

## Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com $\beta$ -ciclodextrina

### Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of the hexane extract from bacuri seeds (*Platonia insignis* Mart.) and its $\beta$ -cyclodextrin-based inclusion complex

Juliana Lima Nascimento<sup>1</sup>, Angélica Gomes Coêlho<sup>1</sup>, Ytallo Samuel Oliveira Barros<sup>2</sup>, Oskar Almeida Silva<sup>1</sup>, Rivelilson Mendes Freitas<sup>1</sup>, Márcio Santos Rocha<sup>1</sup>, Jorge Maurício David<sup>3</sup>, Joaquim Soares Costa Júnior<sup>4</sup>, Daniel Dias Rufino Arcanjo<sup>5</sup>, Rita de Cássia Meneses Oliveira<sup>5</sup>, Antônia Maria das Graças Lopes Citó<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil.

<sup>4</sup>Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

<sup>5</sup>Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

\* Correspondência:

Endereço: Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portella, SN, Bairro Ininga, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Teresina-PI, 64049-550.

[gracacito@gmail.com](mailto:gracacito@gmail.com)

#### RESUMO

Esse trabalho tem por objetivo avaliar o efeito antioxidante do extrato hexânico das sementes de *Platonia insignis* (EHSB) e de seu complexo de inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina (EHSB: $\beta$ CD). O efeito antioxidante foi avaliado através de abordagens *in vitro*, como o ensaio de inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e remoção dos radicais hidroxila e nitrito. Os resultados demonstraram que o EHSB foi capaz de prevenir a peroxidação lipídica, reduzindo a formação de TBARS, assim como diminuiu a formação dos radicais hidroxila e nitrito. Estes efeitos foram significativamente potencializados para o EHSB: $\beta$ CD. Estes resultados sugerem um potencial antioxidante promissor para esta espécie, assim como sua inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina reforça suas aplicações farmacêuticas, levando ao desenvolvimento de novos bioprodutos.

**Palavras-chave:** óxido nítrico; peroxidação lipídica; radical hidroxila.

#### ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate the antioxidant effect of the hexanic extract from *Platonia insignis* seeds (EHSB) and its  $\beta$ -cyclodextrin-based inclusion complex (EHSB: $\beta$ CD). The antioxidant effect was evaluated by *in vitro* approaches, such as inhibition of TBARS formation and scavenger of hydroxyl and nitrite radicals. The results showed that EHSB were able to prevent lipid peroxidation, reducing TBARS formation, as well as showed a significant decrease in the formation of hydroxyl and nitrite radicals. These results suggest a promising antioxidant potential for this species, as well as its inclusion in  $\beta$ -cyclodextrin reinforces its pharmaceutical applications leading towards the development of new bioproducts.

**Keywords:** nitric oxide; lipid peroxidation; hydroxyl radical.

## INTRODUÇÃO

Oxidação é um dos procedimentos químicos essenciais para a sobrevivência das células, fornecendo energia para os organismos vivos em vários processos metabólicos (ALVES et al., 2010; BOKHARI et al., 2012; SILVA et al., 2012a; SILVA et al., 2012b). O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres gerados por células vivas, como resultado de processos fisiopatológicos e bioquímicos, bem como devido a poluentes ambientais (radiação, produtos químicos e estresse físico). Eventualmente, estas mudanças levam ao surgimento de diversas doenças crônicas, como diabetes, câncer, Alzheimer e Parkinson (ALVES et al., 2010; AGRAWAL et al., 2011; BAGHIANI et al., 2011; BOKHARI et al., 2012; NAGMOTI et al., 2012; SASIKUMAR et al., 2012).

As plantas produzem uma grande variedade de antioxidantes que agem contra o dano celular através da remoção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Nitrogênio (ERNs). Devido à grande variedade da flora medicinal, especialmente a biodiversidade brasileira, muitos estudos estão sendo produzidos sobre a atividade antioxidante exercida pelos compostos naturais em sistemas biológicos (AGRA et al., 2008; SILVA et al., 2012a). Assim, compostos principalmente de fontes naturais capazes de proteger contra danos mediados por EROs têm potencial aplicação na prevenção e/ou cura de doenças (AGRAWAL et al., 2011; NAGMOTI et al., 2012; SASIKUMAR et al., 2012), possuindo certas vantagens, como poucos efeitos colaterais e baixa toxicidade quando comparados a outros antioxidantes sintéticos (SILVA et al., 2012a).

*Platonia Insignis* Mart., mais conhecida como "bacurizeiro", espécie frutífera da família Clusiaceae, é uma planta arbórea tipicamente de clima tropical, cujas áreas de ocorrência abrangem os Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Goiás e Mato Grosso (SOUZA et al., 2001). Apresenta um fruto com polpa rica em constituintes químicos com propriedades antioxidantes, como a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferóis) e o óleo extraído das sementes rico em ácidos graxos insaturados (oléico e linoléico), diterpenos, e benzofenonas preniladas, como a garcinialiptona (GFC), uma molécula com reconhecida atividade antioxidante (COSTA JUNIOR et al., 2011a).

Costa Júnior e colaboradores (2011b), relataram a presença de um par tautomérico de uma benzofenona natural poliisoprenilada denominada garcinialiptona FC, isolada do extrato hexânico das sementes do bacuri e identificadas por métodos espectroscópicos. Estudos prévios relatam para esta substância atividades antioxidante *in vitro* (COSTA-JÚNIOR et al., 2011b) e *in vivo* (COSTA-JÚNIOR et al., 2012), leishmanicida (COSTA-JÚNIOR et al., 2013) e vasorrelaxante (ARCANJO et al., 2014).

Nesse contexto, as diferentes propriedades apresentadas por espécies vegetais, podem ser mais bem exploradas através do emprego de

tecnologias adequadas pela indústria farmacêutica, tais como a complexação de substâncias com moléculas de ciclodextrinas que, especialmente para as moléculas lipofílicas, promove vantagens em possíveis fármacos, pelo incremento de solubilidade, diminuição de interações com alimentos e outros fármacos e aumento da biodisponibilidade (OLIVEIRA et al., 2009; ROCHA, 2012). As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos que foram recentemente reconhecidos como excipientes farmacêuticos úteis, sendo a beta-ciclodextrina ( $\beta$ -CD) mais utilizada pois, além do seu preço razoável, sua cavidade pode hospedar moléculas de massa molecular entre 200 e 800 g/mol, faixa de massa molecular da maioria das moléculas de interesse (JULLIAN et al., 2008; SINGH et al., 2010; WANG et al., 2011)

Diante de tais considerações, e da relevância na utilização de metodologias que proporcionam a melhora da biodisponibilidade dos fármacos, o objetivo do estudo foi a obtenção de complexos de inclusão do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* (EHSB) em beta-ciclodextrina, bem como avaliar a capacidade antioxidante *in vitro* do EHSB e do EHSB: $\beta$ CD em diferentes metodologias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal

O material botânico foi obtido na Central de Abastecimento do Piauí - CEAPI, localizada em Teresina, Piauí - Brasil (latitude -05° 05' 21" e longitude - 42° 48' 07") no período de março de 2012, e a exsiccata foi depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí, Brasil, (número TEPB 27164, aprovado em 16/05/2012).

### 2.2. Extração a partir das sementes de *Platonia insignis* Mart.

As sementes dos frutos foram extraídas e secas em estufa a temperatura de 55 °C e moídas em moinho (Marconi Equipamentos para Laboratórios Ltda., Piracicaba, SP, Brasil). Cerca de 230g do pó seco foram extraídos com hexano (Tédia) em Soxhlet durante 8 horas. O extrato foi concentrado sob vácuo em evaporador rotatório, com rendimento total de 42,98%.

### 2.3. Obtenção dos complexos de inclusão do extrato hexânico: $\beta$ -ciclodextrina

Os complexos de inclusão entre o EHSB e  $\beta$ -CD foram preparados por solubilização seguido por pulverização a seco por *spray-drying*, de acordo com o método descrito por COELHO (2001), com algumas modificações. Foram preparados

complexos nas proporções 1:9; 2:8; 3:7 de EHSB:βCD m/m (g). Para preparar o complexo de inclusão, a massa referente ao extrato foi solubilizado em 20 mL de etanol PA em aquecimento e agitação contínua. A massa referente à β-CD foi solubilizada em 250 mL de uma mistura etanol: água (1:4), sob aquecimento e agitação. Misturou-se as duas soluções, que permaneceram sob agitação e aquecimento de 70 °C durante 35 a 40 minutos. A mistura foi levada à secagem em *spray-dryer* de bancada, BUCHI B-290; com uma pressão de entrada de 0,9 Bar, com um fluxo da amostra de 7 mL min<sup>-1</sup>, temperatura de entrada de 105 °C, temperatura de saída 62 °C e temperatura da amostra de 60 °C.

#### 2.4. Doseamento da GFC nos complexos de inclusão

Para a determinação do teor de GFC nos complexos, uma análise semiquantitativa foi realizada através da obtenção de curva analítica da substância de referência GFC, isolada através de cromatografia em coluna de gel de sílica do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* Mart. e identificada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono e espectrometria de massas (COSTA JÚNIOR et al., 2011b). Para realização da curva, preparou-se uma solução estoque da garcinaliptona na concentração de 0,2 g L<sup>-1</sup> em metanol a partir da qual foi realizada uma série de diluições para obtenção das concentrações de 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 5 mg/L, as quais foram submetidas a leituras da medida de absorbâncias no comprimento de onda (λ máx) 280 nm, de acordo com o espectro de absorção da GFC. Utilizou-se metanol como branco. O gráfico gerado quando foram plotadas as medidas de absorbâncias versus concentrações, por regressão linear apresentou coeficiente de correlação linear R<sup>2</sup> = 0,9999 e a equação A = 0,0214C + 0,1385, onde A é a absorbância em 280 nm e C a concentração.

O doseamento da GFC nos complexos de inclusão foi realizado após retirada do extrato não complexado às moléculas de β-ciclodextrina. Para tanto, foi realizada extração com hexano do material não-complexado. Acrescentou-se 8 mL do solvente, dissolveu-se por alguns segundos no ultra-som, e com um conta-gotas aspirou-se vagarosamente o líquido sobrenadante, realizando-se este procedimento em triplicata para cada complexo, até que restasse apenas extrato complexado. Em seguida, os complexos foram armazenados em dessecador até secagem. Os complexos lavados retirados do dessecador foram dissolvidos em metanol e completou-se o volume para 10 mL. As análises foram realizadas em triplicata, em espectrofotômetro Varian Cary 300 de duplo feixe UV/Vis em 280 nm.

#### 2.5. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do EHSB e do complexo EHSB:βCD contra a peroxidação lipídica (inibição da formação de TBARS)

Utilizou-se a metodologia da determinação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico formando TBARS (GUIMARÃES et al., 2010). Foi avaliado o potencial antioxidante do extrato hexânico da semente do bacuri (EHSB) e seu complexo de inclusão com a ciclodextrina (EHSB:βCD) contra a peroxidação lipídica num meio rico em lipídios. Tal método usou o homogenato da gema de ovo (1%, v/v) em 50 mM de tampão fosfato (pH 7,4) como substrato rico em lipídios. Uma alíquota de 0,5 mL do substrato foi homogeneizada com 0,1 mL do EHSB ou do EHSB:βCD por sonicação em diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 μg mL<sup>-1</sup>). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de AAPH (diidrocloreto de 2,2'-azo-bis-2-metilpropinamida 0,12 M). No controle foi testado apenas o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%). As reações foram realizadas durante 30 minutos a 37°C (GUIMARÃES et al., 2010).

As amostras (0,5 mL) foram centrifugadas com 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) a 1200 rpm por 10 minutos, após o resfriamento. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi misturada com 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecida a 95 °C por 30 minutos. Após resfriamento, a absorvância das amostras foi medida usando um espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de TBARS formada a partir do AAPH apenas (controle induzido). Foi utilizado como droga-padrão o Trolox.

#### 2.6. Avaliação dos efeitos *in vitro* do EHSB e do EHSB:βCD na remoção do radical hidroxila (•OH)

A formação de radical hidroxila (•OH) na reação de Fenton foi quantificada utilizando a degradação oxidativa de 2-desoxirribose (ZARENA e UDAYA SANKAR, 2009). O princípio do teste é a quantificação do produto de degradação de 2-desoxirribose, malonaldeído (MDA), pela sua condensação com ácido 2- tiobarbitúrico (TBA). A reação foi iniciada pela adição de Fe<sup>2+</sup> (FeSO<sub>4</sub> 6 mM) à solução contendo 5 mM de 2-desoxirribose, 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Para medir a atividade antioxidante do EHSB e do EHSB:βCD na remoção do radical hidroxila, diferentes concentrações do EHSB e do EHSB:βCD (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 μg/mL) foram adicionadas ao sistema antes da adição de Fe<sup>2+</sup>. As reações foram realizadas durante 15 minutos em temperatura ambiente, e foram interrompidas pela adição de ácido fosfórico a 4% (v/v) seguido por 1% de TBA (m/v, em NaOH 50 mM).

As soluções foram submetidas a aquecimento por 15 minutos a 95°C e, então, resfriados em temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 532 nm e os resultados foram expressos como equivalentes de MDA formados pelo Fe<sup>2+</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 2.7. Avaliação dos efeitos *in vitro* do EHSB e do

## EHSB:βCD na inibição da produção do radical nítrico (NO<sub>2</sub>•)

Radicais de óxido nítrico foram gerados a partir de solução de nitroprussiato de sódio (NPS) em 20 mM de tampão fosfato (pH 7,4). Por sua vez, o NO• interage com o oxigênio para produzir radicais nitritos, os quais foram medidos pela reação de Griess (FENG et al., 2013).

A mistura da reação (1 mL) contendo 10 mM de NPS em padrão fosfato e EHSB e EHSB:βCD nas diferentes concentrações (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 μg mL<sup>-1</sup>), foi incubada a 37 °C por 1h. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e homogeneizada com 0,5 mL do reagente de Griess. A absorbância do cromóforo foi medida a 540 nm. O percentual de inibição da produção de NO<sub>2</sub>• foi determinado por comparação dos valores de absorbância do controle negativo (apenas NPS 10 mM e veículo) e as preparações das substâncias utilizadas no teste. Os resultados foram expressos como percentagem de radical nítrico formado pelo meio reacional.

### 2.8. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM) e a significância estatística foi determinada pela análise de variância (ANOVA), seguida de t-Student-Neuman-Keuls como post hoc test. Os valores foram considerados estatisticamente significativos a p <0,001. A percentagem de inibição foi determinada a partir da seguinte fórmula: % de inibição = 100 × (controle – experimental / controle).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Realizou-se o processo de complexação do extrato hexânico com a β-CD em diferentes proporções, para que fosse avaliado o complexo com melhor rendimento e que apresentasse melhores características frente aos métodos de caracterização espectroscópicos utilizados, para estudos farmacológicos posteriores. Para avaliar o teor do extrato hexânico complexado, determinou-se o teor de GFC por UV/Vis nos complexos, após a extração com hexano do material não complexado. De acordo com os teores de GFC no EHSB e nos complexos, obteve-se o teor de extrato complexado dispostos na Tabela 1.

Cada CD apresenta capacidade própria para formar complexos de inclusão com moléculas específicas, capacidade essa que depende do ajuste adequado da molécula hóspede na cavidade hidrófoba da CD. A formação dos complexos de inclusão é determinada pelas características das moléculas hóspedes, como a polaridade, o tamanho e a geometria, e devem ser adequadas às características hidrófobas e ao tamanho da cavidade da CD. A formação de complexos é possível com toda a molécula de fármaco ou

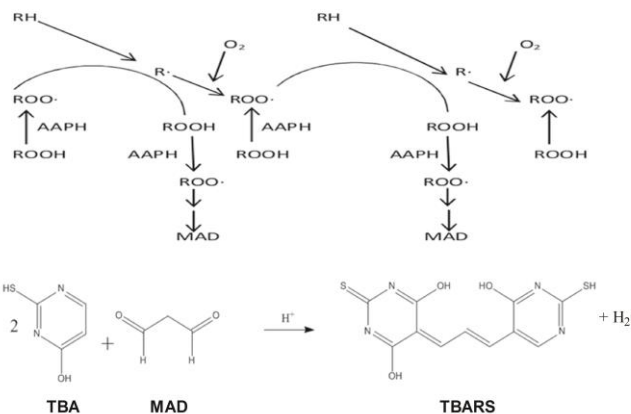
apenas com parte dela (OLIVEIRA et al., 2009).

Na formação dos complexos de inclusão do EHSB em β-CD, obteve-se um maior rendimento de complexação (20,11%) quando foi utilizada uma maior proporção de extrato frente a β-CD (3:7). Por conseguinte, o complexo formado nessa proporção revelou maior teor do marcador GFC no EHSB (5,14 ± 0,01).

No tocante à investigação da atividade antioxidante do extrato hexânico da semente do bacuri (*P. insignis*) e do complexo de inclusão do extrato hexânico e ciclodextrina, deve-se mencionar a presença de substâncias com esta atividade nas sementes da espécie. Investigações sobre a composição química das plantas da família Clusiaceae mostraram que estas são ricas em xantonas, benzofenonas poliiisopreniladas, flavonóides, ácidos fenólicos e lactonas, (ROBERTS, 1961; GOTTLIEB e STEFANI, 1970; FERREIRA et al., 1972; MONACHE et al., 1988; GUSTAFSON et al., 1992; CUESTA-RUBIO et al., 2002; MENNINI e GOBBI, 2004; BAGGETT et al., 2005; PICCINELLI et al., 2009; CHEN et al., 2010), substâncias naturais que despertam grande interesse devido às atividades farmacológicas que apresentam. Xantonas têm sido relatadas por inibir a peroxidação de lipídios (atividade antioxidante), propriedades neuroprotetoras, e também por inibir a síntese de prostaglandina E2, e a protease do HIV 1 (ZARENA e UDAYA SANKAR, 2009).

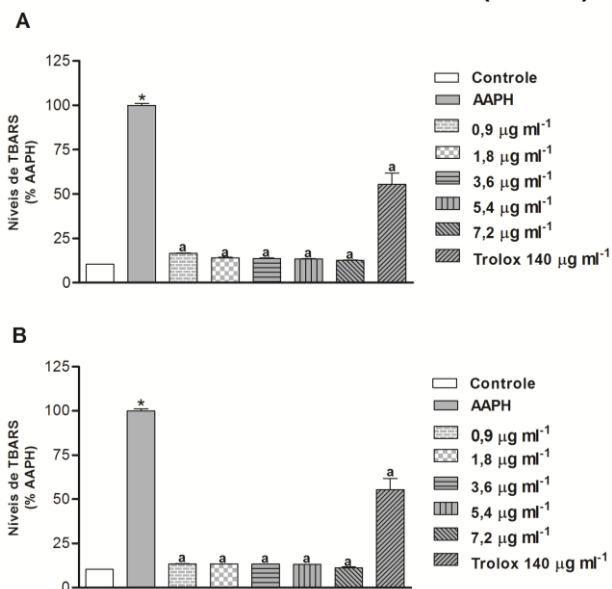
A atividade antioxidante no presente estudo foi inicialmente analisada pela metodologia de inibição da produção de TBARS, utilizada para quantificar a peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica é definida como os danos biológicos causados por radicais livres, que são formados sob o estresse oxidativo (SILVA et al., 2012a). A atividade antioxidante de fontes naturais é devida aos compostos ativos presentes nas plantas. De acordo com Pratt e Hudson (1992), os antioxidantes naturais podem ser encontrados em madeira, casca, caule, folhas, frutos, raízes, flores e sementes. A maioria destes compostos são, normalmente, compostos fenólicos ou polifenólicos na natureza, por exemplo, tocoferóis, flavonóides e derivados de ácido cinâmico, ácidos orgânicos fosfatídicos e outros (HUANG et al., 2005). O AAPH, composto azo hidrossolúvel, é usado como gerador de radicais livres, como por exemplo, peroxila. A formação de TBARS ocorre da reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com produtos da decomposição dos hidroperóxidos, de ácidos graxos insaturados, o malonaldeído, quando se utiliza um gerador de radicais livres como o AAPH (ARAÚJO, 1999; ANTLOVICH et al., 2002), como demonstrado na Figura 1.

**Figura 1 - Formação do TBARS a partir do malonaldeído (Adaptado de Araújo, 1999; Antolovich et al., 2002).**



O extrato hexânico da semente do bacuri e seu complexo de inclusão com a  $\beta$ -ciclodextrina em todas as concentrações testadas, foram capazes de inibir a peroxidação lipídica reduzindo a quantidade de TBARS formado. As concentrações utilizadas de EHSB e EHSB: $\beta$ CD (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) reduziram a produção de TBARS em (83,50%; 85,99%; 86,29%; 86,58% e 87,38%) e (86,5%; 86,63%; 86,65%; 86,83% e 88,84%), respectivamente. Comparativamente ao controle positivo utilizado, o Trolox, análogo sintético do  $\alpha$ -tocoferol, produziu uma inibição de 44,64% na produção de TBARS na concentração de 140  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 2).

**Figura 2 - Efeitos do EHSB (A) e do EHSB: $\beta$ CD (B) contra a produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS).**

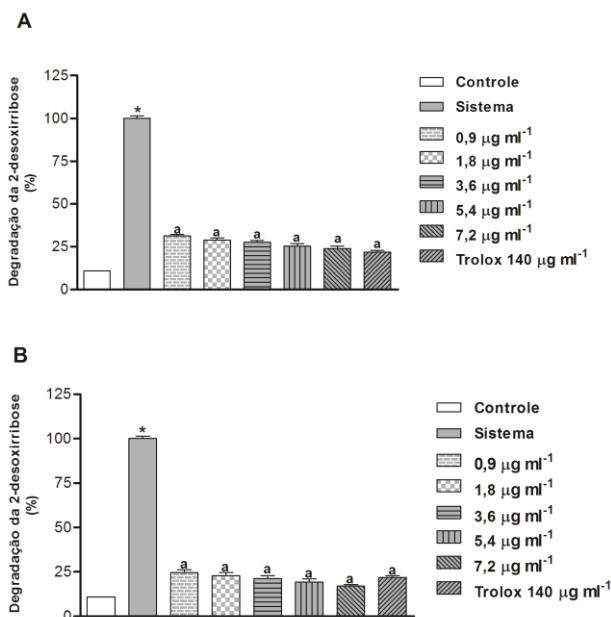


Legenda: Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição,  $n = 5$ , experimentos em duplicata. <sup>a</sup> $p < 0,001$  versus AAPH em relação ao meio AAPH (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como post hoc teste); \* $p < 0,001$  versus AAPH em relação ao controle). O Trolox 0,45 nM foi usado como padrão antioxidante.

Na segunda metodologia utilizada, tanto o extrato hexânico da semente do bacuri quanto seu complexo de inclusão com a  $\beta$ -ciclodextrina, em todas as concentrações testadas, foram capazes de inibir a produção do radical hidroxila. As

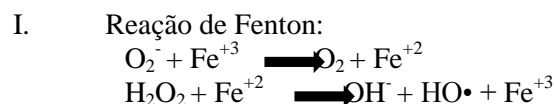
concentrações utilizadas de EHSB e EHSB: $\beta$ CD (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) reduziram a produção de hidroxila em (68,69%; 70,97%; 72,35%; 74,62% e 76,02%) e (75,38%; 77,09%; 78,78%; 80,64% e 83,00%), respectivamente. Comparativamente ao controle positivo utilizado, o Trolox produziu uma inibição de 78,06% na remoção do radical hidroxila (Figura 3).

**Figura 3 - Efeitos do EHSB (A) e do EHSB: $\beta$ CD (B) na remoção do radical hidroxila.**



Legenda: Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*,  $n = 5$ , experimentos em duplicata. <sup>a</sup> $p < 0,001$  versus controle em relação ao sistema (meio reacional) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como post hoc teste); \* $p < 0,001$  versus sistema em relação ao controle). O trolox foi usado como padrão antioxidante.

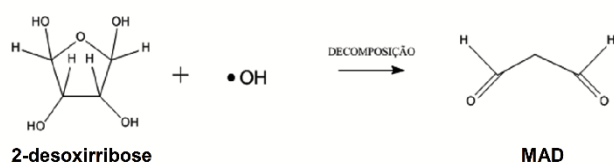
Os radicais hidroxilas são gerados sob condições fisiológicas e patológicas e mantêm a homeostase a nível celular em tecidos normais e saudáveis, estando intimamente ligados a vários modelos de patologias, supostamente implicando estresse oxidativo (CHENG et al., 2002; OGUNRO et al., 2013). O radical hidroxila é gerado pela reação de Fenton, como segue:



Na presença do radical hidroxila, a 2-desoxirribose é degradada à malonaldeído, que posteriormente será quantificado, conforme Fig. 4 (PAYÁ et al., 1992; HUANG et al., 2005; SERAFINI et al., 2011). Por último, o MAD reage com o ácido tiobarbitúrico, formando também TBARS, como ilustrado na Figura 1.

**Figura 4 - Processo reacional de degradação da 2-desoxirribose produzindo malonaldeído (MDA) (Adaptado de Cheng et al., 2002; Silva et al.,**

2012).



O método de inibição de produção do radical nitrito para avaliação da atividade antioxidante também foi utilizado, baseado na produção de NO• a partir da decomposição de nitroprussiato de sódio em solução aquosa (RAMOS et al., 2006). Por sua vez, o radical NO• reage com o oxigênio gerando o radical nitrito, o qual reage com o radical de óxido nítrico e forma-se o anidrido nitroso, um reagente nitrosante (SYKES, 1991). O anidrido nitroso, ao reagir com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico e dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina) a 1% em água, forma um composto diazo de cor violeta, um cromóforo de absorção máxima em 546 nm. Se no meio reacional existirem substâncias antioxidantes, estas vão competir com o oxigênio, e a produção do radical nitrito NO<sub>2</sub>• será reduzida. As reações I, II e III; e a Figura 5 mostram a sequência de produção do cromóforo (RAMOS et al., 2006).

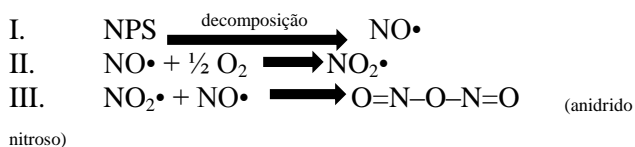
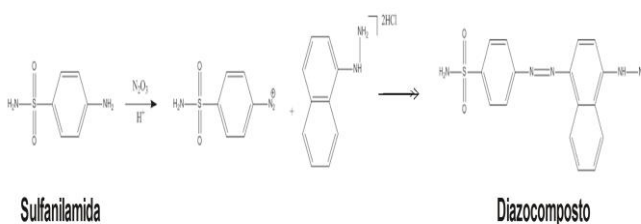
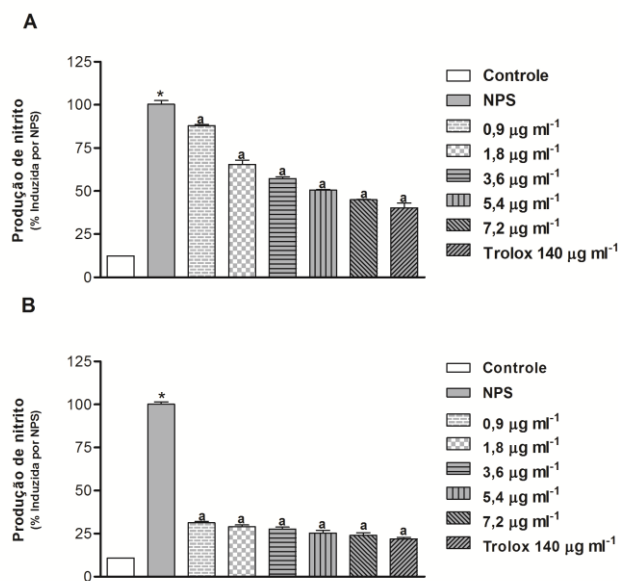


Figura 5 - Mecanismo de reação para determinação do nitrito, segundo método de Griess (Adaptado de RAMOS et al., 2006).



O EHSB e o EHSB:βCD reduziram significativamente a produção de nitrito, quando comparados ao grupo controle, na maior concentração utilizada. As concentrações utilizadas de EHSB e EHSB:βCD (0,9; 1,8; 3,6; 5,4 e 7,2 μg ml<sup>-1</sup>) reduziram a produção de nitrito em (12,08%; 34,62%; 42,77%; 49,47% e 55,01%) e (78,11%; 80,42%; 82,99%; 83,52% e 85,16%), respectivamente. Comparativamente ao controle positivo utilizado, o Trolox produziu uma inibição de 59,76% na produção do metabólito nitrito (Figura 6).

Figura 6 - Efeitos do EHSB (A) e do EHSB:βCD (B) na inibição da produção do radical nitrito.



Legenda: Os valores representam a média ± E.P.M. dos valores de inibição *in vitro*, n = 5, experimentos em duplicata. O trolox foi usado como padrão antioxidante. <sup>a</sup>p<0,001 versus controle em relação ao sistema (meio reacional) (ANOVA e Student-Neuman-Keuls como post hoc teste; \*p<0,001 versus sistema em relação ao controle).

Dessa forma, a atividade antioxidante promovida pelo EHSB:βCD apresenta um aumento significativo da inibição da produção do radical nitrito, em relação ao EHSB, demonstrando que a complexação do EHSB promoveu incremento na atividade, o que não se observou para os outros modelos, onde as atividades não apresentaram uma maior atividade antioxidante *in vitro* para o complexo de inclusão. Entretanto, no complexo a quantidade do EHSB é menor, evidenciando assim uma maior atividade do extrato complexado. Assim, justifica-se a importância da complexação em β-ciclodextrina do EHSB, contribuindo com a diminuição da quantidade do fármaco utilizado, uma vez que a proporção do extrato no complexo de inclusão 3:7 (extrato: CD), é bem inferior à quantidade utilizada do extrato isolado, apresentando atividades iguais ou superiores, com provável diminuição de possíveis efeitos adversos ocasionados pelo fitofármaco.

## CONCLUSÕES

O doseamento do marcador GFC nos complexos de inclusão formados permitiu detectar que um maior rendimento de complexação é obtido quando utiliza-se a proporção 3:7 de EHSB:βCD. Os testes *in vitro* realizados neste estudo demonstram que tanto o EHSB quanto o EHSB:βCD apresentam atividade antioxidante de acordo com as metodologias utilizadas, sendo a atividade antioxidante do complexo superior ao extrato isolado, evidenciando-se a importância da utilização de novos sistemas visando melhorias de

incorporação de ativos nas formas farmacêuticas, como as ciclodextrinas, que, além de reforçar as aplicações farmacêuticas dos fármacos, poderão diminuir possíveis efeitos adversos e aumentar a biodisponibilidade do fármaco.

## AGRADECIMENTOS

À UFPI, FAPEPI, CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS

AGRA, M.D.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.D.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 3, p. 472-508, 2008.

AGRAWAL, S.; KULKARNI, G.T.; SHARMA, V.N. A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts of Terminalia paniculata and Madhuca longifolia. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, n. 4, p. 62-68, 2011.

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

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p. 183-198, 2002.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 2ª Ed. Viçosa: Brasil, 1999.

ARCANJO, D.D.R.; COSTA-JÚNIOR, J.S.; MOURA, L.H.P.; FERRAZ, A.B.F.; ROSSATTO, R.R.; DAVID, J.M.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; OLIVEIRA, R.C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; OLIVEIRA, A.P. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p. 923-927, 2014.

BAGGETT, S.; PROTIVA, P.; MAZZOLA, E.P.; YANG, H.; RESSLER, E.T.; BASILE, M.J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J. Bioactive Benzophenones from Garcinia x anthochymus Fruits. **Journal of natural products**, v. 68, n. 3, p. 354-360, 2005.

BAGHIANI, A.; BOUMERFEG, S.; ADJADJ, M.; AMENI, D.; DJERMOUNI, M.; KHELIFI-TOUHAMI, F.; CHAREF, N.; KHENNOUF, S.; ARRAR, L. Antioxidants, Free Radicals Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Potentials of *Ajuga iva* L. extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1,

n. 4, p. 21-30, 2011.

BOKHARI, J.; KHAN, M.R.; SHABBIR, M.; RASHID, U.; JAN, S.; ZA, J.A. Evaluation of diverse antioxidant activities of Galium aparine. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 102, p. 24-29, 2012.

CHEN, X.Q.; LI, Y.; CHENG, X.; WANG, K.; HE, J.; PAN, Z.H.; LI, M.M.; PENG, L.Y.; XU, G.; ZHAO, Q.S. Polycyclic Polyprenylated Acylphloroglucinols and Chromone O-Glucosides from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 1, p. 196-204, 2010.

CHENG, F.C.; JEN, J.; TSAI, T.H. Hydroxyl radical in living systems and its separation methods. **Journal of chromatography B**, v. 781, n. 1-2, p. 481-496, 2002.

COELHO, L. N. **Estudo da inclusão de filtros solares em ciclodextrinas e suas aplicações em dermocosmética**. 2001. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Farmácia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2001.

COSTA JÚNIOR JS, ALMEIDA AAC, COSTA JP, CITÓ AMGL, SAFFI J, FREITAS RM. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *Platonia insignis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 4, p. 453-457, 2012.

COSTA JÚNIOR JS, ALMEIDA AAC, FERRAZ ABF, ROSSATTO RR, SILVA TG, SILVA PB, MILITÃO GC, CITÓ AMGL, SANTANA LCLR, CARVALHO FAA, FREITAS RM. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4-5, p. 470-474, 2013.

COSTA JÚNIOR, J.S.; DE ALMEIDA, A.A.C.; TOMÉ, A.D.R.; CITÓ, A.M.G.L.; SAFFI, J.; FREITAS, R.M. Evaluation of possible antioxidant and anticonvulsant effects of the ethyl acetate fraction from *Platonia insignis* Mart.(Bacuri) on epilepsy models. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 4, p. 678-684, 2011a.

COSTA JÚNIOR, J.S.; FERRAZ, A.B.F.; FILHO, B.A.B.; FEITOSA, C.M.; CITÓ, A.M.G.L.; FREITAS, R.M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidant effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 2, p. 293-299, 2011b.

CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B.A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis; biological activity of nemorosone.

- Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, p. 372-378, 2002.
- FENG, S.; ZHANG, M.; HUANG, Y.; YUAN, D.; ZHU, Y. Simultaneous determination of nanomolar nitrite and nitrate in seawater using reverse flow injection analysis coupled with a long path length liquid waveguide capillary cell. **Talanta**, v. 117, p. 456-462, 2013.
- FERREIRA, G.A.L.; GOTTLIEB, O.R.; MESQUITA, A.A. Xanthones from a *Kielmeyera* species. **Phytochemistry**, v. 11, n. 4, p. 1512-1513, 1972.
- FILIK, H.; GIRAY, D.; CEYLAN, B.; APAK, R. 2011. A novel fiber optic spectrophotometric determination of nitrite using Safranin O and cloud point extraction. **Talanta**, v. 85, n. 4, p.1818-1824, 2011.
- GOTTLIEB, O.R.; STEFANI, G.M. Xanthones from *Kielmeyera excels.* **Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 453-454, 1970.
- GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.F.; ARAÚJO, A.A.S.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 107, n. 6, p. 949-957, 2010.
- GUSTAFSON, K.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G.; FULLER, R.W.; MCKEE, T.C.; CARDELLINA II, J.H.; MCMAHON, J.B.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphoniaglobulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, n. 46, p. 10093-10102, 1992.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- JULLIAN C, MORALES-MONTECINOS J, ZAPATA-TORRES G, AGUILERA B, RODRIGUEZ J, ARANC V, OLEA-AZARB C. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 5078-5084, 2008.
- MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Science**, v. 75, n. 9, p. 1021-1027, 2004.
- MONACHE, F.D.; MONACHE, G.D.; MOURA PINHEIRO, R.; RADICS, L. Nemorosonol, a derivative of tricyclo-[4.3.1.0<sup>3,7</sup>]-Decane-7-hydroxy-2, 9-dione from *Clusia nemorosa*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2305-2308, 1988.
- NAGMOTI, D.M.; KHATRI, D.K.; JUVEKAR, P.R.; JUVEKAR, A.R. Antioxidant activity free radical-scavenging potential of *Pithecellobium dulce* Benth seed extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n 2, p. 37-43, 2012.
- OGUNRO, P.S.; EEGUNRANTI, B.A.; ATIBA, A.S.; OKE. O.E.; AKANDE, J.O. Status of antioxidant defense and lipid peroxidation in schizophrenics with positive, negative and cognitive symptoms. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 20-24, 2013.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 6, p. 70-83, 2009.
- PAYÁ, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R.S. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 2, p. 205-214, 1992.
- PICCINELLI, A.L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLI, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n.9, p. 1688-1698, 2009.
- PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. 1990. Natural antioxidants not exploited commercially. In: (Ed.). **Food antioxidants: Springer**, p. 171-191, 1990.
- RAMOS, L.A.; CAVALHEIRO, C.C.S.; CAVALHEIRO, E.T.G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114- 1120, 2006.
- ROBERTS, J.C. Naturally Occurring Xanthones. **Chemical reviews**, v. 61, n. 6, p. 591-605, 1961.
- ROCHA, M.S. Estudo do encapsulamento do óleo essencial de *Lantana camara* L. em  $\beta$ -ciclodextrina por métodos espectroscópicos e cromatográficos. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2012.
- SASIKUMAR, J.M.; PATHARA, J.J.; ADITHYA, E.S.; CHRISTABEL, P.H.; SHAMNA, R. Antioxidant capacity and phenolic content of *Elaeagnus kologa* schlecht. an underexploited fruit from India. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 28-35, 2012.
- SERAFINI, M.R.; SANTOS, R.C.; GUIMARÃES,



A.G.; DOS SANTOS, J.P.A.; DA CONCEIÇÃO SANTOS, A.D.; ALVES, I.A.; GELAIN, D.P.; DE LIMA NOGUEIRA, P.C.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; BONJARDIM, L.R. 2011. *Morinda citrifolia* Linn leaf extract possesses antioxidant activities and reduces nociceptive behavior and leukocyte migration. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 10, p. 1159-1166, 2011.

SILVA, O.A.; ALMEIDA A.A.C.; CARVALHO, R.B.F.; NETO, J.D.N.; SOUSA, D.P.; FREITAS R.M. Potencial antioxidante in vitro do (-)- $\alpha$ -terpineol. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 140-152, 2012a.

SILVA, O.A.; DE OLIVEIRA, F.R.D.A.M.; LIMA, T.C.; DE SOUSA, D.P.; DE SOUZA, A.A.; DE FREITAS, R.M. Evaluation of the antioxidant effects in vitro of the isopulegone. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 50-55, 2012b.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S.N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion

Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SOUZA, V.A.B.D.; ARAÚJO, E.C.E.; VASCONCELOS, L.F.L.; LIMA, P.S.D.C. Variabilidade de características físicas e químicas de frutos de germoplasma de bacuri da Região Meio-Norte do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 3, p. 677-683, 2001.

WANG, J.; CAO, Y.; SUN, B.; WANG, C. Physicochemical and release characterisation of garlic oil- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1680-1685, 2011.

ZARENA, A.S.; UDAYA SANKAR, K. Supercritical carbon dioxide extraction of xanthenes with antioxidant activity from *Garcinia mangostana*: Characterization by HPLC/LC-ESI-MS. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 49, n. 3, p. 330-337, 2009

**Tabela 1 - Rendimento de complexação do EHSB em  $\beta$ -ciclodextrina por solubilização seguida por pulverização a seco por spray-drying e através da determinação do teor do marcador GFC no extrato e nos complexos, por espectroscopia de UV/Vis.**

Proporção EHSB: $\beta$ CD m/m (g)	Rendimento de complexação por secagem (%)	Teor de GFC no EHSB (%)	Teor de GFC no complexo lavado (%)	Rendimento de complexação por teor de GFC (%)
1:9	5,51	7,71 $\pm$ 0,47	1,26 $\pm$ 0,01	16,34
2:8	21,46	7,71 $\pm$ 0,47	1,05 $\pm$ 0,01	13,62
3:7	20,11	7,71 $\pm$ 0,47	5,14 $\pm$ 0,01	66,70