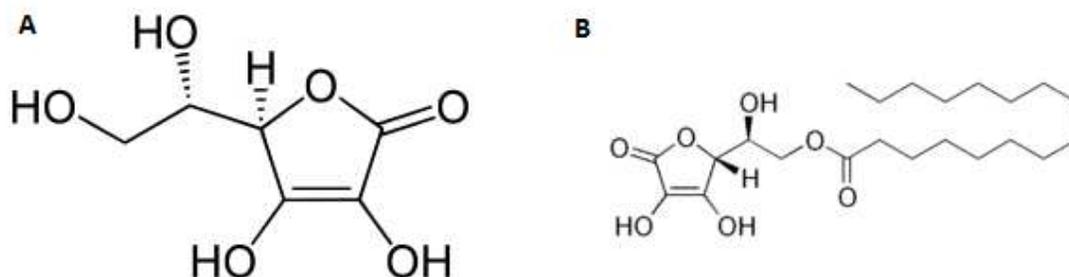


Figura 7: A) Ácido ascórbico. B) Ascorbil palmitato

A vitamina E, outro componente do sistema não enzimático de defesa, também é obtida pela dieta. Apesar de existente sob a forma de quatro isômeros (Figura 8), os humanos possuem uma proteína específica de transferência de alfa-tocoferol para as lipoproteínas, sendo essa forma a mais utilizada pelas células. Na pele, essa vitamina se difunde até o extrato mais externo da pele pelo sebo. Por ser lipossolúvel, sua principal função é a de proteger as membranas celulares do estresse oxidativo. Pela mesma razão, sua absorção cutânea é facilitada, podendo ser administrada topicamente: estudos em animais documentam efeitos protetores da vitamina E tópica, tanto sozinha quanto combinada com vitamina C, quando atuam em sinergismo. Por via oral, a mesma combinação é capaz de proteger contra o eritema induzido por UV em humanos [32, 35, 40].

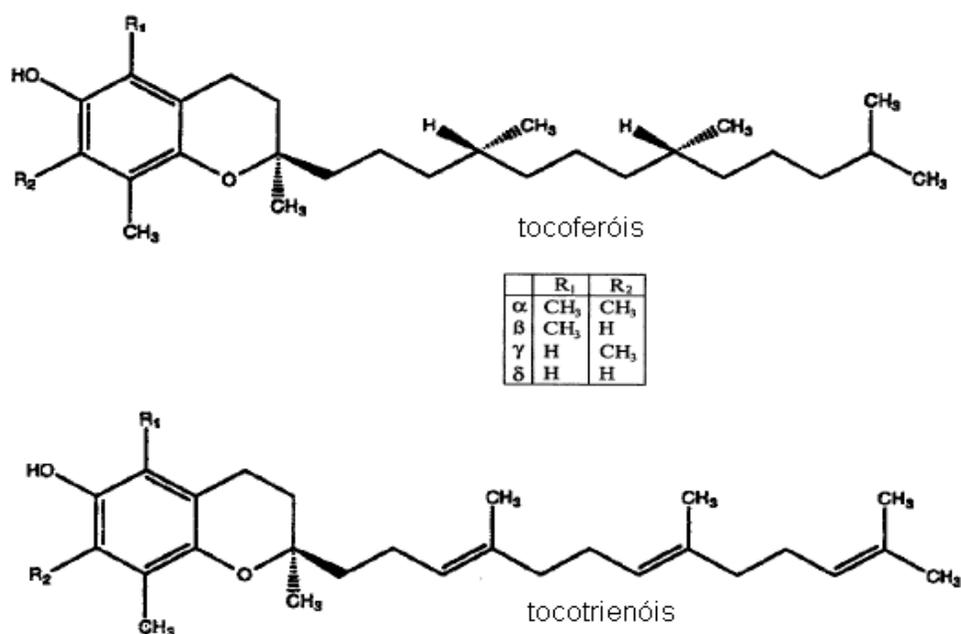


Figura 8: As 8 formas da vitamina E

Outra maneira de se aumentar a capacidade antioxidante da pele é a administração de selênio e zinco. O selênio é um co-fator das enzimas glutathione peroxidase e tireodoxina redutase: quando aplicado por via tópica sob a forma de L-seleniometionina, também é capaz de proteger do eritema da mesma forma que a combinação das vitaminas C e E. Já o zinco influencia a conformação, estabilidade e atividade de diversas moléculas biológicas [32, 35, 41].

A glutathione é outra substância ativa encontrada em cosméticos. Por ser um tripeptídeo com carga, é de difícil absorção cutânea, devendo ser veiculada sob a forma de ésteres (metílico, etílico ou isopropílico). O ácido alfa lipóico também é encontrado em formulações cosméticas por ser um composto altamente antioxidante, potencializando o efeito de outros agentes como a vitamina C, e por auxiliar na eliminação de resíduos tóxicos celulares. Por último, a coenzima Q10 (ubiquinona), de caráter lipofílico, transfere prótons através da membrana mitocondrial neutralizando EROs e evitando danos biomoleculares [39].

A vantagem da administração tópica de quaisquer dessas substâncias é a possibilidade de aumentar a concentração no sítio de ação de maneira a se ter uma dose que efetivamente aja na pele, uma vez que, através da dieta, a disponibilidade desses antioxidantes para o tecido cutâneo é reduzida. Quando se faz a aplicação local de vitamina C, por exemplo, seus níveis na pele aumentam entre 20 e 40 vezes. De maneira semelhante, o aumento da concentração na pele por veiculação de vitamina E tópica é de cerca de 10,6 vezes, enquanto que o selênio aumenta cerca de 1,7 vezes quando administrado topicamente ^[41].

1.3 Os flavonoides e a fotoproteção

Os flavonoides são metabólitos secundários vegetais que ocorrem amplamente no reino vegetal. A estrutura básica dos flavonoides é o núcleo flavan (Figura 9A), constituído de quinze átomos de carbono dispostos em três anéis. A diversidade estrutural dos flavonoides emana dos diferentes padrões e graus de hidroxilação, metoxilação, prenilação ou glicosilação do núcleo flavan, dividindo os flavonoides em diferentes subclasses como as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonóis, flavan-3-óis, antocianinas e anticianidinas ^[8,9]. Nos vegetais, a glicosilação dos flavonóides (Figura 9B) aumenta a solubilidade em água, o que permite a estocagem nos vacúolos celulares, sendo a glicose o açúcar mais comumente ligado. Entretanto, esses compostos podem ser encontrados também sob a forma de aglicona (Figura 9C) ^[42].

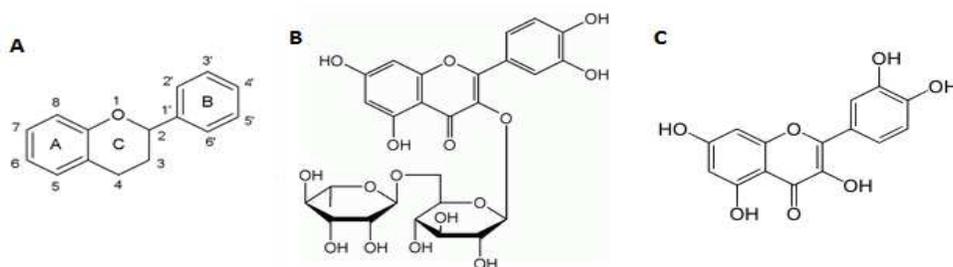


Figura 9: A) O núcleo flavan. B) Rutina: um flavonoide glicosilado. C) Quercetina: um flavonoide aglicona

A função dessas substâncias nas plantas varia desde a proteção contra as ações deletérias dos raios UV e patógenos como vírus, fungos, insetos e bactérias à atração de polinizadores, passando pela contribuição com a pigmentação e pelo controle de hormônios vegetais e de enzimas. A abundância relativa dos flavonoides no reino vegetal, a especificidade em algumas espécies e a relativa estabilidade e facilidade de identificação, fazem desse grupo um marcador quimiotaxonômico [8,42].

No entanto, o que chama a atenção para os flavonoides são as suas aplicações tanto industriais, podendo ser utilizados como corantes naturais, conservantes em alimentos e na produção de tintas e cosméticos, quanto na saúde humana, em que desempenham um importante papel protetor contra a aterosclerose, disfunções cerebrais e o câncer [8]. Uma parte dessas utilizações se deve à atividade antioxidante desses compostos. Os flavonoides são antioxidantes importantes por atuarem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, neutralizadores do oxigênio singlete e quelando metais que possam iniciar ou propagar as reações em cadeia. Contudo, o mecanismo de ação antioxidante mais estudado dos flavonóides é o de captação de radicais livres, propriedade que depende da estrutura química da molécula em relação à capacidade doadora de elétrons e a estabilização do radical formado através da deslocalização do elétron desemparelhado [8, 30].

Vários extratos vegetais ricos em flavonóides neutralizam os efeitos dos radicais livres sobre ácidos graxos e proteínas quando aplicados em animais ou sobre cultura de células. O extrato de *Camellia sinensis* (chá verde ou preto) é um clássico antioxidante por ser rico nos flavonóides epigallocatequina, epigallocatequina-3-galato, epigallocatequina galato e galocatequina, contendo também quercetina, kaempferol e miricetina. Já foi demonstrado que a administração desse extrato por via oral em ratos expostos à radiação UV reduz os danos oxidativos e a indução das metaloproteases [39] e que a (-)-epigallocatequina galato reduz a taxa de formação de tumores cutâneos malignos induzidos por raios UVB quando aplicado topicamente [43]. A administração oral de bebida a base de chá verde em humanos também é capaz de desempenhar um papel fotoprotetor, além de auxiliar na manutenção da estrutura e função da pele [44]. Efeito protetor semelhante ocorre com a aplicação

tópica dos extratos ^[45]. Relata-se que a atividade antioxidante dos polifenóis de chá verde é maior que a das vitaminas C e E; ademais, pode trabalhar em conjunto com a vitamina E, regenerando-a após uma reação com radicais livres ^[32].

Além das propriedades das catequinas do chá-verde, os benefícios de outros flavonoides já puderam ser avaliados em formulações tópicas, alguns sendo mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Benefícios dos flavonoides em formulações tópicas ^[25, 38]

Flavonoide	Fonte (exemplo)	Onde age
Genisteína	Soja	Eritema, fotoenvelhecimento, imunossupressão, fotocarcinogênese.
Equol (metabólito da daidzeína)	Red clover (<i>Trifolium pratense</i>)	Idem genisteína
Apigenina	Camomila	Fotocarcinogênese
Daidzeína	Soja	Eritema
Silimarina/Silibinina	<i>Silybum marianum</i>	Imunossupressão e fotocarcinogênese

Também em decorrência da atividade antioxidante de seus constituintes, em geral polifenólicos, alguns extratos vegetais padronizados são empregados em formulações tópicas com atividade fotoprotetora. A Tabela 2 resume as propriedades desses extratos.

Tabela 2: Extratos com atividade antioxidante empregados em formulações tópicas

Extrato	Fontes	Ação
Resveratrol	Casca de uva, vinho tinto, amendoim	Inibidor de inflamação e de H ₂ O ₂ [25]
Polifenóis do chá verde	<i>Camelia sinensis</i>	Reduz níveis de peróxidos lipídicos induzidos por UVB e previne os danos causados por UVA [28]
Ácidos cafeico e ferúlico	Oliva	Atua no eritema [13]
Pomegranate	<i>Punica granatum</i> (romã)	Combate os efeitos inflamatórios causados por UVB e contra os danos causados por UVA [28]
Pycnogenol	<i>Pinus pinaster</i>	Propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticarcinogênicas [28]
<i>Polypodium leucotomos</i> extract	<i>Polypodium leucotomos</i>	Atua no eritema [13]

1.4 O gênero *Passiflora*

1.4.1 Características e relevância do gênero

Pertencente à família Passifloraceae, o gênero *Passiflora* contém aproximadamente 500 espécies, sendo a maioria delas encontradas nas regiões temperadas e tropicais das Américas Central e do Sul, estando presentes também na América do Norte, no sudeste asiático e na Austrália. Algumas dessas espécies são amplamente cultivadas para o aproveitamento de seus frutos, enquanto muitas outras têm caráter ornamental por suas flores exóticas (Figura 10) [46].



Figura 10: Flores de *Passiflora* sp. A) *P. alata* B) *P. edulis*

Economicamente, as espécies *Passiflora alata* Dryander (maracujá doce) e *Passiflora edulis* Sims (maracujá amarelo) são as mais exploradas. Enquanto *P. alata* destina-se ao consumo *in natura*, *P. edulis* está associada à agroindústria de sucos de frutas, representando 95% dos pomares brasileiros de maracujá [47, 48, 49]. O Brasil, inclusive, é considerado o maior produtor de frutas de *P. edulis* do mundo e essa produção vêm crescendo anualmente [50]. Os frutos de outras espécies, no entanto, também podem ser usados no preparo de sucos, como *P. mollissima* var. *tripartita*, *P. quadrangularis* e *P. ligularis* [51].

Além do emprego alimentício, várias espécies do gênero *Passiflora* são tradicionalmente usadas como sedativas ou no tratamento de diversas desordens do sistema nervoso central, como a ansiedade e a insônia. *P. incarnata*, por exemplo, é conhecida há muito tempo pela sua atividade sedativa e por outras propriedades neurofarmacológicas. Por isso, essa espécie é parte oficial das Farmacopeias Britânica e Europeia [46, 50]. A Farmacopeia Brasileira considera *P. alata* como espécie oficial por essas mesmas ações farmacológicas, enquanto que *P. tripartita* var. *mollissima* é aceita como componente hipnótico e sedativo em preparações fitofarmacêuticas na Colômbia. No mercado atual, encontram-se produtos farmacêuticos fitoterápicos a base de *Passiflora* na forma de comprimidos, infusões ou tinturas para uso como calmante natural [46,48,50,51].

Dentre outros usos populares envolvendo diferentes espécies de *Passiflora*, podem-se elencar o diurético, tônico, auxiliar no tratamento da hipertensão e de doenças de pele [2]. Ademais, estudos revelam que as folhas de *P. edulis* apresentam atividade anti-inflamatória [3], enquanto que *P. incarnata* exibe propriedades hipocolesterolêmicas, além de ser anti-aterogênica e cardioprotetora [10]. Pesquisas também vêm sendo conduzidas com os frutos, a casca e as sementes do maracujá, sendo a atividade antioxidante a mais investigada para essas partes das plantas. Em sucos, atribui-se a atividade antioxidante principalmente aos flavonoides presentes, sendo estes os compostos majoritários em diferentes partes de diferentes espécies, como *P. incarnata* [10], *P. edulis* [7], *P. quadrangularis* [52] e *P. alata* [53].

1.4.2 Flavonoides de *Passiflora*

1.4.2.1 Descrição dos flavonoides

Os extratos das folhas de *P. alata*, *P. incarnata* e *P. edulis* já foram extensivamente estudados, revelando a presença de flavonoides da classe das flavonas C-glicosiladas derivadas de apigenina e luteolina como, por exemplo, a vitexina (Figura 11) [3, 7, 51, 52, 53].

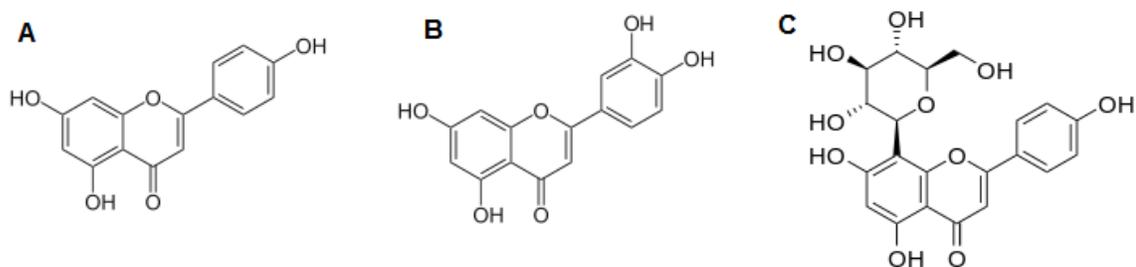


Figura 11: A) Apigenina. B) Luteolina. C) Vitexina: um derivado C-glicosilado da apigenina

A Tabela 3 resume os flavonoides encontrados em algumas das espécies mais conhecidas de *Passiflora*. Para informações sobre outras espécies, Kamaldeep *et al.* (2004) [1] apresentaram uma revisão sobre a composição química e outros aspectos do gênero.

Tabela 3: Flavonoides encontrados em *Passiflora*

Espécie	Fitoconstituíntes
<i>Passiflora alata</i>	Vitexina, isovitexina ^[4, 51] , vitexina-2-O-ramnosídeo, isoorientina, orientina ^[51] , 2"-xilosilvitexina ^[1]
<i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>	Vicenina-2, Spinosina, isoorientina, orientina, isovitexina ^[7,51] , vitexina ^[51] .
<i>Passiflora incarnata</i>	Vitexina, isovitexina ^[10,46] , schaftosídeo, isoschaftosídeo, swersitina ^[46] , apigenina e derivados glicosilados, luteolina e derivados glicosilados, quercetina, kaempferol. ^[1]
<i>Passiflora quadrangularis</i>	Isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina ^[52]
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	Vicenina-2, swersitina, isoorientina, orientina, isovitexina, vitexina ^[53]

A grande maioria dos estudos publicados com relação à identificação e quantificação dos flavonoides de *Passiflora* envolveram extratos de folhas e partes aéreas das plantas. No entanto, as flavonas C-glicosiladas também podem ser encontradas na polpa ^[7], no pericarpo ^[51], na casca e no suco ^[6] dos frutos, sendo esses relatos mais frequentes para *P. edulis* var. *edulis* e *P. edulis* var. *flavicarpa*.

1.4.2.2 Extração e análise dos flavonoides

O preparo de amostra é de fundamental importância na realização de análises confiáveis. A investigação dos flavonoides de *Passiflora* segue todas as etapas de processamento, extração e análise de flavonoides em plantas em geral, devendo-se inicialmente, submeter o material vegetal à secagem, moagem e homogeneização. Após o devido processamento, faz-se a extração dos flavonóides ^[9].

A extração é o principal passo para a recuperação e, até mesmo, o isolamento de compostos bioativos para a análise. A extração sólido-líquido com solventes polares, como metanol, etanol, acetona, éter dietílico e o acetato de etila é uma das formas mais comuns de recuperação dos flavonoides de um material vegetal, podendo-se utilizar solventes menos polares, tais como o diclorometano, o clorofórmio, o hexano e o benzeno para a remoção de ceras, óleos, esteróis e a clorofila da matriz ^[8,9].

Além da extração sólido-líquido, outras formas clássicas de extração vêm sendo empregadas na recuperação de flavonoides a partir do material vegetal. A extração por Soxhlet é uma das frequentemente usadas no isolamento de flavonoides a partir de um material sólido. Na maior parte dos casos, utiliza-se metanol ou acetonitrila em água como solvente de extração. O tempo para este procedimento pode chegar a até 12 h [9].

Outras formas convencionais de extração com aquecimento ou fervura do solvente extrator são empregadas com a mesma finalidade. No entanto, além do tempo de extração, a desvantagem comum a essas técnicas é a perda de flavonoides por ionização, hidrólise ou oxidação. Por isso, novas técnicas de extração vêm sendo utilizadas, tais como a assistida por ultrassom, a assistida por micro-ondas e a por fluido supercrítico. Dentre esses métodos, a extração assistida por ultrassom é considerada como a alternativa de maior simplicidade, menor custo e maior eficiência aos métodos convencionais [8].

Os flavonoides de *Passiflora* vêm sendo extraídos por intermédio do ultrassom com sucesso. No trabalho de Ferreres *et al.* (2007) [3], conseguiu-se extrair vários flavonoides derivados de apigenina e luteolina das folhas de *P. edulis* por meio da sonicação de 0,05 g de pó vegetal com 1 mL de uma mistura metanol:água 1:1 (v/v). A composição fenólica desse extrato foi semelhante à encontrada em uma infusão aquosa da mesma planta, segundo análise por HPLC-UV/Vis. Outro caso de sucesso é descrito no trabalho de Wohlmuth *et al.* (2010) [46], em que foram preparados extratos hidroetanólicos 70:30 (v/v) de *P. incarnata* por sonicação (2 x 15 min). As flavonas C-glicosiladas típicas da espécie puderam ser encontradas nos extratos hidroetanólicos por HPLC-UV/Vis e por HPLC-MS.

Apesar dos resultados obtidos com a extração assistida por ultrassom, os métodos convencionais, como a infusão [51], o refluxo [2] e a percolação [10] continuam sendo usados com resultados positivos para a extração dos flavonoides de *Passiflora*. Os solventes comumente empregados nesses processos são os alcoóis, como o etanol, o metanol e as suas misturas com água, ou a própria água, utilizada nos processos de infusão. No entanto, para o preparo de formulações fitocosméticas, os extratos

glicólicos, que são preparados a partir do propilenoglicol ou da glicerina, que também são alcoóis, são os comumente veiculados ^[17] (Figura 12). Contudo, não existem, até o presente momento, estudos na literatura sobre a composição química de extratos glicólicos de *Passiflora*.

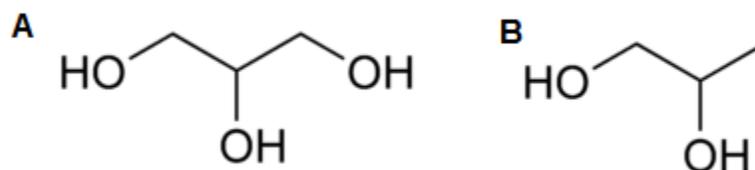


Figura 12: A) Glicerina B) Propilenoglicol

Previamente à etapa de análise da composição química, geralmente recorre-se a processos de limpeza de amostra, dada a alta complexidade dos extratos vegetais. A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é um método bastante empregado para a limpeza de amostra e concentração dos analitos por conta da sua rapidez e eficiência de extração. O sorvente mais utilizado para a extração de flavonoides é o do tipo C₁₈ ligado à sílica, obtendo-se altos valores de recuperação dos analitos em questão. Alternativamente à SPE, as técnicas de extração em cartuchos contendo polímeros de impressão molecular, altamente seletivos, de dispersão da matriz em fase sólida, em que a matriz é homogeneizada em uma fase sólida baseada em sílica, onde ocorre a ruptura celular a extração e a purificação em uma só etapa, e a cromatografia contra-corrente, que envolve a partição da amostra entre dois líquidos imiscíveis entre si, também foram empregados na extração de flavonoides em geral ^[9].

Quanto aos métodos de análise, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica de escolha para a separação e a caracterização de compostos fenólicos. A Tabela 4 lista uma breve revisão de métodos em HPLC empregados recentemente na análise de flavonoides de *Passiflora*.

Tabela 4: Condições de análise dos flavonoides das espécies mais utilizadas de *Passiflora* por HPLC

Espécie	Método	FE	Eluição	Deteção	Ref.
<i>P. alata</i>	HPLC-DAD	Luna RP18 (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Isocrática: ACN:H ₂ O:HOAc 18:82:0,5 (v/v/v)	340 nm	4
	HPLC-DAD	Luna RP18 (4,6 X 150 mm, 5 µm)	Isocrática: A: THF:isopropanol:ACN 10:2:3 (v/v/v) B: H ₃ PO ₄ 0,5% 12% de B em A	340 nm	51
	HPLC-MS/MS	Luna RP18 (4,6 X 150 mm, 5 µm)	Gradiente: A: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 3:87:10 (v/v/v) B: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 40:50:10 (v/v/v)	ESI-MS/MS: modos positivo e negativo	51
<i>P. edulis</i>	HPLC-DAD	Symmetry C18 (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Gradiente: A: H ₂ O: ácido acético 99,8:0,2 (v/v) B: ACN: ácido acético 99,8:0,2 (v/v)	330 nm	7
	HPLC-MS/MS	Symmetry C18 (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Gradiente: A: H ₂ O: ácido acético 99,8:0,2 (v/v) B: ACN: ácido acético 99,8:0,2 (v/v)	ESI-MS/MS: modo negativo	7

	HPLC-DAD-MS/MS	Lichrospher RP18 (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Gradiente: A:H ₂ O: ácido acético 99,8:0,2 (v/v) B: MeOH	DAD: 340nm ESI-MS/MS: modo negativo	3
<i>P. incarnata</i>	HPLC-UV/Vis	XTerra RP18 (3,9 X 150 mm, 3,5 µm)	Gradiente: A: H ₂ O:TFA 99,9:0,1 (v/v) B: ACN:TFA 99,9:0,1 (v/v)	360 e 275 nm	10
	HPLC-DAD	Não citada	Gradiente: A: ácido fosfórico 50 mM L ⁻¹ B: ACN	340 e 240 nm	46
	HPLC-DAD-MS/MS	Não citada	Gradiente: A: H ₂ O B: ACN	APCI: modos positivo e negativo	46
	HPLC-DAD-FL	Novapak C18 (4,0 X 150 mm, 4 µm)	Gradiente: A: H ₂ O- ácido acético B: MeOH	DAD: 245 nm FL: excitação: 254 nm emissão: 414 nm	23
<i>P. quadrangularis</i>	HPLC-UV/vis	Spherisorb ODS2 (4,6 X 250 mm, 5 µm)	Isocrática: H ₂ O:THF:iPrOH:ACN:ácido fórmico 88:8:1,6:2,4:0,07 (v/v/v/v/v)	340 nm	52
	HPLC-MS/MS	Luna RP18 (4,6 X 150 mm, 5 µm)	Gradiente: A: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 3:87:10 (v/v/v) B: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 40:50:10 (v/v/v)	ESI-MS/MS: modos positivo e negativo	51
<i>P. tripartita</i> var <i>mollissima</i>	HPLC-MS/MS	Luna RP18 (4,6 X 150 mm, 5 µm)	Gradiente: A: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 3:87:10 (v/v/v) B: ACN:H ₂ O:ácido fórmico 40:50:10 (v/v/v)	ESI-MS/MS: modos positivo e negativo	51

THF: tetrahydrofurano, ACN: acetonitrila, TFA: ácido trifluoroacético, MeOH: metanol, iPrOH: isopropano

Percebe-se que, praticamente em todos os casos, utiliza-se uma coluna com fase estacionária particulada do tipo C₁₈ ligada à sílica e fases móveis constituídas de água acidificada adicionada de acetonitrila ou metanol como modificadores orgânicos. Quanto aos detectores, os de ultravioleta-visível (UV/Vis), por arranjo de diodos (DAD) e por espectrometria de massas em tandem (MS/MS), com diferentes fontes de ionização e analisadores, são os mais empregados nas análises dos flavonoides de *Passiflora*.

Recentemente, no entanto, Pietrogrande *et al.*(2010)^[54] analisaram os flavonoides da tintura de *P. incarnata* em HPLC-DAD com o uso de colunas monolíticas do tipo C₁₈, comparando a eficiência da separação com os dados obtidos por cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC, do inglês Ultra High Performance Liquid Chromatography), em que foi empregada uma coluna Acquity® BEH C₁₈ e a detecção foi realizada também por DAD. O desempenho da separação do sistema UHPLC com a coluna Acquity®, segundo os autores, foi comparável ao uso de duas colunas monolíticas (Cromolith® RP18e) em série em HPLC.

À parte da cromatografia líquida, existem outras técnicas de análise de flavonoides em *Passiflora* descritos na literatura, tais como a espectrofotometria no ultravioleta e a eletroforese capilar (CE), também acoplada a diversos tipos de detectores. A determinação espectrofotométrica de flavonoides é o método oficial das farmacopeias Francesa, Europeia e Brasileira, na qual geralmente se emprega o AlCl₃ para a formação de complexos Al³⁺-flavonoides em metanol, reduzindo-se as interferências de outros possíveis compostos presentes na matriz. O menor custo e a simplicidade operacional tornam os métodos espectrofotométricos importantes para o trabalho de rotina na quantificação de flavonoides totais^[9, 53].

O estudo de *Passiflora* por eletroforese capilar ainda é bastante limitado. Voirin *et al.* (2000)^[20] realizaram a separação e a análise qualitativa de treze flavonas C-glicosiladas e uma flavona O-glicosilada de *P. incarnata* por eletroforese capilar em zona (CZE, do inglês Capillary Zone Electrophoresis), destacando que a diferença de mobilidade eletroforética entre os analitos avaliados depende, por exemplo, do tipo e da posição dos açúcares ligados ao núcleo da flavona, sendo que a ordem de

migração pode ser alterada em função do pH do eletrólito de corrida. Além disso, 18 diferentes amostras de *P. incarnata* foram qualitativamente estudadas pelo método desenvolvido, revelando grande variedade de composição entre elas.

Em 2003, Marchat *et al.* desenvolveram um método de CZE para a determinação de 13 flavonas C-glicosiladas de *P. incarnata*, sendo possível a quantificação de 4 desses flavonoides devido à resolução adequada entre os compostos. Também foi possível a quantificação de flavonoides totais pelo mesmo método, em concordância com os resultados obtidos pela determinação espectrofotométrica nas mesmas amostras ^[19].

1.4.2.3 Atividade antioxidante e fotoprotetora de *Passiflora*

De acordo com Huang *et al.* (2005) ^[54] e Miguel (2010) ^[55], a atividade antioxidante de diferentes extratos vegetais, óleos essenciais e compostos puros pode ser avaliada por diferentes ensaios *in vitro*, que podem ser agrupados em duas categorias:

1. Os que avaliam a peroxidação lipídica, em que a oxidação de substratos lipídicos como o ácido linoleico, ésteres metílicos de ácidos graxos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) é investigada;
2. Os que avaliam a habilidade de sequestro de radicais livres (*radical scavenging*), sendo esses testes divididos em dois grupos:
 - a. Reações baseadas na transferência do átomo de hidrogênio (HAT, do inglês *Hydrogen Atom Transfer*), que, em sua maioria, são ensaios em que antioxidante e substrato competem por radicais peroxil termicamente gerados a partir da decomposição de azo compostos. Essas reações independem do pH e do solvente empregados no ensaio.
 - b. Reações baseadas na transferência de elétrons (ET, do inglês *Electron Transfer*), que, em geral, medem a capacidade de um antioxidante em

reduzir um composto que muda de coloração quando reduzido. Como essas reações envolvem o potencial de desprotonação e ionização dos compostos antioxidantes, esses métodos dependem do pH em que são realizados. Geralmente, o potencial decresce com o aumento do pH, o que reflete em uma maior capacidade doadora de elétrons.

Existem outros tipos de ensaios que não se enquadram nessas categorias, como é o caso das reações com as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, porém todas as categorias têm por finalidade medir a capacidade de neutralização de radicais livres de um determinado substrato [54, 55].

Os ensaios de atividade antioxidante, em geral, são espectrofotométricos. No entanto, existem outras possibilidades, como é o caso dos experimentos voltamétricos realizados por Zielinska e Zielinski (2011) [56], em que foram determinadas as atividades antioxidantes de flavonas C-glicosiladas. Uma das conclusões do estudo foi a de que os resultados pelo método voltamétrico empregado se correlacionou com os que foram obtidos pelos ensaios DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, um radical livre comercial relativamente estável e cujo ensaio pode ser caracterizado como um HAT, e TEAC *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*, outro ensaio HAT. Contudo, não houve correlação entre o ensaio de atividade antioxidante contra o ânion radicalar superóxido, sugerindo que a variação de meio, substrato e oxidantes têm grande influência no comportamento dos antioxidantes em estudo. De fato, Miguel (2010) [55] também alerta para a possível não concordância entre os resultados de diferentes testes para uma mesma amostra e, por isso, alguns autores recomendam a realização de mais de um tipo de teste para um *screening* mais eficiente de amostras com capacidade antioxidante [40, 41].

Com relação à atividade antioxidante do gênero *Passiflora*, Masteikova *et al.* (2008) [10] relatam que o extrato etanólico obtido por reperiolação é mais ativo que o extrato aquoso obtido por infusão do pó vegetal de *P. incarnata*. As atividades foram triadas pelos métodos do DPPH e do TEAC, sendo que quanto maior a concentração

dos flavonoides vicenina, isovitexina e orientina, maior foi a eficiência em reduzir os radicais livres nesses testes.

A atividade antioxidante da infusão de *P.edulis* foi estudada em diferentes testes *in vitro* por Ferreres *et al.* (2007) ^[3], mostrando que a espécie possui tanto atividade pró-oxidante quanto antioxidante, sendo a última mais pronunciada que a primeira. A atividade pró-oxidante é dependente da concentração do extrato.

Também a respeito do gênero *Passiflora*, Rudinicki *et al.* (2007) ^[2] realizaram tanto testes *in vitro* quanto *ex vivo* dos extratos etanólicos a 40% das folhas de *P. alata* e *P. edulis*, concluindo que a atividade antioxidante da primeira espécie é superior à da segunda. Além disso, atribuíram a responsabilidade pela atividade antioxidante dos extratos aos compostos fenólicos.

Devido às similaridades estruturais entre os compostos fenólicos e os filtros solares orgânicos, à parte da atividade antioxidante, esses compostos têm potencial para exercerem atividade fotoprotetora direta, dados seus perfis espectrofotométricos de absorção. Velasco *et al.* (2008) ^[57] avaliaram o comportamento do extrato seco de *P. incarnata* a 7,0% (m/m) em uma formulação contendo os filtros orgânicos ethylexylmethoxycinnamate a 2% (m/m), benzophenone-3 a 2,0% (m/m) e o filtro inorgânico TiO₂. A associação do extrato à formulação fez com que houvesse um aumento na proteção na região do UVA, obtendo-se um protetor solar de amplo espectro. Não se encontram, contudo, outros trabalhos publicados nessa linha de pesquisa que corroborem ou contradigam essa informação, sendo este um campo de exploração em potencial.

1.4.2.4 *Passiflora coccinea* (Aubl.)

Apesar da vasta literatura encontrada à respeito de *Passiflora*, principalmente no que compete a *P. alata*, *P. edulis* e *P. incarnata*, muito pouco se sabe sobre *P. coccinea* (Aubl).

Popularmente conhecida como maracujá-poranga ou maracujá tomé-açú, *P.coccinea* pode ser encontrada nos países do norte da América do Sul, como as Guianas, o Peru, a Venezuela, a Bolívia e a Região Amazônica do Brasil. Seus frutos são apreciados principalmente na Guiana ^[16, 58].

O único constituinte químico descrito para essa espécie até o presente momento é o glicosídeo cianogênico passiccocina ^[24] e não se encontram estudos relatando possíveis atividades farmacológicas da planta. Um estudo prévio com o extrato metanólico das folhas da espécie revelou uma atividade antioxidante superior em relação aos extratos de *P. alata*, *P. edulis*, *P. gibertii* e *P. foetida* var *hirsuta* preparados da mesma maneira e, por isso, o estudo de *P. coccinea* é um campo a ser explorado ^[15]. A Figura 13 mostra um exemplar de *P.coccinea*.



Figura 13: *Passiflora coccinea* (Aubl.)

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

Diante da inexistência de dados relacionados aos flavonoides de *P. coccinea* e o potencial antioxidante de seu extrato metanólico, mostrado em estudo prévio no trabalho de Velasco *et al.* (2008) ^[57], da possível atividade fotoprotetora em *P. incarnata* e da inexistência de trabalhos investigando as propriedades dos extratos glicólicos, os quais podem ser usados na fabricação de cosméticos, o objetivo desse trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro* dos extratos metanólico e glicólico de *P. coccinea*, identificar os flavonóides presentes e quantificar a isovitexina nos extratos de maior atividade.

Os objetivos específicos a serem alcançados com a realização deste projeto foram:

- 2.1 Otimização do método de extração (dentre maceração, maceração com temperatura controlada e ultrassom) de *P. coccinea* por ambos os solventes (propilenoglicol e metanol), através do monitoramento das atividades antioxidante e fotoprotetora *in vitro*;
- 2.2 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos incorporados em uma emulsão base;
- 2.3 Caracterização dos extratos por meio das técnicas de ESI-MS e ESI-MS/MS, de modo a se detectarem os possíveis flavonóides presentes;
- 2.4 Otimização de um método de extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) dos extratos metanólico e glicólico de maior atividade antioxidante / fotoprotetora, preparando-os para a análise cromatográfica;
- 2.5 Desenvolvimento e validação de um método por HPLC-DAD para a identificação dos flavonoides e quantificação de isovitexina nos extratos glicólico e metanólico de maior atividade.

CAPÍTULO 3

PREPARO DOS EXTRATOS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETORA DE *P. coccinea*



3.1 INTRODUÇÃO

Nessa primeira etapa do trabalho, a meta foi a avaliação do tipo de método de extração que gerasse os extratos metanólico e glicólico de maior atividade antioxidante e fotoprotetora. Com isso, prepararam-se os extratos por meio de um método convencional (maceração, à temperatura ambiente e a 30 °C) e de um método mais recente de extração (ultrassom), realizando-se os ensaios de DPPH (um ensaio HAT) e ORAC-FL (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, um ensaio ET) para a triagem da atividade antioxidante e a avaliação da capacidade fotoprotetora direta *in vitro* por um método descrito em 1986, conforme detalhado a seguir. Realizou-se uma comparação com um extrato glicólico comercial de chá verde, dado o reconhecimento da atividade antioxidante desta planta pela literatura.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Coleta e preparo do material vegetal

A presente pesquisa foi realizada com o exemplar de *P. coccinea* (Aubl.) cultivado no campo experimental do Instituto de Biologia da Unicamp. Sua exsicata está depositada no herbário do mesmo instituto, sob o registro UEC n°94134. Em setembro de 2010, foram coletados 137,04 g de folhas deste exemplar no período da manhã. O material foi estabilizado por 10 minutos a 70 °C e seco a 60 °C em estufa Fanem, modelo 515. Após a secagem, procedeu-se a pulverização das folhas em moinho de bancada IKA®, modelo A11 basic, e o armazenamento em frasco de vidro sob refrigeração e ao abrigo da luz.

3.2.2 Otimização da extração

Para se obterem os extratos glicólico e metanólico de maior atividade antioxidante e fotoprotetora, realizaram-se três tipos de extração (ultrassom, maceração em

temperatura ambiente e maceração com temperatura controlada) para comparação, respeitando-se a proporção 1:20 (m/v) entre o pó vegetal e o solvente extrator.

3.2.2.1 Extração por ultrassom

Para a extração por ultrassom, pesaram-se 2,00 g do pó vegetal em frascos de fundo redondo com tampa de rosca (diâmetro de 4 cm e altura de 9 cm), adicionando-se 40 mL do solvente extrator (propilenoglicol ou metanol). Procedeu-se a extração em banho de ultrassom UltraCleaner, modelo 1400, dimensões internas de 240 x 137 x 100 mm, na frequência de 40 kHz e com potência de 135 W por 30 minutos. Os extratos recolhidos foram centrifugados a 3000 rpm em centrífuga Fanem Baby, modelo I 206BL, por tempo suficiente para a sedimentação do pó vegetal. O sobrenadante do extrato glicólico foi recolhido e guardado sob refrigeração em frasco de vidro. Já o sobrenadante do extrato metanólico teve seu solvente evaporado a temperatura e pressão ambientes após o recolhimento, separando-se apenas uma alíquota de 1 mL do extrato líquido para a caracterização por espectrometria de massas. O extrato seco também foi armazenado sob refrigeração em frascos de vidro e o procedimento de extração foi realizado em triplicata para cada solvente.

3.2.2.2 Extração por maceração à temperatura ambiente

De forma semelhante à anterior, realizou-se a extração de 2,00 g de pó vegetal com 40 mL do solvente (propilenoglicol ou metanol), em frascos idênticos aos da extração por ultrassom. Os pós foram macerados em temperatura ambiente por 72 h e o recolhimento, processamento e armazenagem dos extratos ocorreram da mesma forma que a descrita no item anterior. Este processo foi realizado em triplicata para cada solvente.

3.2.2.3 Extração por maceração em temperatura controlada (30 °C)

O procedimento para a maceração em temperatura controlada foi idêntico ao descrito no item 3.2.2, excetuando-se o fato de que a maceração se desenvolveu em banho maria Fanem, modelo 100, a 30 °C por 72 h. Esse procedimento também foi realizado em triplicata para cada solvente.

3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos produzidos

Nesta fase de otimização da extração, todos os extratos produzidos foram avaliados quanto à atividade antioxidante segundo os seguintes métodos:

3.2.3.1 DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos metanólico e glicólico, adaptou-se o método descrito por Mensor *et al.* (2001) ^[59] para placa de microtitulação (96 poços), realizando-se o ensaio em triplicata para cada extrato e utilizando-se rutina hidratada 95 % (Sigma) como controle positivo. Para efeitos de comparação, o ensaio também foi realizado com o extrato glicólico de chá verde comercial (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) (Gamma), cujos flavonóides têm atividade antioxidante reconhecida pela literatura.

3.2.3.1.1 Extratos metanólicos

À 5600 μg do extrato metanólico obtido em cada método de extração, adicionaram-se 1 mL de etanol P.A. (Synth), homogeneizando a solução com auxílio de ultrassom UltraCleaner, modelo 1400, e vórtex Phoenix, modelo AP56. A partir dessa solução, realizaram-se cinco diluições seriadas com etanol na proporção 1:1 (v/v), totalizando 6 soluções estoque do extrato nas concentrações de 5600, 2800, 1400, 700, 350 e 175 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na placa de microtitulação, 10 μL de cada diluição foram adicionados a 190 μL de etanol P.A. (Synth) em seu poço correspondente, seguido de 80 μL de solução etanólica 0,3 mmol L^{-1} do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (Sigma Aldrich). Nos poços, as concentrações finais atingidas para cada um dos extratos foram de 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle negativo do ensaio, utilizaram-se 80 μL de solução de DPPH 0,3 mmol L^{-1} em 200 μL de etanol e, como branco do teste, 10 μL da solução de 5600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato testado em 270 μL de etanol.

A partir da adição da solução de DPPH, procederam-se as leituras das absorbâncias da placa a 517 nm no equipamento Biotek UV Synergy 2 a cada 5 minutos, num total de 50 minutos de análise.

3.2.3.1.2 *Extratos glicólicos de P. coccinea e chá verde*

Seguiu-se o mesmo procedimento adotado para os extratos metanólicos, com a diferença apenas nas concentrações das soluções estoque e, portanto, na concentração final nos poços da microplaca de titulação. À 5600 μg do extrato metanólico obtido em cada método de extração, adicionaram-se 250 μL de etanol P.A. (Synth), homogeneizando a solução com auxílio de vórtex. A partir desta solução, fez-se a diluição seriada de modo que, na microplaca de titulação, as concentrações finais atingidas fossem de 800, 400, 200, 100, 50 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2.3.1.3 Avaliação dos resultados

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de redução em uma dada concentração (equação 1) ou em IC₅₀, que é a concentração de extrato necessária para a redução de 50 % do radical DPPH presente no meio reacional. Este cálculo foi realizado com o auxílio do programa Microcal Origin 6.0 (OriginLab, Northampton, MA), por meio da regressão hiperbólica das concentrações *versus* porcentagem de redução de cada concentração estudada.

$$\% \text{ REDUÇÃO} = 100 - \left[\frac{A_{517 \text{ AMOSTRA}} - A_{517 \text{ CONTROLE NEGATIVO}}}{A_{517 \text{ CONTROLE POSITIVO}} - A_{517 \text{ AMOSTRA}}} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

A análise estatística foi realizada empregando-se o teste de ANOVA seguido do teste de Tukey com significância para $p < 0,05$, ou o teste t de student para os casos em que não fosse possível a realização da ANOVA. Os resultados foram apresentados como média, estimativa do desvio padrão absoluto e coeficiente de variação.

3.2.3.2 ORAC-FL

Para o ensaio ORAC-FL, adotou-se a metodologia descrita por Huang *et al.* (2001) com modificações (Salvador *et al.*, 2006) ^[60,61] Na execução do teste, 1,0 mg de cada extrato (metanólico, glicólico de *P. coccinea* ou glicólico de chá verde comercial) foi diluído em 20 μL de dimetilsulfóxido. As soluções estoque foram diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes em solução tampão fosfato pH 7,0. À microplaca de titulação, foram adicionados 50 μL de cada diluição em seus respectivos poços, 100

μL e fluoresceína (Fluka) na concentração de $1,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{L}$ de AAPH (diidrocloridrato de 2,2'-azobis-2-metilpropionamida) (Sigma Aldrich) a $81,8 \text{ mg mL}^{-1}$. Como controle positivo, utilizou-se a solução tampão na presença de fluoresceína e do APPH e, como substância referência, o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), análogo da vitamina E.

Realizou-se a leitura da microplaca a cada 2 minutos utilizando-se filtro fluorescente (excitação $\lambda=485 \text{ nm}$ e emissão $\lambda=528 \text{ nm}$) no equipamento Biotek UV Synergy 2, monitorando-se a cinética de reação (temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$) por 70 minutos. Os resultados obtidos foram expressos em μmol de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ($\mu\text{mol de TE g}^{-1}$), comparando-se os valores por meio dos testes de ANOVA seguido do teste de Tukey com significância para $p < 0,05$.

3.2.4 Ensaio de fotoproteção direta *in vitro*

O teste de fotoproteção *in vitro* foi executado conforme descrito por Mansur *et al.* (1986) ^[62], por meio da leitura espectrofotométrica de soluções etanólicas do analito. Para a execução desse teste, todos os extratos de *P. coccinea* e o extrato comercial de chá verde foram incorporados em uma emulsão base cedida pela Consulpharma (Campinas, São Paulo), cuja composição encontra-se descrita na Tabela 5:

Tabela 5: Composição da emulsão base

Composição	Nome INCI*	(m/m)	Função
Glicerina	Glycerin	0,5	Hidratante/umectante
Aristoflex ®	Ammonium Acryloyldimethyltaurate / Copolymer	VP 0,7	Emulsionante
Emulium 22 ®	Tribehenin PEG-20 Esters	2,5	Tensoativo não iônico
Óleo de amêndoas	Sweet Almond Oil	3,0	Emoliente
Tinogard TT ®	Tetradibutyl Hydroxyhydrocinamate	Pentaerithryl 0,1	Antioxidante
Silicone DC245 ®	Cyclopentasiloxane	6,0	Emoliente
Neolone PE ®	Phenoxyethanol	0,4	Conservante
Água	Aqua	QSP	Solvente

*do inglês "*International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*"

Os extratos metanólicos obtidos pelos diferentes métodos de extração foram incorporados ao creme base na proporção de 1 % (m/m). Já os extratos glicólicos de *P. coccinea* e de chá verde foram adicionados na concentração de 10% (m/m). Todos os cremes formulados foram testados quanto à pré-estabilidade em centrífuga Eppendorf, modelo 5415C, seguindo a metodologia descrita no “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos” (ANVISA, 2004) [63].

Com a finalidade de verificar o fator de proteção solar (FPS) dos extratos, soluções etanólicas das emulsões foram preparadas na concentração de 0,2 mg mL⁻¹. Realizou-se uma varredura na região do ultravioleta das soluções em espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo 8453, utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. O FPS espectrofotométrico foi calculado conforme a equação 2:

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda) \quad (2)$$

onde FC é um fator de correção igual a 10, Abs é a leitura da absorbância da solução, EE é o efeito eritematogênico da radiação e I é a intensidade solar, todos em um dado comprimento de onda. Os valores de EE x I são tabelados (tabela 6):

Tabela 6: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade solar em cada comprimento de onda (Mansur *et al.*, 1986) [62]

λ (nm)	EE (λ) x I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
	1,0000

Para comparação, utilizou-se uma formulação contendo 8,0 % de Eusolex 4360 (nome INCI: Benzophenone-3) que, segundo o cálculo teórico do Basf® Sunscreen Simulator ^[64], apresenta o FPS de 11,5.

3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* dos extratos incorporados em emulsão base

As emulsões preparadas para a avaliação da atividade fotoprotetora também foram estudadas com relação à atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH e ORAC-FL, tal como descrito para os extratos. A única alteração foi a faixa de concentração desses cremes nos poços da placa de microtitulação do teste DPPH, que foi de 50 a 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Atividade antioxidante

Existe uma variedade de testes *in vitro* para a avaliação da atividade antioxidante envolvendo diferentes espécies reativas artificiais e uma gama de condições de reação ^[40]. Com isso, um mesmo antioxidante pode exibir diversos comportamentos ao sequestrar diferentes radicais em diferentes meios e, assim, resultados de apenas um tipo de ensaio podem gerar informações limitadas acerca de uma amostra, sendo altamente recomendada a realização de mais de um tipo de teste para um *screening* mais eficiente de amostras com capacidade antioxidante ^[41, 42].

Nesta pesquisa, propôs-se otimizar o processo de extração de *P. coccinea* com base nos resultados de atividade antioxidante obtidos por dois métodos: redução do radical DPPH, em que se observa uma mudança da coloração do substrato com a sua redução ^[59], e ORAC-FL, no qual se avalia a capacidade de uma amostra

antioxidante em impedir o consumo da fluoresceína pelo radical AAPH, comparando-se as curvas de decaimento da fluorescência ao longo do tempo com a obtida pelo padrão Trolox, um análogo da vitamina E [60].

A cinética da reação de um antioxidante com o radical DPPH é bifásica, compreendendo uma reação rápida nos primeiros minutos e uma etapa lenta em seguida, a qual se estabiliza [40]. Para avaliar o tempo de reação dos extratos de *P. coccinea*, monitorou-se o teste por 50 minutos, realizando-se leituras das absorbâncias (517 nm) a cada 5 min. Os resultados mostraram que, a partir dos 40 minutos, a porcentagem de redução do radical DPPH começa a se tornar constante (figura 14). Por isso, para a expressão dos resultados, consideraram-se as leituras após 40 minutos de reação.

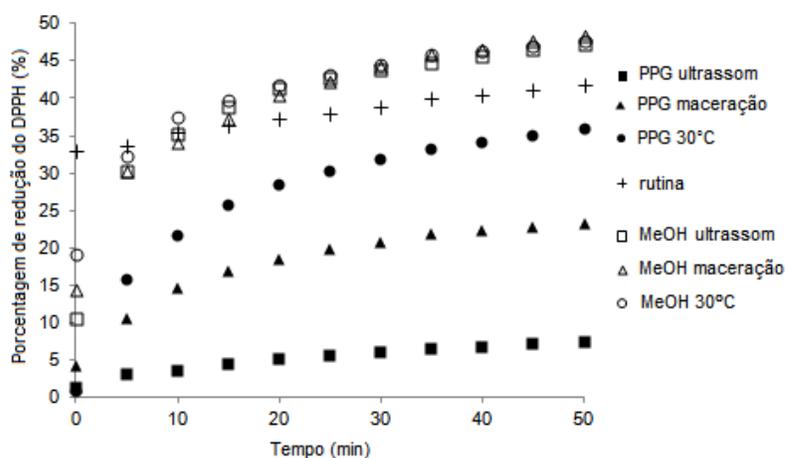


Figura 14: Cinética de reação dos extratos (12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do padrão rutina (6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) com o radical DPPH. MeOH: extrato metanólico; PPG: extrato glicólico

Pela figura 14 é possível notar que todos os extratos metanólicos apresentaram atividades antioxidantes semelhantes entre si no ensaio do DPPH. Os valores de IC_{50} calculados para os extratos metanólicos obtidos por ultrassom, por maceração a temperatura ambiente e por maceração a 30 °C foram de (13 ± 2) , (11 ± 1) e (12 ± 1) $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. As curvas de regressão apresentaram coeficientes de determinação maiores que 0,90 e os valores de IC_{50} foram iguais a 95% de significância, mostrando que o método de extração, dentre os adotados neste

trabalho, não influencia na atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *P. coccinea*. Neste caso, a extração assistida por ultrassom mostrou-se vantajosa sobre os demais métodos devido ao menor tempo de extração e, por isso, foi eleita como o melhor método para o solvente metanol.

Este comportamento, no entanto, não foi repetido para os extratos glicólicos, para os quais o IC₅₀ não pôde ser calculado. Na concentração de 800 µg mL⁻¹, o extrato ultrassônico não mostrou atividade neste ensaio. Já o extrato obtido por maceração à temperatura ambiente conseguiu reduzir (27 ± 3) % do radical DPPH, enquanto que a maceração a 30°C forneceu um extrato capaz de reduzir o mesmo radical em (33 ± 1) %. Os resultados de porcentagem de redução para as macerações diferem-se entre si a 95 % de significância, mostrando que o método de extração influencia na atividade antioxidante do extrato final quando se utiliza o propilenoglicol como solvente extrator.

Como referência, testou-se também o extrato glicólico comercial de chá verde nas mesmas concentrações dos extratos glicólicos de *P. coccinea*. O IC₅₀ para esse extrato foi de (331 ± 3) µg mL⁻¹, o que representa uma atividade inferior aos dos extratos metanólicos e superior aos dos glicólicos da espécie de *Passiflora* em estudo.

As performances dos extratos glicólico e metanólico de *P. coccinea* também foram diferentes nos ensaios de ORAC-FL, em concordância com o observado no ensaio de DPPH. Os valores de ORAC calculados para os extratos metanólicos foram de (3177 ± 12) µmol TE g⁻¹ para o extrato ultrassônico, (3356 ± 233) µmol TE g⁻¹ para o extrato obtido por maceração à temperatura ambiente e (3284 ± 40) µmol TE g⁻¹ para o extrato proveniente da maceração a 30°C. Esses resultados não diferem entre si a 99% de confiança, confirmando novamente a ausência de influência da técnica de extração sobre a atividade antioxidante dos extratos metanólicos. Em contrapartida, os extratos glicólicos, tanto de *P. coccinea* quanto o extrato comercial de chá verde, não mostraram atividade antioxidante significativa neste teste. Contudo, convém ressaltar que a ausência de resultado relevante no teste ORAC-FL não descredencia os extratos glicólicos como antioxidantes em potencial, dado que os dois métodos

para a avaliação da atividade antioxidante realizados neste trabalho são realizados em condições diferentes tanto de meio reacional quanto de radical a ser neutralizado: condições diferentes de reação e de substratos geram diferenças nos resultados [40].

A Figura 15 mostra as curvas de decaimento de fluorescência para os extratos metanólicos, onde pode ser observado que as áreas sob as curvas dos extratos são bastante semelhantes entre si e maiores que a do Trolox (referência), revelando que esses extratos são ativos no teste ORAC-FL.

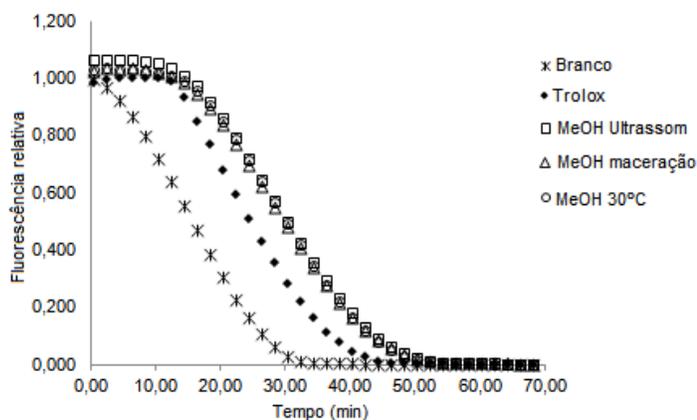


Figura 15: Curvas de decaimento da fluorescência ao longo do tempo. Diluição 1:1000

A eficiência da resposta antioxidante obtida por meio da extração assistida por ultrassom com o metanol e não com o propilenoglicol pode ser explicada pelas propriedades físicas desses solventes: acredita-se que a extração por ultrassom ocorre por um fenômeno cavitacional, no qual bolhas do solvente extrator são formadas pela propagação de ondas de pressão. A implosão das bolhas geram microjatos que resultam em erosão superficial e ruptura de partículas, o que aumenta o poder extrator. O fenômeno da cavitação é menor quanto maior for a pressão de vapor e a tensão superficial dos solventes. Este fato poderia justificar a atividade antioxidante não satisfatória do extrato glicólico obtido por ultrassom em ambos os testes realizados, já que o propilenoglicol possui uma viscosidade e uma temperatura de ebulição significativamente maiores comparadas as do metanol e, portanto, menor poder extrator por sonicação [43,44].

3.3.2 Atividade fotoprotetora direta

A fotoproteção direta pode ser promovida por filtros solares inorgânicos, que absorvem ou refletem a radiação UV, ou orgânicos, que absorvem no comprimento de onda UV através de seus anéis aromáticos, liberando a energia recebida sob a forma de calor.^[13] Diante deste fato propôs-se a avaliação da capacidade de absorção direta da radiação UV dos extratos produzidos utilizando-se protocolo estabelecido por Mansur *et al.*(1986) ^[62].

A primeira etapa desse estudo foi a varredura do espectro dos extratos na faixa que compreende a radiação UVB (290 a 320 nm) e UVA (320 a 400 nm) em etanol (Figura 16).

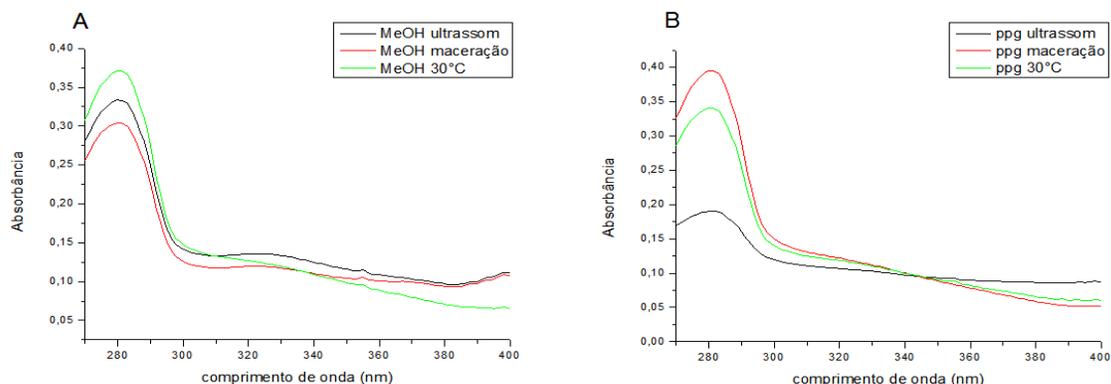


Figura 16: Espectros de absorção UV. A) extratos metanólicos (1 mg mL⁻¹) de *P. coccinea* em etanol. B) Glicólicos (10 mg mL⁻¹) de *P. coccinea* em etanol

Os espectros revelam que os extratos, tanto metanólicos quanto glicólicos, absorvem com maior intensidade nos comprimentos de onda correspondentes ao UVB, causadora de eritema, dano ao DNA e câncer de pele. O teste proposto por Mansur *et al.* (1986) ^[62] leva em consideração a intensidade da radiação solar nos diferentes comprimentos de onda do UVB, além de um fator relacionado à formação do eritema, para o cálculo do FPS. Como o protocolo original é descrito para emulsões, os extratos de *P. coccinea* foram incorporados em uma emulsão base e

foram aprovados em teste de centrifugação, não se notando a separação de fases característica da instabilidade de uma formulação. Contudo, nenhum extrato foi capaz de realizar a fotoproteção direta nas condições deste teste.

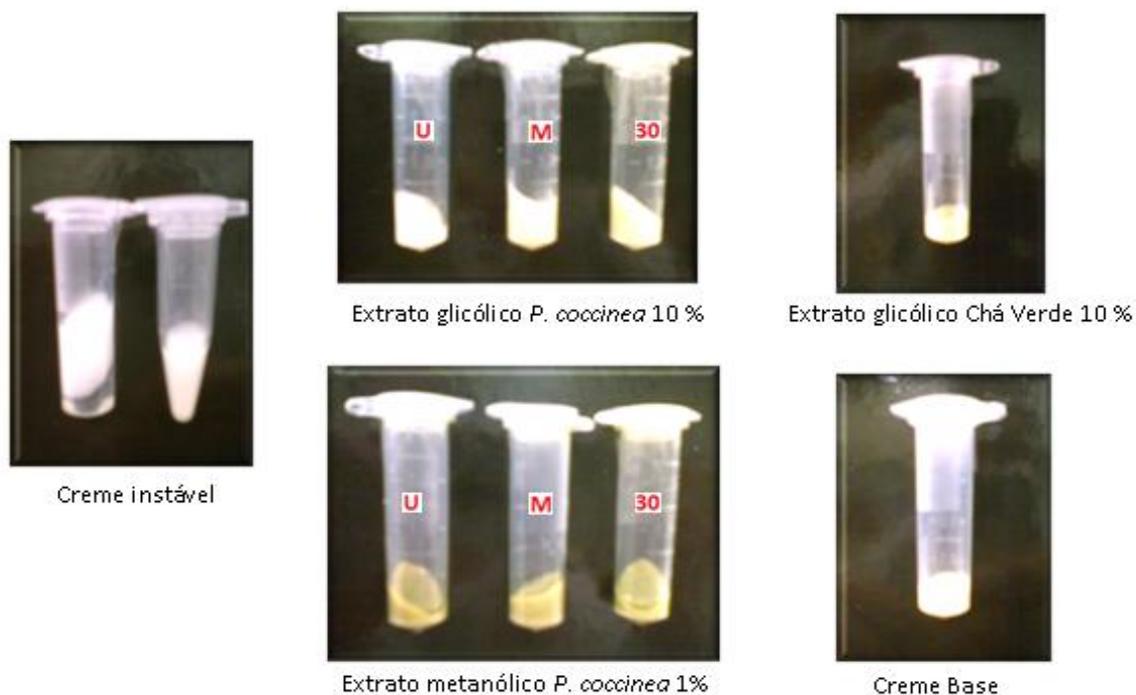


Figura 17: Fotografia dos cremes formulados com os extratos. Não houve separação de fases em nenhum dos casos

O extrato glicólico comercial de chá verde também não apresentou atividade fotoprotetora direta, como absorvedora de UV. O trabalho de Wang *et al.* (2010) ^[13], classifica o chá verde e outros polifenóis como “agentes antioxidantes e de reparo”, propondo que essa classe de agentes seja incluída nas discussões sobre fotoproteção, dado que os danos causados pela radiação UV à pele se deve ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, pode-se afirmar que tanto os extratos de chá verde quanto os de *P. coccinea* produzidos

neste trabalho têm potencial de uso como fotoprotetores nesta categoria, mas não como agentes absorvedores de UV.

Quanto à formulação padrão (Benzophenone-3, filtro solar orgânico na proporção de 8 %), o FPS calculado foi de $(9,3 \pm 0,2)$, um pouco abaixo dos 11,5 previstos pelo Basf Sunscreen Simulator[®] [64], que calcula teoricamente o fator proteção solar *in vivo*. O creme base da formulação padrão não apresentou absorção na região estudada. A Figura 18 mostra os espectros de absorção na condição do teste de fotoproteção. Convém notar que somente o padrão é eficaz em absorver no comprimento de onda do UV.

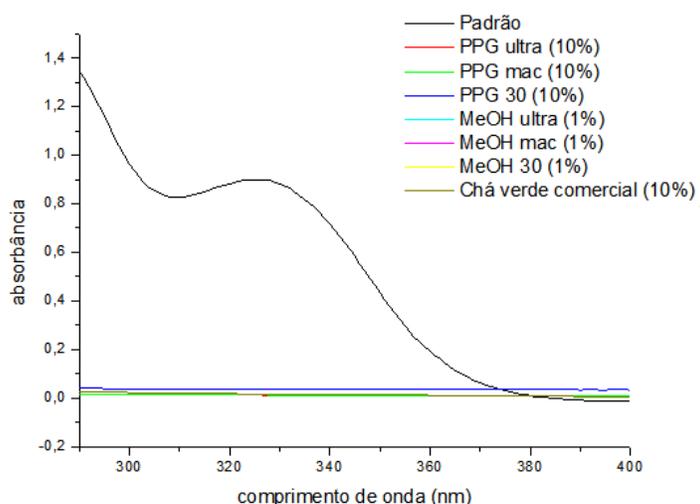


Figura 18: Espectros de absorção dos cremes na região do UV, na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ em etanol. Os valores em parênteses indicam a porcentagem do extrato na formulação (m/m)

3.3.3 Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos incorporados a uma formulação base

As mesmas formulações testadas quanto à atividade fotoprotetora direta também foram avaliadas com relação à atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e do ORAC-FL. Apenas os cremes contendo o extrato metanólico a 1,0 % (m/m), na concentração de $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentaram alguma atividade antioxidante frente

ao radical DPPH (ultrassom: $(38 \pm 2) \%$, maceração: $(40 \pm 2) \%$ e maceração a 30°C : $(36 \pm 1) \%$). Os demais cremes não apresentaram atividade frente ao mesmo radical e nenhum dos cremes formulados obteve êxito frente ao radical AAPH no teste ORAC-FL. Os cremes dos extratos metanólicos a 1,0 % (m/m) apresentaram uma curva de decaimento semelhante ao Trolox neste ensaio (Figura 19).

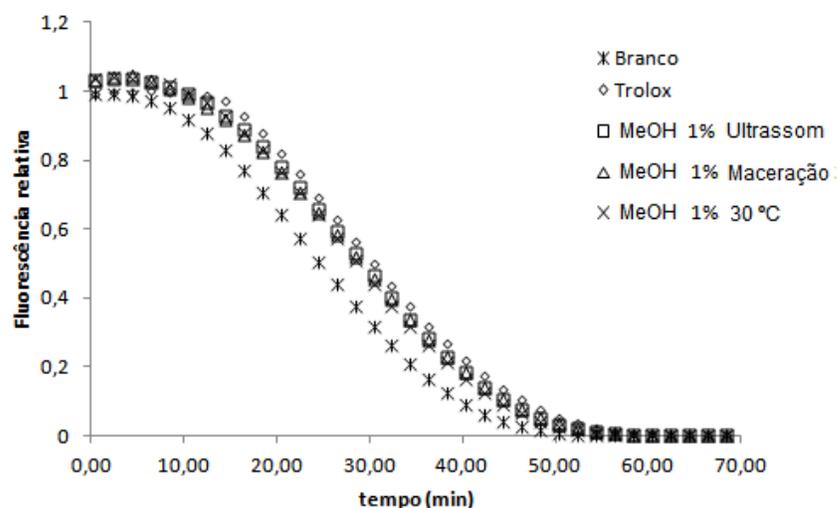


Figura 19: Curva de decaimento dos cremes com extratos metanólicos 1 % (m/m). Diluição 1:1000

3.4 CONCLUSÃO

Ainda que não tenham atividade como absorvedores diretos da radiação UV, os extratos avaliados possuem potencial atividade fotoprotetora indireta, podendo atuar diretamente sobre os radicais livres. A atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *P. coccinea* é bastante superior a dos extratos glicólicos. Contudo, mesmo que a atividade antioxidante dos extratos glicólicos seja inferior, não se pode afirmar, somente por esses testes, que os mesmos seriam ineficazes *in vivo*. Ainda no que diz respeito ao extrato glicólico de *P. coccinea*, percebeu-se que as características do solvente empregado influenciam a atividade antioxidante conforme o método de extração. Apenas por esses testes, não é possível dizer se esse comportamento observado para o propilenoglicol está relacionado aos tipos de

compostos extraídos por esse solvente em diferentes situações ou se a disparidade entre eles é atribuída apenas a concentrações diferentes dos mesmos compostos de acordo com o método em que o extrato é obtido.

Da mesma maneira em que não se explicam as diferenças dentro do grupo dos extratos glicólicos, a discrepância de atividade antioxidante entre os extratos metanólicos e glicólicos também não pode ser detalhada apenas por esses testes, podendo ser entendida somente a partir da caracterização química, cujos métodos empregados para essa finalidade e os resultados obtidos encontram-se no próximo capítulo.

CAPÍTULO 4

IDENTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES E QUANTIFICAÇÃO DE ISOVITEXINA NOS EXTRATOS METANÓLICO E GLICÓLICO DE *P. coccinea*



4.1 INTRODUÇÃO

Nesta fase do trabalho, procedeu-se a caracterização química dos extratos preparados, com enfoque no extrato metanólico obtido por ultrassom, por este ter sido considerado o melhor método de extração para esse solvente, e no extrato glicólico obtido por maceração a 30 °C por 72 h, que apresentou a maior atividade antioxidante dentre os que tiveram o propilenoglicol como solvente extrator. Os extratos foram inicialmente investigados quanto aos flavonoides presentes por infusão direta em espectrômetro de massas com ionização por eletronebulização (ESI(-)-MS) e analisador triplo quadrupolo. Em uma primeira etapa, realizou-se uma varredura para a obtenção de um *fingerprint* dos extratos, por meio do qual se identificaram os possíveis flavonoides presentes com base nos constituintes químicos de outras espécies do gênero *Passiflora*. Na sequência, fez-se a fragmentação dos íons de interesse (ESI(-)-MS/MS) e comparação dos espectros obtidos com a fragmentação de padrões. A partir desses dados, desenvolveram-se dois métodos cromatográficos: um que mostrou a presença dos analitos identificados pela espectrometria de massas e outro que possibilitou a quantificação do flavonoide isovitexina, conforme exposto a seguir.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização dos extratos por espectrometria de massas com ionização por eletronebulização

Procedeu-se a análise dos diferentes extratos por meio da infusão direta de soluções contendo 10 μL da amostra filtrada (0,22 μm) em 1 mL de ACN:H₂O:NH₄OH, 80:20:0,1 (v/v/v) no espectrômetro de massas Waters, modelo Quattro Micro-API, em uma vazão de 100 $\mu\text{L min}^{-1}$. A caracterização foi realizada por eletronebulização no modo negativo (ESI(-)-MS), com voltagens de capilar e cone de 2,5 kV e 30 V respectivamente, utilizando N_{2(g)} como gás de dessolvatação,

a 400 °C, em uma vazão de 800 L h⁻¹ e varrendo-se o espectro entre 150 e 1000 unidades de massa. Os picos de razão massa / carga (m/z) de interesse foram fragmentados a uma energia de colisão de 20 V, utilizando-se Ar a 120 L h⁻¹ como gás de colisão.

4.2.2 Desenvolvimento de um método de separação por HPLC-DAD para os flavonoides identificados

Diferentes métodos encontrados na literatura foram testados para a separação dos flavonóides identificados por ESI(-)-MS nos extratos de *P. coccinea*. Dentre a grande variedade de composição de fases móveis e colunas contendo fases estacionárias do tipo C₁₈ com diferentes tamanhos de partícula e comprimentos de coluna avaliados, a melhor condição de separação foi obtida por meio da adaptação do método descrito por Ying *et al.* (2009) ^[65], utilizando-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu, modelo Proeminence LC20AT, com detector por arranjo de diodos (DAD) modelo Proeminence SPD-M20A, nas seguintes condições: coluna LiChrospher RP-18e (250 mm x 4 mm), tamanho de partícula 5 µm (Merck), injetor manual (Rheodyne) com volume de injeção de 5 µL e fase móvel composta por H₂O acidificada com H₃PO₄, pH 2,65 (A) e ACN:THF 95:5 (v/v) (B), com eluição segundo o gradiente 0-11 min, 5-18 % B; 11-35 min, 18-19 % B; 35-36 min, 19-5 % B e 37 min, 5 % B, a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e detecção a 330 nm.

Em todas as tentativas, foram utilizadas soluções estoque dos padrões de vitexina e isovitexina (Sigma Aldrich, pureza maior que 96 %) na concentração de 500 mg L⁻¹ em metanol grau HPLC (Tedia), diluindo-se as mesmas a 30 mg L⁻¹ para injeção. O padrão de 2''-O-β-D-glucopiranosil-vitexina utilizado já havia sido previamente isolado da planta *Alternanthera tenella* (Salvador *et al.*, 2006) ^[61] e também foi preparado a 30 mg L⁻¹ para injeção.

4.2.3 Otimização da extração em fase sólida (SPE)

Com o objetivo de preparar as amostras dos extratos de maior atividade antioxidante / fotoprotetora para a análise por HPLC-DAD, realizou-se uma etapa de limpeza pelo processo de SPE. Para tal, utilizou-se um sistema de extração em fase sólida (Phenomenex) e cartuchos de extração Supelclean LC18, 3mL (Supelco). Alguns métodos que descreviam a extração de flavonóides por SPE foram previamente testados e o mais adequado foi a adaptação do proposto por Pereira *et al.*, 2004 ^[21], conforme o protocolo descrito na Tabela 7:

Tabela 7: Condição de extração em fase sólida de flavonoides em *Passiflora* ssp. (adaptação de Pereira *et al.*, 2004) ^[21]

Condicionamento do cartucho de SPE	5,0 mL de MeOH grau HPLC
	5,0 mL de H ₂ O:H ₃ PO ₄ pH 2,65
Eluição	2,0 mL de MeOH:H ₂ O pH 2,65 acidificada com H ₃ PO ₄ , 60:40 (v/v)

Para a análise qualitativa, 5 mg do extrato metanólico de maior atividade antioxidante foram diluídos com 500 µL de metanol, grau HPLC, previamente à extração. Procedimento semelhante foi realizado para o extrato glicólico, diluindo-se 200 µL do extrato em 300 mL de metanol, grau HPLC. As frações recolhidas também foram avaliadas por ESI(-)-MS/MS, conforme o procedimento descrito no item 4.2.1, de modo a se confirmar a presença dos analitos de interesse.

Para a análise quantitativa, 3 mg do extrato metanólico mais ativo foram diluídos para o volume final de 2 mL em um balão volumétrico. No caso do extrato glicólico, fez-se a diluição de 1,0 mL do extrato para o volume final de 2 mL, também com o uso de um balão volumétrico.

4.2.4 Desenvolvimento e validação de um método para a quantificação de isovitexina nos extratos por HPLC-DAD

Usando-se o mesmo cromatógrafo e a mesma coluna descritos no item 4.2.2, várias tentativas de otimização do método qualitativo foram feitas de modo a se aumentar a resolução do pico correspondente à isovitexina para quantificá-la nas amostras em estudo. Para esta finalidade, utilizou-se uma fase móvel constituída de H₂O acidificada com H₃PO₄, pH 2,65 (A) e ACN (B). O gradiente mais adequado para essa situação foi: 0-15 min, 5-16 % B; 15-37 min, 16-17 % B; 37-39 min, 17-5 % B e 39-40 min, 5 % B, a uma vazão de 1 mL min⁻¹ e detecção a 330 nm. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão, construindo-se também a curva analítica com o padrão de isovitexina dissolvido em metanol, grau HPLC, para comparação e observação do efeito de matriz. O método de adição de padrão foi escolhido devido à presença de isovitexina nas amostras e à inexistência de uma matriz branco adequada, a qual permitiria a construção de uma curva analítica pelo método de calibração externa.

Para a construção da curva analítica do extrato metanólico, amostras de 3,0 mg foram pesadas em balões volumétricos de 2,0 mL, sendo fortificadas com os volumes necessários da solução estoque de isovitexina (500 mg L⁻¹) de forma que as concentrações finais fossem de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg L⁻¹. Procedimento semelhante foi adotado para os extratos glicólicos, fortificando-se 1,0 mL do extrato em balões volumétricos de 2,0 mL para as mesmas concentrações.

As amostras fortificadas dos extratos metanólico e glicólico passaram por uma etapa de limpeza por SPE segundo o procedimento descrito na Tabela 7 e as frações de interesse foram secas sob fluxo de N_{2(g)}, sendo ressuspensas em balões volumétricos de 2,0 mL com metanol, grau HPLC, previamente à injeção no cromatógrafo. Os parâmetros das curvas analíticas foram calculados pelo programa OriginPro 8 (OriginLab, Northampton, MA).

O método quantitativo desenvolvido foi validado com base nos critérios da Conferência Internacional de Padronização de Requerimentos Técnicos para

Registro de Produtos Farmacêuticos de Uso Humano (*International Conference on Harmonisation (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, 2005) ^[66], que estabelece a avaliação dos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, repetibilidade e precisão intermediária (etapa não realizada neste trabalho).

4.2.4.1 Seletividade

A seletividade do método foi avaliada pela comparação dos tempos de retenção da isovitexina nos extratos com relação ao padrão, pela pureza cromatográfica do pico na região de 200 a 800 nm, verificada por meio da comparação espectral em três pontos (início, ápice e cauda), e pela fortificação das amostras para a construção da curva analítica.

4.2.4.2 Efeito de matriz

Avaliou-se o efeito da matriz sobre o analito segundo Economou *et al.* (2009) ^[67] por meio da equação 3:

$$C\% = 100 \times \left(1 - \frac{S_m}{S_s} \right) \quad (3)$$

onde C% é a porcentagem de aumento ou supressão de sinal, S_m é o coeficiente angular da curva analítica construída na matriz e S_s é o coeficiente angular da curva analítica construída em solvente. A significância do efeito foi avaliada, ainda, pelo teste t de student a 95%, comparando-se os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas construídas na matriz com a curva obtida para o padrão em solvente.

4.2.4.3 Linearidade

A linearidade foi avaliada pelos coeficientes de correlação das curvas analíticas geradas pela injeção das soluções fortificadas e extraídas por SPE e pela distribuição gráfica dos resíduos dos modelos lineares construídos. Para verificar a qualidade do ajuste desses modelos às respostas obtidas, utilizou-se a análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$.

4.2.4.4 Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados pela injeção de diluições sucessivas da solução estoque de isovitexina em metanol grau HPLC até a observação da relação sinal/ruído de 3:1 (LD) e 10:1(LQ), determinando-se os valores de LD e LQ do instrumento

4.2.4.5 Repetibilidade e exatidão

Os ensaios de repetibilidade foram realizados nas concentrações de 1 (baixa), 10 (média) e 20 (alta) $\mu\text{g mL}^{-1}$. O processo de fortificação da amostra e SPE foram realizados em triplicata para cada concentração, totalizando 9 amostras.

A exatidão do método foi avaliada pela recuperação (R) nessas mesmas 3 concentrações, cada uma delas em triplicata. O procedimento adotado foi semelhante ao da construção da curva analítica, fortificando-se as amostras previamente à etapa de SPE. Realizou-se o cálculo da recuperação pela seguinte fórmula (equação 4):

$$R = \frac{C_f - C_i}{C_a} \cdot 100 \quad (4)$$

onde C_f é a concentração final após a fortificação, C_i é a concentração inicial já presente na amostra e C_a é a concentração de padrão adicionada ao extrato no processo de fortificação.

4.2.4.6 Eficiência de extração

Avaliou-se a eficiência de extração (EE) do processo de SPE para ambos os extratos de *P. coccinea* de acordo com Siqueira (2007)^[68], realizando-se, em uma primeira etapa, a fortificação das amostras antes do processo de SPE e, em uma segunda, a fortificação dos mesmos após o processo, permitindo a obtenção da seguinte relação (equação 5):

$$EE = \frac{A_a}{A_d} \cdot 100 \quad (5)$$

onde A_a é a área do pico cromatográfico correspondente à isovitexina quando a amostra é fortificada antes do processo de SPE e A_d é a área do mesmo pico quando a amostra é fortificada depois da extração em fase sólida.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Caracterização dos extratos por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS

A caracterização dos extratos por ESI(-)-MS teve como objetivo a visualização dos perfis de composição de cada extrato, buscando identificar possíveis flavonoides presentes nos mesmos através das razões m/z $[M-1]$, onde M representa a massa

molar do analito em questão. Na análise dos perfis obtidos, foram encontrados 3 possíveis compostos presentes (Tabela 8):

Tabela 8: Razões m/z observadas nos espectros e possíveis compostos presentes.

Substância	Massa molar (M)	Razão m/z
Vitexina/ isovitexina	432	431
2"-O-β-D-glucopiranosil- vitexina	594	593

Essa triagem de compostos foi realizada tendo-se como base os flavonoides descritos na literatura para outras espécies de *Passiflora*.

Os espectros dos extratos metanólicos obtidos por todos os métodos de extração mostraram-se com perfil muito semelhante (Figura 20). Já os espectros dos extratos glicólicos apresentaram diferenças de intensidade e quantidade de picos presentes (Figura 21), confirmando a influência do tipo de extração sobre o resultado final do produto obtido. A Figura 22 apresenta os perfis espectrais dos extratos metanólico e glicólico que apresentaram maiores atividades antioxidantes. No geral, percebe-se que o perfil exibido por ambos os extratos é semelhante visualmente em termos qualitativos.

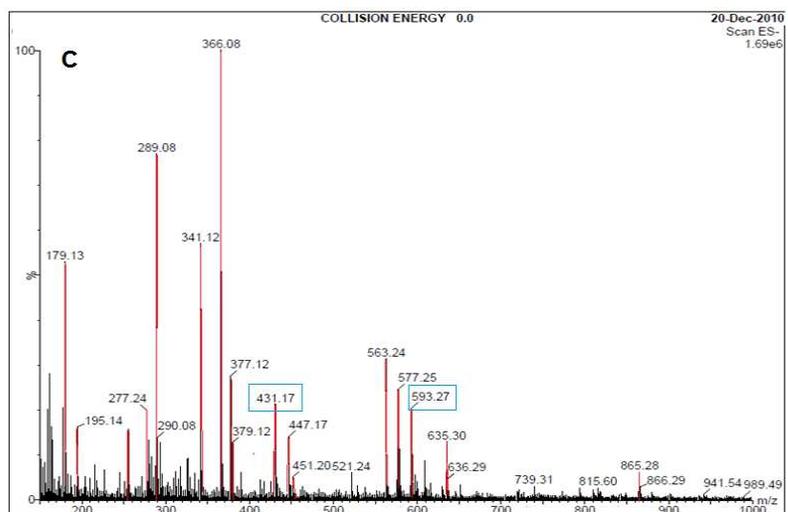
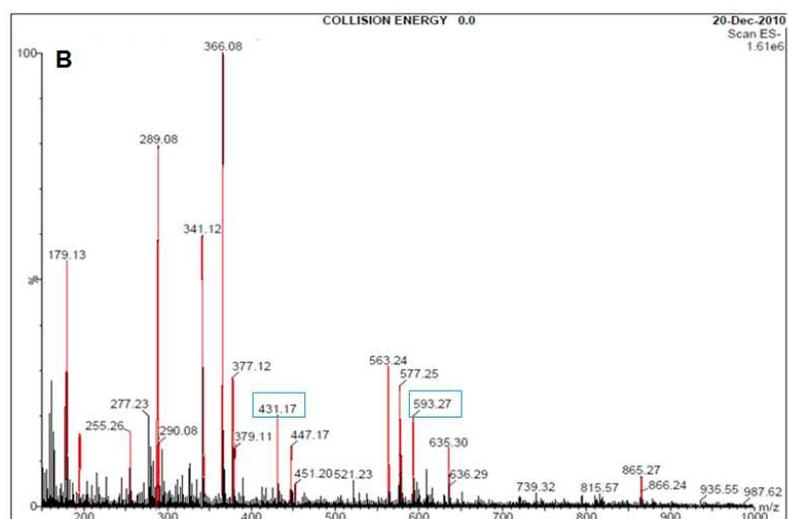
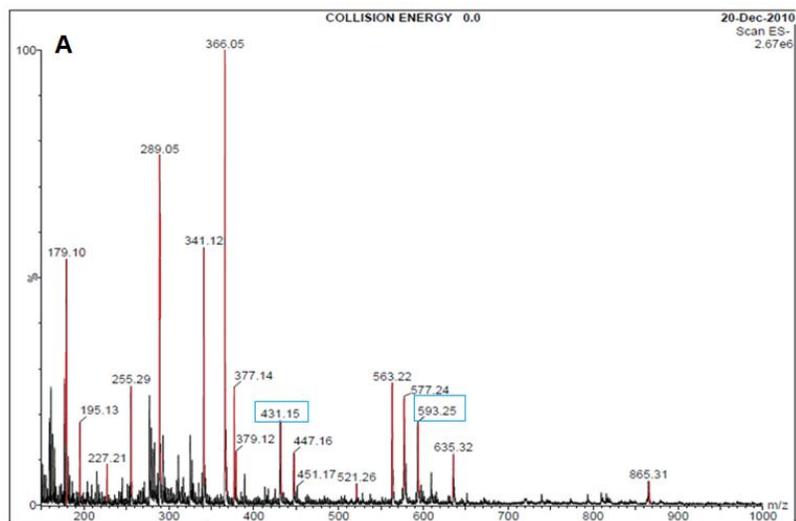


Figura 20: *Fingerprint* dos extratos metanólicos. A) Ultrassom. B) Maceração a temperatura ambiente. C) Maceração a 30 °C. Condições descritas no item 4.2.1

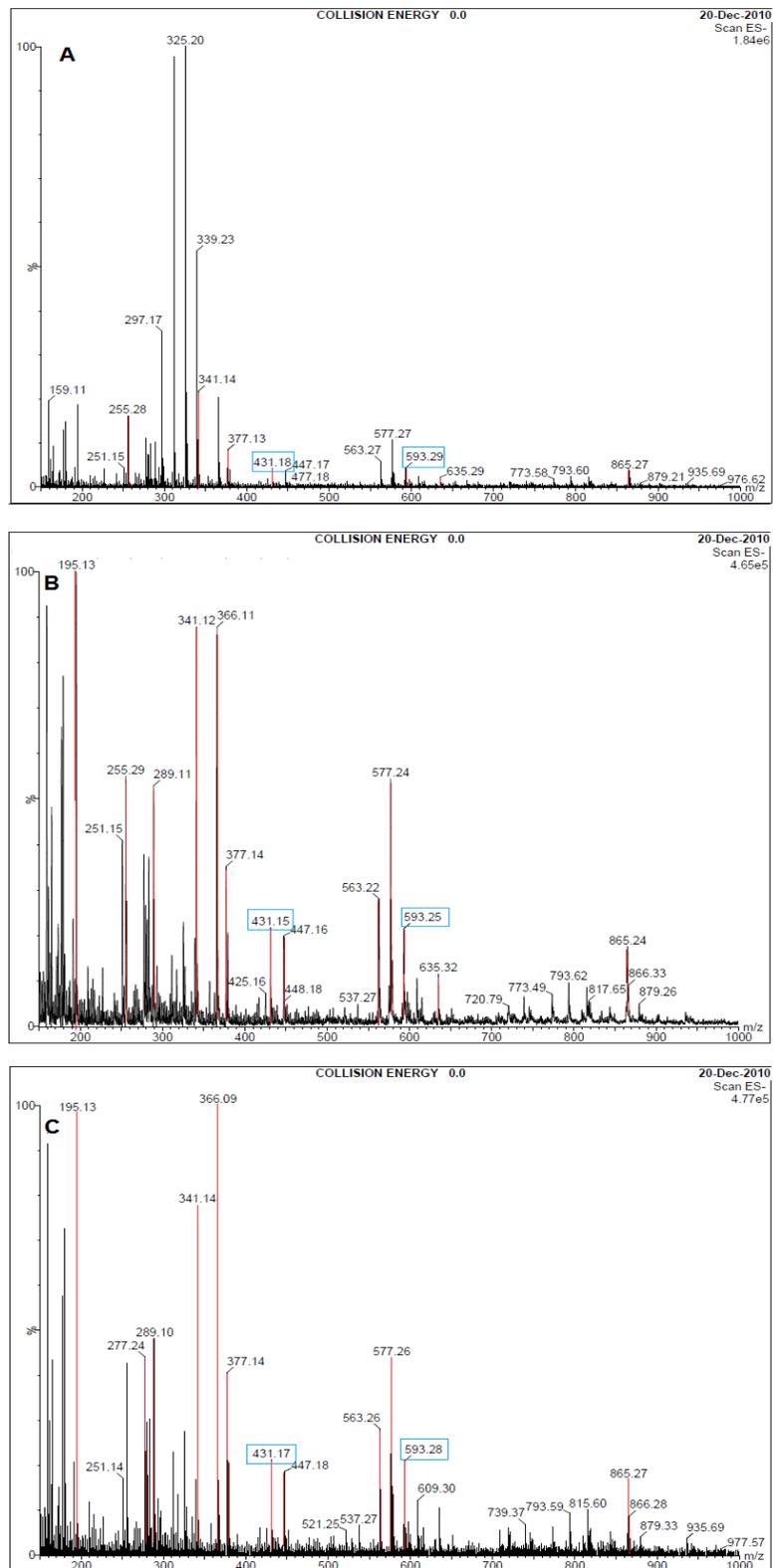


Figura 21: *Fingerprint* dos extratos glicólicos. A) Ultrassom. B) Maceração a temperatura ambiente. C) Maceração a 30 °C. Condições descritas no item 4.2.1

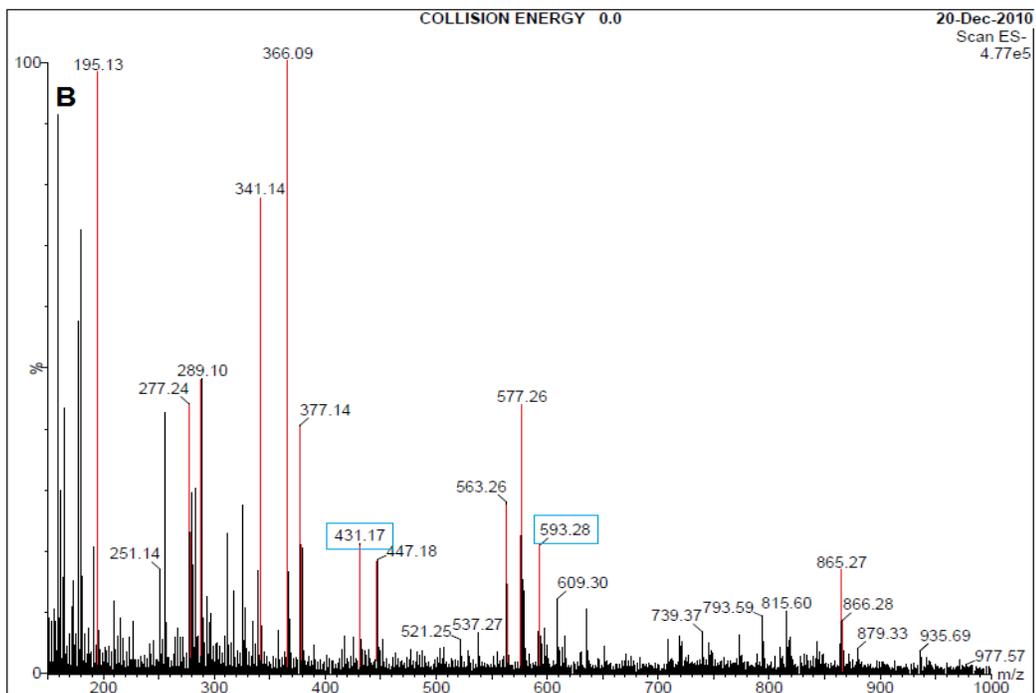
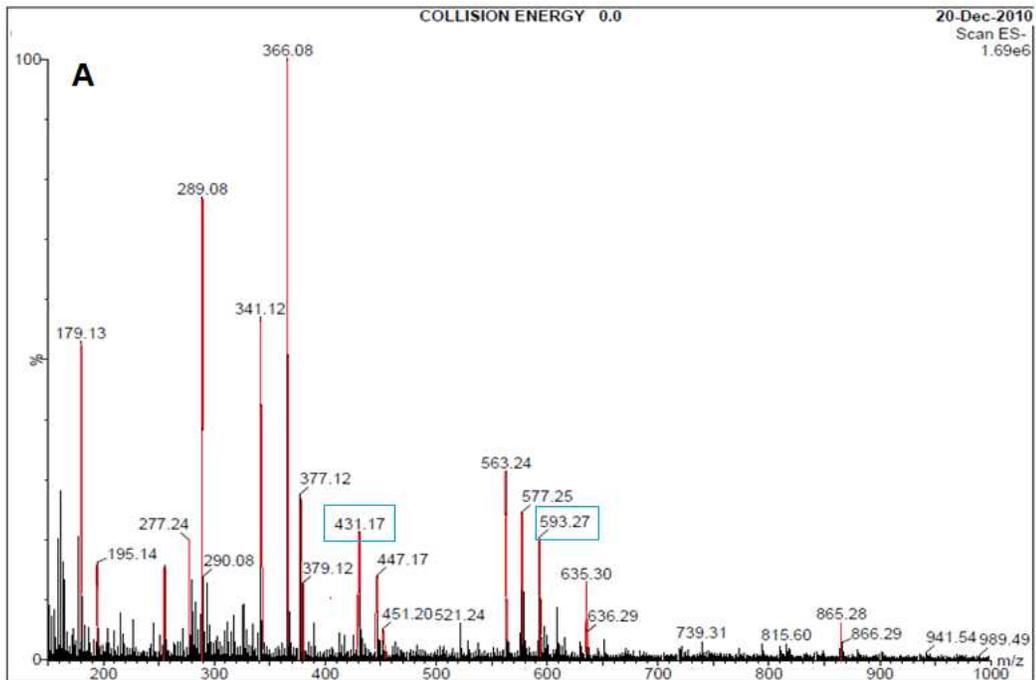


Figura 22: A) Extrato metanólico ultrassom. B) Extrato glicólico maceração 30 °C. Notar a semelhança no perfil de ambos os extratos (destaque em vermelho)

Para a confirmação da identidade dos compostos, fragmentaram-se os picos de razão m/z 431 e 593 e os possíveis padrões correspondentes (2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina, vitexina e isovitexina) com as energias de colisão de 15 e 20 V, respectivamente. A presença de 2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina foi confirmada no extrato metanólico (Figura 23). Quanto ao pico de valor m/z de 431, não foi possível diferenciar os compostos vitexina e isovitexina porque a fragmentação de ambos gera espectros idênticos nessas condições de análise. Contudo, pode-se perceber a presença de ao menos um desses compostos no extrato, dada a semelhança do perfil de fragmentação do pico de razão m/z 431 com a dos padrões de vitexina e isovitexina (Figura 24).

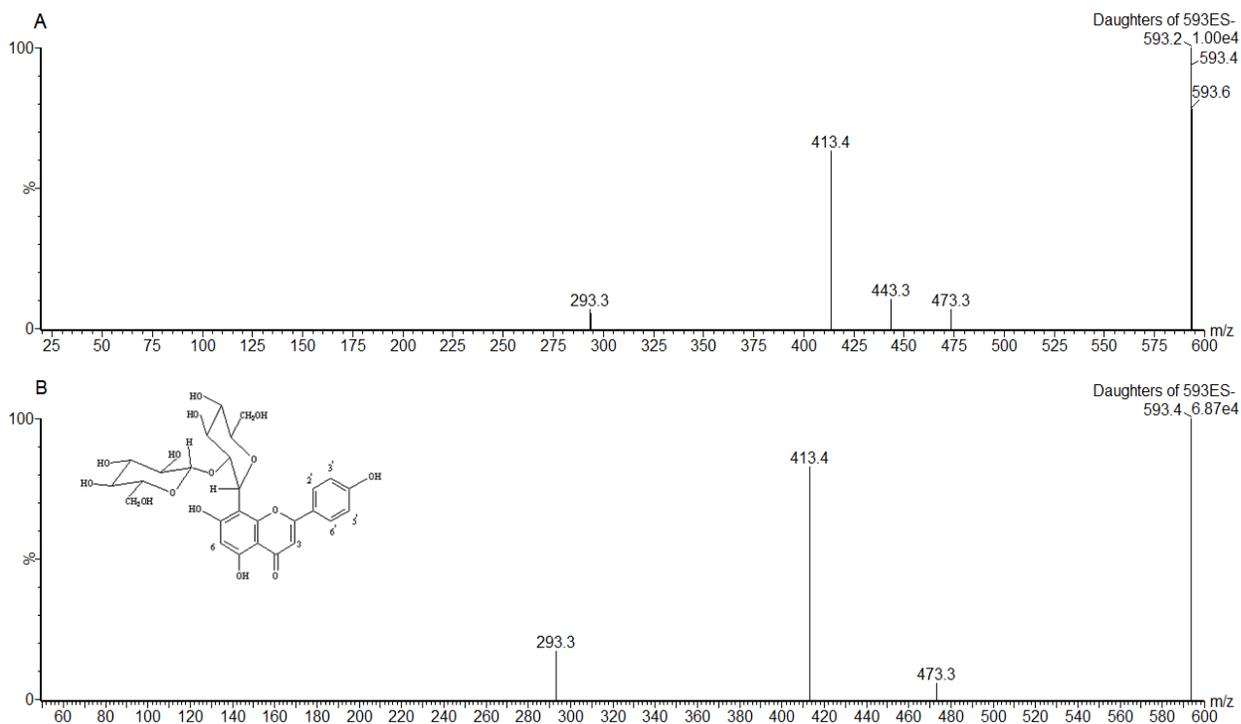


Figura 23: Fragmentação do pico de razão m/z 593. A) fração do extrato metanólico. B) padrão de 2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina. Energia de colisão: 15 V.

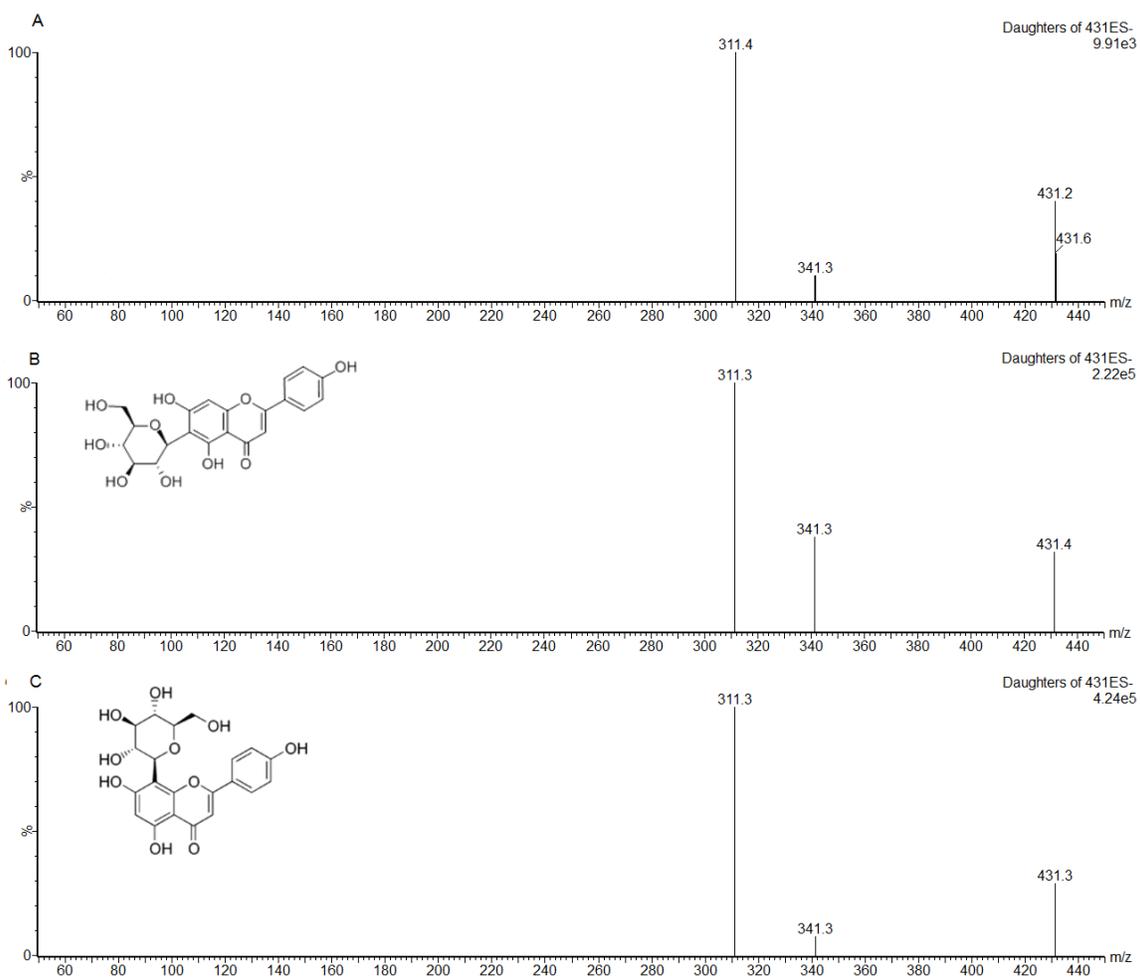


Figura 24: Fragmentação do pico de razão m/z 431. A) fração do extrato metanólico. B) isovitexina. C) vitexina. Energia de colisão: 20 V.

4.3.2. Desenvolvimento de um método de separação por HPLC-DAD dos flavonoides identificados por ESI(-)-MS

Para o desenvolvimento de um método de separação dos compostos relatados na Tabela 8, diversas condições foram avaliadas. Adaptações ao método de Ying *et al.* (2009) ^[65] permitiram a separação dos 3 compostos identificados. Observando-se a Figura 25, nota-se a semelhança no perfil das frações dos extratos glicólico e

metanólico obtidos após a etapa de limpeza das amostras por SPE. A fortificação das amostras com os padrões dos flavonóides identificados resultaram no aumento da intensidade dos sinais correspondentes, indicando a presença dos mesmos nos extratos metanólico e glicólico de *P. coccinea*.

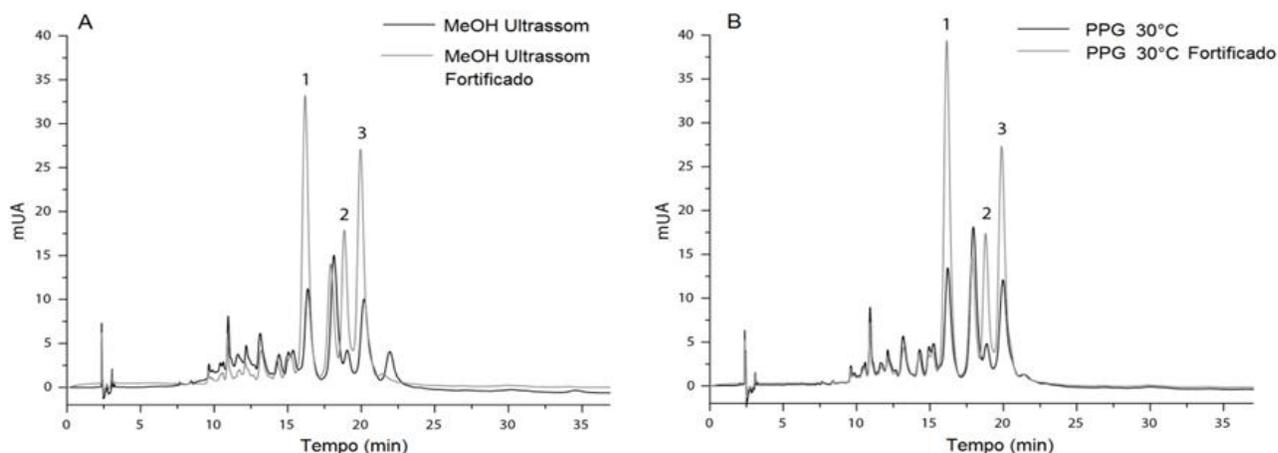


Figura 25: Cromatogramas da separação dos flavonóides: 1) 2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina (16,699 min) , 2) vitexina (18,842 min) e 3) isovitexina (20,141 min). A) Extrato metanólico ultrassom. B) Extrato glicólico maceração 30 °C. PPG: propilenoglicol. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher RP-18e (Merck) (250 mm x 4 mm), 5 mm de partícula, volume de injeção: 5 mL . Fase móvel: H₂O:H₃PO₄ pH 2,65 (A) e ACN:THF 95:5 (v/v) (B). Eluição por gradiente: 0-11 min, 5-18 % B; 11-35 min, 18-19 % B; 35-36 min, 19-5 % B e 37 min, 5 % B. Vazão de 1 mL min⁻¹. UV: 330 nm

A Figura 26 mostra os espectros registrados pelo detector DAD para cada pico determinado pela análise dos extratos com e sem fortificação com os padrões. Nota-se a semelhança entre os espectros, o que auxilia na confirmação da presença de 2''-O- β -D-glucopiranosil-vitexina, vitexina e isovitexina em ambos os extratos, conforme observado pela técnica de espectrometria de massas.

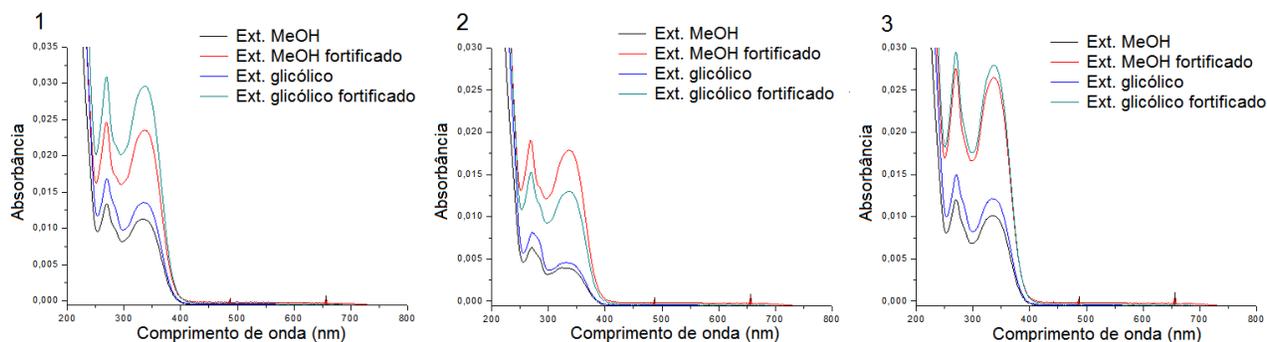


Figura 26: Espectro dos picos correspondentes aos flavonóides nas amostras com e sem fortificação: 1) 2''-O-β-D-glucopiranosil-vitexina. 2) Vitexina. 3) Isovitexina

A quantificação por este método cromatográfico, no entanto, não foi possível devido à falta de resolução entre os picos dos flavonóides em questão para essa finalidade. Segundo Collins *et al.* [69], para se quantificar um analito, é necessário que a resolução entre o pico de interesse e os picos dos compostos que eluem imediatamente antes e imediatamente após a ele seja de, ao menos, 1,25 sendo que, quando a resolução é igual ou maior que 1,5, há separação completa dos compostos. A tabela 9 mostra as resoluções dos picos identificados com relação aos picos imediatamente anteriores e posteriores.

Tabela 9: Resolução dos picos de interesse

Substância	Pico anterior	Pico posterior
2''-O-β-D-glucopiranosil-vitexina	0,67	2,0
Vitexina	0,4	1,2
Isovitexina	1,0	0,86

Dessa maneira, fizeram-se várias tentativas de adaptação do método descrito para que se aumentasse a resolução dos três compostos simultaneamente. No entanto, essa melhoria na separação não foi possível e optou-se pelo aumento da resolução da isovitexina em relação aos demais devido à maior disponibilidade de padrão (por ser comercial) e à abundância desta substância nessas amostras em

relação às demais identificadas. Além disso, Masteikova *et al.* (2008) ^[10] estudaram a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquoso e etanólico de folhas de *P. incarnata* e das soluções alcoólicas da mistura dos flavonóides encontrados em cada extrato, concluindo que a maior atividade antioxidante era predeterminada pelo aumento da concentração dos flavonóides vicenina, isovitexina e orientina. Isso faz supor que ao menos parte da atividade apresentada pelos extratos de *P. coccinea* possa ser devido à isovitexina, justificando a sua quantificação.

4.3.3. Desenvolvimento de um método analítico para a quantificação da isovitexina

Para a quantificação da isovitexina nos extratos metanólico (ultrassom) e glicólico (maceração a 30 °C) de *P. coccinea*, utilizou-se o método da adição de padrão. A Figura 27 mostra os cromatogramas obtidos para os extratos metanólico e glicólico em estudo nessas condições sem a adição do padrão de isovitexina, bem como a avaliação espectral para a verificação da pureza de pico.

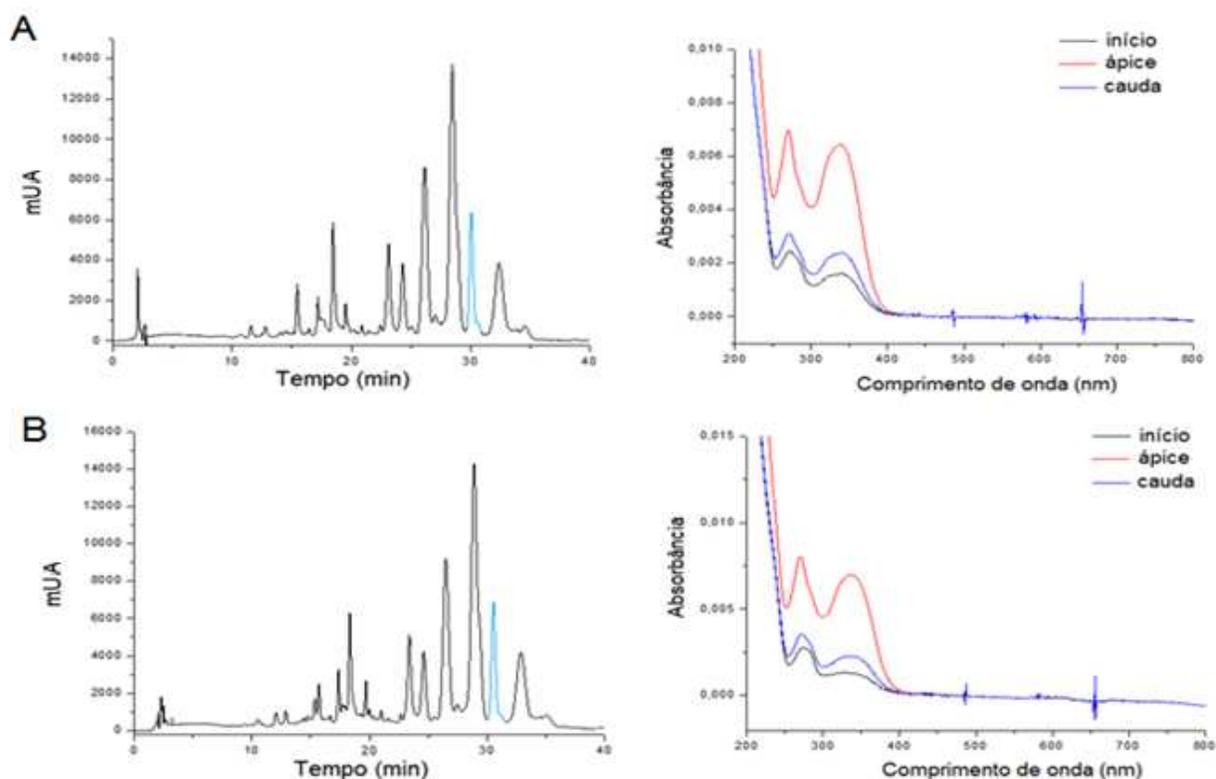


Figura 27: A) Cromatograma do extrato metanólico (ultrassom) com destaque para a isovitexina em azul (dir). Espectros do pico da isovitexina em 3 regiões (início, ápice e cauda). B) Idem para o extrato glicólico. Condições cromatográficas: coluna LiChrospher RP-18e (Merck) (250 mm x 4 mm), 5 mm de partícula, volume de injeção: 5 mL . Fase móvel: H₂O:H₃PO₄ pH 2,65 (A) e ACN (B). Eluição por gradiente: 0-15 min, 5-16 % B; 15-37 min, 16-17 % B; 37-39 min, 17-5 % B e 39-40 min, 5 % B. Vazão de 1 mL min⁻¹. UV: 330 nm

A Tabela 10 mostra que a resolução do pico da isovitexina em relação aos picos vizinhos é adequada à quantificação dessa substância em ambos os extratos. Dessa forma, procedeu-se a construção das curvas analíticas para a isovitexina em metanol e por meio da adição de padrão aos extratos na faixa de 1,0 a 20,0 mg L⁻¹, conforme ilustra a Figura 28. Os limites dessa faixa de trabalho são superiores aos limites de detecção (0,12 mg L⁻¹) e quantificação (0,25 mg L⁻¹) do instrumento. Os coeficientes de correlação das três curvas construídas foram todos superiores a 0,99 (Tabela 11). Além disso, a dispersão dos resíduos segue um padrão aleatório de distribuição, indicando a adequação dos modelos lineares aplicados às respostas obtidas.

A ANOVA também mostrou essa adequação, pois os valores de F calculados a 95% de confiança foram de 4160 para a curva em solvente, 6652, para o extrato metanólico e 1408 para o extrato glicólico. A 95% de significância, o valor de F para a situação do extrato metanólico é de 4,67 e de 4,75 para as demais ^[70], mostrando que esses modelos são significativos.

Tabela 10: Resoluções do pico da isovitexina

Extrato	Pico anterior	Pico posterior
Metanólico	1,56	2,22
Glicólico	1,56	1,64

Tabela 11: Parâmetros das curvas analíticas

Amostra	Inclinação	DP* inclinação	Intercepto	DP* intercepto	r²	Coefficiente de correlação (r)
Extrato metanólico	21653	265	74210	3254	0,99790	0,999
Extrato glicólico	18146	484	169726	6101	0,99084	0,995
Isovitexina em MeOH	21252	330	995	4157	0,99688	0,998

***DP: estimativa do desvio padrão absoluto**

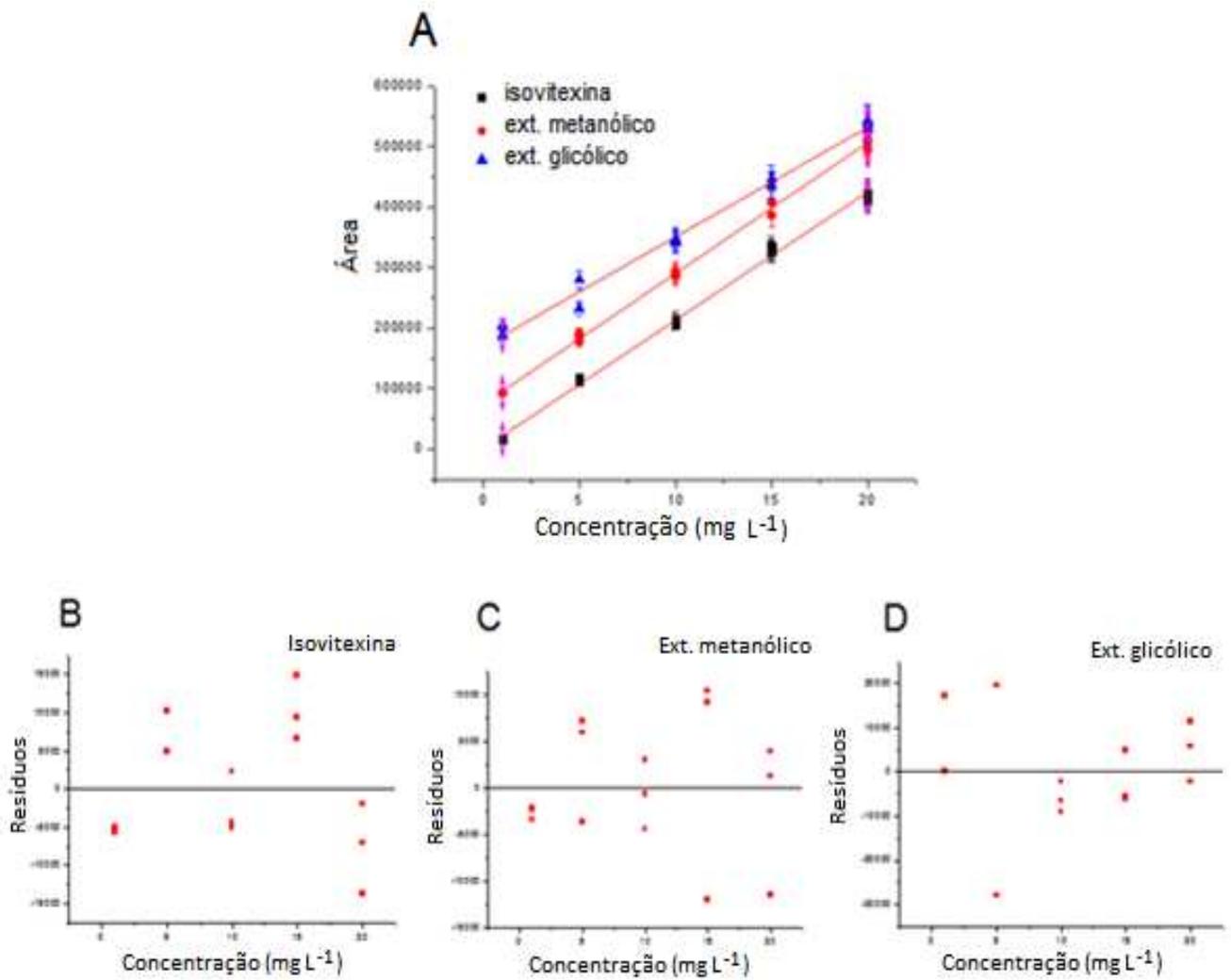


Figura 28: A. Curvas analíticas da isovitexina em solvente, no extrato metanólico (ultrassom) e no extrato glicólico (maceração 30 °C). B, C e D: gráficos de distribuição dos resíduos das curvas da isovitexina em solvente, no extrato metanólico e no extrato glicólico, respectivamente

Observando-se a Figura 28 A e os coeficientes angulares das equações das três curvas (Tabela 11), pode-se notar a possível existência de um efeito de matriz, mais facilmente identificável para o extrato glicólico. Para confirmar a existência de supressão ou aumento de intensidade do sinal da isovitexina nos extratos, causados pela coeluição de componentes das matrizes, calcularam-se esses efeitos com base no trabalho de Economou *et al.* (2009) ^[67], concluindo-se que a matriz do extrato metanólico causa uma supressão da ordem de 1,89 % no sinal do analito de interesse e a matriz do extrato glicólico faz com que o sinal deste mesmo flavonóide se intensifique em 14,61%. Uma possível causa para esse elevado valor apresentado pelo extrato glicólico pode estar em uma limitação técnica notada durante os experimentos: o propilenoglicol não é retido no cartucho de SPE utilizado neste trabalho e, dessa forma, a fração final recolhida contém este solvente, bem como a solução injetada no cromatógrafo. A comparação dos coeficientes angulares das curvas construídas na matriz com a curva do padrão de isovitexina em solvente feita pelo teste t de Student a 95% de confiança, revela que o efeito de matriz é significativo para ambos os extratos (Tabela 12) e, portanto, a quantificação por meio da adição de padrão é a mais adequada para estes casos. Dessa forma, os valores de isovitexina encontrados foram de $(2,28 \pm 0,06)$ mg g⁻¹ para o extrato metanólico obtido por ultrassom e $(0,18 \pm 0,01)$ mg g⁻¹ para o extrato glicólico obtido por 72 h de maceração a 30 °C.

Tabela 12: Comparação dos coeficientes angulares das curvas construídas por adição de padrão com relação à curva construída no solvente

Extrato	t tabelado * ^[70]	t calculado
Metanólico	1,073	3,622
Glicólico	1,709	35,183

***95% de confiança**

Quanto à exatidão do método desenvolvido, os valores de recuperação encontrados para as concentrações baixa, média e alta de ambas as curvas analíticas, construídas por adição de padrão, ficaram dentro da faixa de 70 a 120 % ^[71], conforme mostra a Tabela 13. Esta alta porcentagem de recuperação foi acompanhada por uma elevada eficiência de extração, que se situou acima dos 93

%. A tabela 13 também mostra a repetibilidade do método, cujos valores de estimativa do desvio padrão relativo (DPR) para as triplicatas de cada concentração ficaram abaixo de 5 %.

Tabela 13: Recuperação e eficiência de extração

Extrato	Metanólico ultrassom			Glicólico maceração 30°C		
	1	10	20	1	10	20
Concentração (mg L ⁻¹)	1	10	20	1	10	20
Recuperação (%)	79 ± 4	104 ± 6	102 ± 4	89 ± 6	98 ± 3	96 ± 0,4
Eficiência de extração(%)	95	-	97,0	93	-	96
Repetibilidade (DPR*)	0,9	4	3	0,6	2	0,3

* Estimativa do desvio padrão relativo das áreas encontradas em cada concentração (triplicata)

Cabe salientar que, apesar de ter sido quantificada para comparação dos extratos, a quantidade de isovitexina não pode, por si só, explicar a superioridade da atividade antioxidante do extrato metanólico em relação ao glicólico, já que, muito frequentemente, a atividade de extratos vegetais não é reproduzida por substâncias ativas isoladas, sendo a ação de um extrato determinada por mais de um componente que pode atuar sobre os mesmos processos bioquímicos ou contribuir de outras maneiras, como, por exemplo, influenciando sobre a sua estabilidade ^[38]. Contudo, através dessa quantificação, percebe-se que o metanol possui um poder extrator maior que a do propilenoglicol, visto que o mesmo material vegetal foi extraído com os dois solventes e que ambos os extratos apresentam um perfil cromatográfico semelhante, com quantidades relativas de isovitexina similares. A quantidade de flavonoides em cada extrato é um fator determinante para sua atividade, porém maiores estudos com relação à composição química dos mesmos seriam necessários para um entendimento mais detalhado dessa diferença de comportamento.

4.4 CONCLUSÕES

O método cromatográfico validado para a quantificação de isovitexina possibilitou a percepção de que a diferença de atividade antioxidante entre os extratos metanólico, obtido por extração assistida por ultrassom, e glicólico, obtido por maceração a 30 °C, está na concentração dos flavonoides que cada solvente consegue extrair de *P. coccinea*. O propilenoglicol apresentou um poder de extração inferior ao metanol pelos métodos de extração selecionados para este trabalho, porém nota-se uma semelhança qualitativa entre os extratos metanólico e glicólico de maior atividade antioxidante quando se analisam os *fingerprints* fornecidos pela varredura realizada em ESI(-)-MS/MS.

A inferioridade da concentração de isovitexina no extrato glicólico em relação ao metanólico não é um artefato da técnica de limpeza de amostra empregada. Mesmo com a dificuldade de não retenção do propilenoglicol no cartucho C₁₈ utilizado neste trabalho, a eficiência de extração foi da mesma ordem para ambos os extratos em ambas as concentrações testadas, o que confere confiabilidade às concentrações encontradas. O fato de o propilenoglicol ter um baixo poder de extração dos flavonoides de *P. coccinea* não impede o uso dessa planta para fins cosméticos, uma vez revelada a existência de atividade antioxidante na espécie. Desta maneira, abrem-se as possibilidades de investigação desses extratos *in vivo* e, com a confirmação da eficácia de *P. coccinea* nessa ocasião, podem-se testar novos métodos de extração que aumentem o poder extrator do propilenoglicol ou o emprego de outras formas de extração com outros solventes, com a preocupação do uso de tecnologias limpas segundo a tendência da química verde. Outro esforço necessário para o uso de *P. coccinea* para fins cosméticos está na maior caracterização química dos flavonoides presentes nos diferentes extratos da planta, iniciada pioneiramente pelo presente trabalho.

CAPÍTULO 5
CONCLUSÕES GERAIS



CONCLUSÕES GERAIS

De forma geral, o presente trabalho descreveu a presença de três flavonoides em *P. coccinea* (Aubl.). Esses flavonoides, em especial a vitexina e a isovitexina, já foram descritos em outras espécies do gênero, porém não haviam sido encontrados em *P. coccinea* anteriormente à execução dessa pesquisa que, além das substâncias encontradas, mostrou uma atividade antioxidante promissora da espécie e é um dos poucos a descrever a composição química de um extrato glicólico.

Pontualmente, por meio desta dissertação, conclui-se que:

1. Quanto à atividade antioxidante de *P. coccinea*:

- Extratos metanólicos: não apresenta diferença entre os métodos de extração, tendo sido avaliadas a extração assistida por ultrassom (30 min), a maceração a temperatura ambiente (72 h) e a maceração a 30 °C (72 h);
- Extrato glicólico: maceração a 30 °C gera o extrato de maior atividade antioxidante;
- Atividade do extrato metanólico: superior a dos extratos glicólicos e detectável pelo teste do DPPH em creme a 1 % (m/m).

2. Quanto à atividade fotoprotetora de *P. coccinea*:

- Os extratos absorvem na região do UVB, mas não exibem atividade fotoprotetora direta;
- Há potencial de atividade dos extratos metanólicos e glicólico obtido por maceração a 30 °C como protetores indiretos.

3. Quanto à avaliação química dos extratos por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS:

- Os extratos metanólicos exibem perfis semelhantes entre si.
- Os extratos glicólicos obtidos pelos diferentes métodos apresentam diferenças quanto à composição.

- Foram encontrados os flavonoides 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina, isovitexina e vitexina nos extratos de *P. coccinea* com maior atividade antioxidante.

4. Quanto à avaliação dos extratos de maior atividade por HPLC-DAD:

- Os extratos metanólico (ultrassom) e glicólico (maceração a 30°C) mostraram perfis semelhantes por HPLC-DAD.
- A presença de 2"-O-β-D-glucopiranosil-vitexina, isovitexina e vitexina foi confirmada em ambos os extratos.
- Foram encontrados $(2,28 \pm 0,06)$ mg g⁻¹ de isovitexina no extrato metanólico (ultrassom) e $(0,18 \pm 0,01)$ mg g⁻¹ no extrato glicólico (maceração 30 °C). O poder extrator do propilenoglicol é relativamente baixo.

Diante da atividade antioxidante apresentada pela espécie, algumas perspectivas futuras a este trabalho são:

- A investigação dos extratos *in vivo*.
- O teste de novos métodos de extração que aumentem o poder extrator do propilenoglicol.
- O emprego de outras formas de extração com outros solventes.
- A maior caracterização química dos flavonoides presentes nos diferentes extratos da planta.
- O estudo da variabilidade sazonal dos constituintes e da atividade antioxidante da espécie.

BIBLIOGRAFIA

- [1] KALMADEEP, D.; DAHUAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, 94, 2004, 1-23
- [2] RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; PEREIRA, T. V.; REGINATTO, F. H.; DAL-PIZZOL, F.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant and antiaglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extract. **Food Chemistry**, 100, 2007, 719-734
- [3] FERRERES, F.; SOUZA, C.; VALENTÃO P.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; GIL-IZQUIERDO, A. New C-deoxyhexsyl flavones and antioxidant properties of *Passiflora edulis* leaf extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 2007, 10187-10193
- [4] MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. D.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 37, 2005, 399-403
- [5] REGINATTO, F. H. DE-PARIS, F.; PETRY, R. D.; QUEVEDO, J.; ORTEGA, G. G.; GOSMAN, G.; SCHENKEL, E. P. Evaluation of anxiolytic activity of spray dried powders of two south Brazilian *Passiflora* species. **Phytotherapy Research**, 20, 2006, 348-351
- [6] ZERAIK, M. L., PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20, 2010, 459-471
- [7] ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. **Microchemical Journal**, 96, 2010, 86-91
- [8] IGNAT, I.; VOLFF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, 126, 2011, 1821-1835
- [9] STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, 30, 2007, 3268-3295
- [10] MASTEIKOVA, R. BERNATONIENE, J.; BERNATONIENE, R.; VELZIENE, S. Antiradical activities of the extract of *Passiflora incarnata*. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 65(5), 2008, 577-583
- [11] JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, 123, 2002, 801-810
- [12] DI MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Mudanças por radicais livres e ação tópica de antioxidantes. **Cosmetics and Toiletries**, 19, 2007, 74-76
- [13] WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a review of the current and future technologies. **Dermatologic Therapy**, 23, 2010, 31-47
- [14] FARRIS, P. Idebenone, Green tea and Coffeberry® extract: new and innovative antioxidants. **Dermatologic Therapy**, 20, 2007, 322-329
- [15] SILVA, G. C. Preparo do extrato de cinco espécies de *Passiflora* e elaboração de creme hidratante com atividade antioxidante in vitro. **Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia)**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009
- [16] CORREA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas, Ministério da Agricultura: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal**, 1984

- [17] Associação das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Proteção da Saúde (ABIFISA) **Fitoterapia: conceitos. Transformações das Plantas Mediciniais**. Disponível em: http://www.abifisa.org.br/saibamais_conceitos.asp
- [18] PASTENE, E. R.; BOCAZ, G.; PERIC, I.; MONTES, M.; SILVA, V.; RIFFO, E. Separation by capillary electrophoresis of C-glycosylflavonoids in *Passiflora* sp. extracts . **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, 45 (3), 2000
- [19] MARCHART, E.; KRENN, L.; KOPP, B. Quantification of the flavonoid glycosides in *Passiflora incarnata* by capillary electrophoresis. **Planta Medica** 69(5), 2003, 452-456
- [20] VOIRIN, B.; SPORTOUCH, M.; RAYMOND, O.; JAY, M.; BAYET, C.; DANGLES, O.; EL HAJJI, H. Separation of flavone C-glycosides and quantitative analysis of *Passiflora incarnata* L. by capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, 11, 2000, 90-98
- [21] PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; LANÇAS, F. M., WAUTERS, J.; TITS, M.; ANGENOT, L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. **Phytochemical Analysis**, 15(4), 2004, 241-248
- [22] PEREIRA, C. A. M.; YARIWAKE, J. H.; McCOULLAGH, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. **Phytochemical Analysis** 16(5), 2005, 295-301
- [23] GRICE, I. D.; FERREIRA, L. A.; GRIFFITHS, L. Identification and simultaneous analysis of harmaline, harmine, harmol, isovitexin and vitexin in *Passiflora incarnata* extractes with a novel HPLC method. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 24(16), 2001 2513-2523
- [24] SPENCER, K.; SEIGLER, D. S. Passicoccin: a sulphated cyanogénic glycoside from *Passiflora coccinea*. **Phytochemistry**, 24, 1985, 2615-2617
- [25] NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, 302, 2010, 71-83
- [26] GUARATINI, T.; CALLEJON, D. R.; PIRES, D. C.; LOPES, J. N. C.; LIMA, L. M.; NETO, D. G.; SUSTOVICH, C.; LOPES, N. P. Fotoprotetores derivados de produtos naturais: perspectivas de mercado e interações entre o setor produtivo e centros de pesquisa. **Química Nova**, 32(3), 2009, 717-721
- [27] JUNKINS-HOPKINS, J. M. Antioxidants and their chemoprotective properties in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Abr., 2010, 663-665
- [28] GONZALES, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, 26, 2008, 614-626.
- [29] AFAQ, F. Natural Agents:cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 508, 2011, 144-151
- [30] DURANGO, E. J. O. Búsqueda de Sustancias Bioactivas a partir de Dos Especies de La Flora Colombiana: Alcaloides de *Phaendranassa dúbia* (Amarillidaceae) y biflavonoides de *Garcinia madruno* (Cluseaceae). **Tese (Doctoramento en Medicamentos, Alimentación y Salud)**. Universidad de Barcelona, Barcelona, 2008.
- [31] MACKIEWICZ, Z.; RIMKEVICIUS, A. Skin Aging. **Gerontologija**, 9, 2008,103-108
- [32] PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**, 48, 2003.

- [33] SCHARFFETTER-KOCHANEK Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, 35, 2000, 307-316.
- [34] YAMAMOTO, Y. Role of active oxygen species and antioxidants in photoaging. **Journal of Dermatological Science**, 27, S1-S4, 2001.
- [35] CHEN, L.; HU, J. Y.; WANG, S. Q. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. **Journal of American Academy Dermatology**, 2012, 1-12
- [36] DIVYA, R.; SAMBANDAN, B. A., RATNER, D. Sunscreens: a review update. **Journal of American Academy Dermatology**, 64 (4), 2012, 748-758
- [37] BALOGH, T. S.; PEDRIALI, C. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade me fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 86 (4), 2011, 732-742
- [38] MATSUI, M. S.; HSIA, A.; MILER, J. D.; HANNEMAN, K.; SCULF, H.; COOPER, K. D.; BARON, E. Non-sunscreen photoprotection: antioxidants add value to a sunscreen. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, 14, 2009, 56-59.
- [39] SCOTII L. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43, 2007, 153-166
- [40] TRABBER, M. G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology and Medicine**, 43, 2007, 4-15
- [41] BURKE, K. E. Photodamage of the skin: protection and reversal with topical antioxidants, **Journal of Cosmetic Dermatology**, 3, 2004, 149-155
- [42] SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004
- [43] LU, Y.; LOU, Y.; XIE, J.; PENG, Q.; LIAO, J.; YANG, C. S.; HUANG, M.; CONNEY, A. H. Topical applications of caffeine or (-) – epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.**, 99, 2002, 12455-12460
- [44] HEINRICH, U.; MOORE, C. E.; DE SPIRIT, S.; TRONIER, H.; STAHL, W. Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation and modulate skin properties of women. **The Journal of Nutrition**, 2011, 1202-1208
- [45] CAMOUSE, M. M.; DOMINGO, D. S.; SWAIN, F. R.; CONRAD, E. P.; MATSUI, D. M.; DECLERCQ, L.; COOPER, K. D.; STEVENS, S. R.; BARON, E. D. Topical application of green and white tea extracts provides protection from solar-simulated ultraviolet light in human skin. **Experimental Dermatology**, 2008, 522-525
- [46] WOHLMUTH, H.; PENMAN, K. G., PEARSON, T., LEHMANN, R. P. Pharmacognosy and chemotypes on passionflower (*Passiflora incarnata*, L.). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 33(6), 1015-1018.
- [47] RUDNICKI, M. Propriedades Antioxidantes de Extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Bioquímica)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

- [48] BERNACCI, L. C.; MELETTI, L. M. M.; SOARES-SCOTT, M. D. Maracujá-Doce: O Autor, A Obra E A Data da Publicação de *Passiflora alata* (PASSIFLORACEAE). **Revista Brasileira de Fruticultura**, 25, 2003, 355-356
- [49] GONÇALVES, J. S.; SOUZA, S. A. M. Fruta da Paixão: panorama econômico do maracujá no Brasil. **Informações Econômicas**, 36, 2006, 29-36
- [50] SENA, L. M.; ZUCOLOTTO, S. M.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P.; LIMA, T. C. M.; Neuropharmacological activity of the pericarp of *Passiflora edulis flavicarpa* Degener: putative involvement of C-glycosylflavonoids. **Society for Experimental Biology and Medicine**, 967- 974, 2009.
- [51] ZUCOLOTTO, S. M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Phytochemical Analysis**, 2011
- [52] ANTOGNONI, F.; ZHENG, S.; PAGNUCCO, C.; BARALDI, R.; POLI, F.; BIONDI, S. Induction of flavonoid production by UV-B radiation in *Passiflora quadrangularis* callus cultures. **Fitoterapia**, 78, 2007, 345-352
- [53] CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus (Celastraceae)* e de *Passiflora (Passifloraceae)* e comparação com método CLAE-UV. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 19 (4), 2009, 860-864
- [54] HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 53, 2005, 1841-1856
- [55] MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, 25, 2010, 291-312
- [56] ZIELINSKA, D.; ZIELINSKI, H. Antioxidant activity of flavones C-glucosides determined by updated analytical strategies. **Food Chemistry**, 124, 2011, 672-678
- [57] VELASCO, M. V. R.; SARRUF, F. D.; SALGADO-SANTOS, I. M. D.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, 363, 2008, 50-57.
- [58] STORTI, E. F. Biologia da polinização e sistema reprodutivo de *Passiflora coccinea* Aubl. em Manaus, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, 32(3), 2002, 421-429
- [59] MENSOR, L. L.; MENESES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15, 2001, 127-130
- [60] HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; PRIOR, R. L. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, 2002, 4437-4444
- [61] SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; MERTENS-TALCOTT, S. U.; CASTRO, W. V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D. A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. **Zeitschrift für Naturforschung. C A Journal of Biosciences**, Tübingen, 61, 2006, 19-25
- [62] MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. A.; AZULAY, R. D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 61(3), 1986, 121-124

- [63] BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**, v. 1, Série Qualidade, 2004.
- [64] **Basf Sunscreen Simulator**. Disponível em: www.basf.com/sunscreen-simulator
- [65] YING, X. X.; WANG, R.; XU, J.; ZHANG, W.; LI, H.; ZHANG, C.; LI, F. HPLC determination of eight polyphenols in the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major. **Journal of Chromatographic Science**, 47(3), 2009, 201-205
- [66] **International Conference on Harmonisation (ICH)**. Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- [67] ECONOMOU, A.; BOTISTI, H.; ANTONIOU, S.; TSIPI, D. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1216(31), 2009, 5856-5867
- [68] SIQUEIRA, S. R. R. Otimização e validação de método analítico para a determinação de cloranfenicol em alimentos de origem animal utilizando a técnica LC-ESI-MS-MS. **Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)**, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2007
- [69] COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Ed. Unicamp, Campinas, 2006
- [70] NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Ed. Unicamp, Campinas, 2001
- [71] RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27(5), 2004, 771-780