

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO**

Simone Rocha de Oliveira

**Potencial antioxidante e efeito de preparações fitoterápicas de *Cordia salicifolia* sobre adipocinas**

UBERABA

2020

Simone Rocha de Oliveira

**Potencial antioxidante e efeito de preparações fitoterápicas de *Cordia salicifolia* sobre adipocinas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine.

UBERABA

2020

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

O51p Oliveira, Simone Rocha de  
Potencial antioxidante e efeito de preparações fitoterápicas de *Cordia salicifolia* sobre a adipocinas / Simone Rocha de Oliveira. -- 2020.  
64 p. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) --  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2020  
Orientadora: Profa. Dra. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine

1. Plantas. 2. Antioxidantes. 3. Fenóis. 4. Interleucina-6. 5. Interleucina-10. 6. Perda de Peso. I. Vicentine, Karina Ferrazzoli Devienne. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 615.25

**SIMONE ROCHA DE OLIVEIRA**

**Potencial antioxidante e efeito de preparações fitoterápicas de *Cordia salicifolia* sobre adipocinas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração - Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Uberaba-MG, 4 de dezembro de 2020

**Banca Examinadora:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine – Orientadora  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Acrani  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Barbosa Borges Jardim  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro



Documento assinado eletronicamente por **SIMONE ACRANI, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 17:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **KARINA FERRAZZOLI DEVIENNE VICENTINE, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 18:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **FERNANDA BARBOSA BORGES JARDIM, Usuário Externo**, em 07/12/2020, às 12:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROGERIO VALENTIM GELAMO, Professor do Magistério Superior**, em 07/12/2020, às 13:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#) e no art. 14 da [Resolução nº 34, de 28 de dezembro de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufcm.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufcm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0444441** e o código CRC **5A1E33F3**.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre me apoiaram e me ensinaram como a fé em Deus pode nos ajudar a superar todas as coisas. Às minhas irmãs Sandra e Solange, pela amizade e companheirismo sempre. Ao meu namorado e amigo Washington, que sempre esteve presente e me apoiando nessa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Desejo expressar todo meu carinho e gratidão a todos aqueles que caminharam ao meu lado e fizeram parte dessa jornada. Cada um de vocês foram de extrema importância para que essa conquista fosse alcançada.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Professora Dra. Karina Ferrazzoli Devienne Vicentine, que meu deu a oportunidade de estudar, aprender, crescer e evoluir durante o desenvolvimento desse projeto. Obrigada pelo empenho, paciência e dedicação. Obrigada por me ensinar a riqueza dos detalhes e por ter confiado em minha capacidade para concluir esse trabalho.

Agradeço ao Professor Dr. Carlo José Freire de Oliveira, que se disponibilizou e viabilizou a realização de parte dos experimentos e às Professoras Dras. Simone Acrani e Patrícia Andressa de Almeida Buranello, pelas contribuições para a elaboração final deste trabalho.

Agradeço a todos colegas de laboratório. Em especial à Me. Malu Mateus Santos e ao Dr. Douglas Micheli pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Agradeço à Látia Monteiro, que além de companheira de bancada se tornou uma grande amiga. Obrigada pelas conversas, pela companhia, pela amizade.

Agradeço à Universidade Federal do Triângulo Mineiro por todo apoio e suporte oferecido.

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



## RESUMO

A *Cordia salicifolia*, também conhecida como porangaba, é uma planta de uso popular indicada para diferentes finalidades terapêuticas, dentre elas para redução de peso corpóreo. Sabe-se que o sobrepeso e a obesidade são condições multifatoriais que cursam com o desenvolvimento do estresse oxidativo e de um estado de inflamação crônica de baixa intensidade. Considerando o uso popular de *C. salicifolia* para redução de peso, objetivamos avaliar o potencial antioxidante e o efeito de extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) preparados a partir das folhas e talos de porangaba sobre citocinas envolvidas no processo inflamatório e correlacionadas com a obesidade. Adicionalmente, avaliamos o efeito dessas preparações fitoterápicas sobre a viabilidade celular *in vitro* e determinamos a composição fitoquímica dos extratos, a fim de observar a relação entre constituintes fitoquímicos e efeitos biológicos. Os resultados demonstraram que os extratos possuem potencial antioxidante e capacidade de sequestrar as espécies reativas NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radical •OH, sendo o extrato aquoso EA mais eficiente para essa ação em relação ao EE. Tais efeitos podem estar relacionados aos constituintes fitoquímicos e às quantidades presentes nos extratos. Ambos os extratos possuem substâncias fenólicas na sua composição, sendo verificado que o EA possui quantidades maiores em relação ao EE. Tal resultado pode ser decorrente de maiores teores de flavonóis e flavonas determinados no EA. A viabilidade de células McCoy foi, significativamente, diminuída por 0,5 mg mL<sup>-1</sup> de EA e 0,02 mg mL<sup>-1</sup> de EE, enquanto em macrófagos, foi observada redução de viabilidade em 1 mg mL<sup>-1</sup> e 0,02 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, demonstrando que o EE apresenta maior citotoxicidade. Em concentrações que mantiveram 90% de viabilidade, foi verificada a capacidade do EE em estimular a produção de interleucina-10 (IL-10) por macrófagos murinos, enquanto o EA induziu a um aumento de interleucina-6 (IL-6). Não foi detectada a produção de TNF-α por macrófagos tratados com os extratos avaliados. Apesar da IL-6 ser considerada uma citocina pró-inflamatória e, em quadros de obesidade estar aumentada contribuindo para o estresse oxidativo e quadro inflamatório, estudos relataram que, em pessoas não obesas, essa adipocina possui capacidade lipolítica e desempenha um efeito antiobesidade. Nesse contexto e diante dos resultados obtidos, acreditamos que a utilização empírica do chá de folhas de *C. salicifolia*, pela população, com finalidade de redução de peso corpóreo parece estar adequada e pode minimizar os efeitos deletérios provocados pelo acúmulo de gordura no organismo.

**Palavras-chave:** *Cordia salicifolia*, antioxidante, compostos fenólicos, interleucina-6, interleucina-10, redução ponderal.

## ABSTRACT

*Cordia salicifolia*, also known as porangaba, is a popular plant suitable for different therapeutic purposes, among them to reduce body weight. It is known that overweight and obesity are multifactorial conditions that lead to the development of oxidative stress and a state of low intensity chronic inflammation. Considering the popular use of *C. salicifolia* for weight reduction, we aim to evaluate the antioxidant potential and the effect of aqueous (EA) and ethanolic (EE) extracts prepared from porangaba leaves and stems on cytokines involved in the inflammatory process and correlated with obesity. Additionally, we evaluated the effect of these herbal preparations on cell viability in vitro and determined the phytochemical composition of the extracts, in order to observe the relationship between phytochemical constituents and biological effects. The results demonstrated that the extracts have antioxidant potential and the ability to sequester the reactive species NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and radical •OH, being the aqueous extract EA more efficient for this action in relation to EE. Such effects may be related to phytochemical constituents and the amounts present in the extracts. Both extracts have phenolic substances in their composition, being verified that the EA has larger amounts in relation to the EE. This result may be due to higher levels of flavonols and flavones determined in the EA. The viability of McCoy cells was significantly decreased by 0.5 mg mL<sup>-1</sup> of EA and 0.02 mg mL<sup>-1</sup> of EE, while in macrophages, a reduction in viability of 1 mg mL<sup>-1</sup> and 0.02 was observed mg mL<sup>-1</sup>, respectively, demonstrating that EE has greater cytotoxicity. At concentrations that maintained 90% viability, the ability of EE to stimulate the production of interleukin-10 (IL-10) by murine macrophages was verified, while EA induced an increase in interleukin-6 (IL-6). The production of TNF-α by macrophages treated with the evaluated extracts was not detected. Although IL-6 is considered a pro-inflammatory cytokine and, in cases of obesity being increased, contributing to oxidative stress and inflammation, studies have reported that, in non-obese people, this adipokine has a lipolytic capacity and has an anti-obesity effect. In this context and in view of the results obtained, we believe that the empirical use of *C. salicifolia* leaf tea, by the population, in order to reduce body weight seems to be adequate and can minimize the deleterious effects caused by the accumulation of fat in the body.

**Keywords:** *Cordia salicifolia*, antioxidant, phenolic compounds, interleukin-6, interleukin-10, weight reduction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Moléculas e células envolvidas na disfunção do tecido adiposo na obesidade.....	18
Figura 2 - Desequilíbrio na quantidade de agentes antioxidantes e espécies reativas de oxigênio que podem levar ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (ERO).....	19
Figura 3 - Relação entre obesidade, estresse oxidativo e inflamação. Tecido adiposo branco (TAB), Interleucina (IL), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	20
Figura 4 - Características física de <i>C. salicifolia</i> (porangaba).....	21
Figura 5 - Análise qualitativa da presença de alcaloides em extrato etanólico (EE) e aquoso (EA) de <i>C. salicifolia</i> .....	39
Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de <i>C. salicifolia</i> na redução do radical livre DPPH.....	40
Figura 7 - Percentual de sequestro do radical hidroxil ( $\bullet$ OH) por diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de <i>C. salicifolia</i> . ....	41
Figura 8 - Percentual de sequestro do peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) por diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de <i>C. salicifolia</i> .....	42
Figura 9 - Percentual de sequestro do óxido nítrico (NO) por diferentes concentrações de extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de <i>C. salicifolia</i> .....	42
Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações dos extratos de <i>C. salicifolia</i> sobre a viabilidade celular.....	43
Figura 11 - Níveis de citocinas detectadas após tratamento de macrófagos RAW 264-7 com extratos de <i>C. salicifolia</i> .....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de fenóis totais, taninos, flavonol e flavonas e flavanonas presentes nos extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) obtidos de folhas de <i>C. salicifolia</i> .....	39
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Microgramas

µL – Microlitros

AA – Atividade Antioxidante

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

2,4-DF – (2,4-) dinitrofenilhidrazina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 1,1 – difenil-2-picril-hidrazila

EA – Extrato aquoso

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

EAT – Equivalente de Ácido Tânico

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* / Ácido etilenodiamino tetra-acético

EE – Extrato Etanólico

EN – Equivalente de Naringin

EQ – Equivalente de Quercetina

ERNS – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

g – Grama

G – Força G

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

L – Litro

LPS – Lipopolissacarídeo

mL – Mililitro

M – Molar

mM – milimolar

NPS – Nitroprussiato de sódio

N – Normal

p – Probabilidade de Significância

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – rotações por minuto

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

TAB – Tecido adiposo branco

UFTM – Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VIGITEL – Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

VN – Vermelho Neutro

v/v – Volume/Volume

WHO – *World Health Organization* / Organização Mundial da Saúde.

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Grau Celsius

® – Marca Registrada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	26
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	27
3.2	PREPARAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS DE <i>Cordia salicifolia</i> .....	27
3.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	27
<b>3.3.1</b>	<b>Identificação e quantificação de fenóis totais</b> .....	27
3.3.1.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	27
3.3.1.2	<i>Procedimento</i> .....	27
<b>3.3.2</b>	<b>Identificação e quantificação de taninos</b> .....	28
3.3.2.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	28
3.3.2.2	<i>Procedimento</i> .....	28
<b>3.3.3</b>	<b>Quantificação de flavonóis e flavonas</b> .....	29
3.3.3.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	29
3.3.3.2	<i>Procedimento</i> .....	29
<b>3.3.4</b>	<b>Quantificação de flavanonas</b> .....	29
3.3.4.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	29
3.3.4.2	<i>Procedimento</i> .....	30
<b>3.3.5</b>	<b>Análise qualitativa para alcaloides</b> .....	30
3.3.5.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	30
3.3.5.2	<i>Procedimento</i> .....	31
3.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	31
<b>3.4.1</b>	<b>Teste do DPPH (1,1 – difenil-2-picril-hidrazila)</b> .....	31
3.4.1.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	31
3.4.1.2	<i>Procedimento</i> .....	31
<b>3.4.2</b>	<b>Identificação da espécie reativa sequestrada</b> .....	32
3.4.2.1	<i>Sequestro do radical hidroxil (<math>\bullet\text{OH}</math>)</i> .....	32
3.4.2.1.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	32
3.4.2.1.2	<i>Procedimento</i> .....	32
3.4.2.2	<i>Sequestro do peróxido de hidrogênio (<math>\text{H}_2\text{O}_2</math>)</i> .....	33
3.4.2.2.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	33
3.4.2.2.2	<i>Procedimento</i> .....	33
3.4.2.3	<i>Sequestro do óxido nítrico (NO)</i> .....	33

3.4.2.3.1	Soluções e reagentes.....	33
3.4.2.3.2	Procedimento.....	34
3.5	TESTES BIOLÓGICOS <i>in vitro</i> .....	34
<b>3.5.1</b>	<b>Citotoxicidade em células McCoy e macrófagos RAW 264.7</b> .....	<b>34</b>
3.5.1.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	34
3.5.1.2	<i>Procedimento</i> .....	35
<b>3.5.2</b>	<b>Produção de citocinas</b> .....	<b>35</b>
3.5.2.1	<i>Soluções e reagentes</i> .....	35
3.5.2.2	<i>Procedimento</i> .....	36
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	38
4.2	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	38
4.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	39
4.4	TESTES BIOLÓGICOS <i>in vitro</i> .....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>54</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
	<b>ANEXO I - Laudo de identificação da espécie vegetal</b> .....	<b>63</b>
	<b>ANEXO II - Curvas padrão utilizadas para obter os resultados do <i>screening</i> fitoquímico</b> .....	<b>64</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

---

---

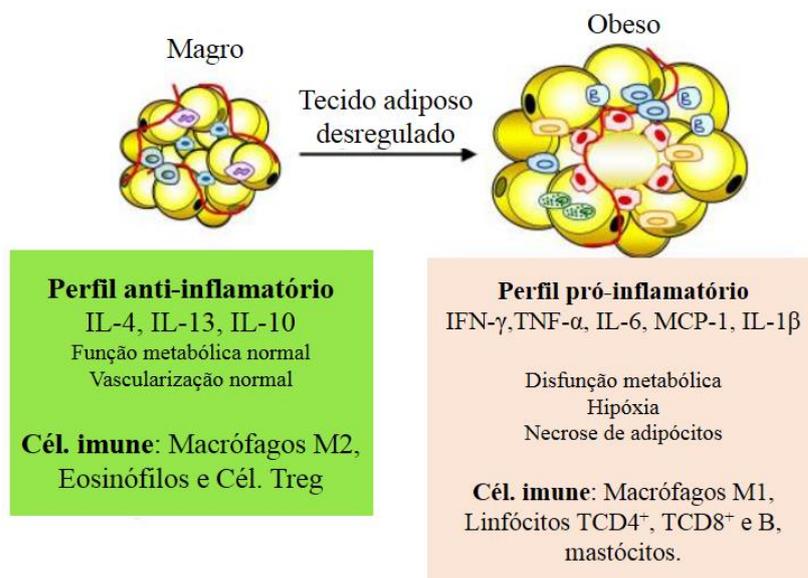
A obesidade tem acometido cada vez mais pessoas, se tornando uma pandemia entre os adultos e um problema de saúde global (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020). No Brasil, a realidade não é diferente, mesmo tendo-se observado uma mudança positiva nos hábitos alimentares e aumento na prática de atividade física dos brasileiros (VIGITEL, 2016). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020), a proporção de indivíduos adultos obesos mais que dobrou em 20 anos, chegando a 26,8% da população em 2019. Essa proporção é ainda maior quando se analisa o número de indivíduos com sobrepeso, que atingiu 61,7% dos brasileiros neste mesmo ano (IBGE, 2020). Acredita-se que esse crescimento no número de pessoas com excesso de peso possui estreita relação com o aumento da incidência de outras doenças crônicas (VIGITEL, 2016). Dentre os principais fatores relacionados que levam a obesidade, podemos destacar os maus hábitos alimentares e a falta de atividade física regular (WHO, 2020).

O sobrepeso e a obesidade são definidos como acúmulo excessivo de gordura corporal que leva a prejuízos na saúde. Para determiná-los, são utilizados o índice de massa corporal (IMC), sendo o sobrepeso indicado pelo  $IMC > 25 \text{ Kg/m}^2$  e a obesidade indicada pelo  $IMC \geq 30 \text{ Kg/m}^2$ , além da medida de circunferência da cintura que também é fortemente indicada para determinar o risco de desenvolvimento de doenças cardiometabólicas (ROSS *et al.*, 2020; WHO, 2020). Atualmente, tem sido bem aceito que o desenvolvimento da obesidade está relacionado com o ambiente e o estilo de vida, bem como fatores genéticos que predisõem à susceptibilidade (MANNA; JAIN, 2015; GADDE *et al.*, 2018). É uma doença de fisiopatologia complexa e que envolve o desenvolvimento de muitas comorbidades, como doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios musculoesqueléticos e alguns cânceres. Além disso, o acúmulo de gordura corporal, em indivíduos obesos, promove uma disfunção do tecido adiposo modificando o padrão de moléculas liberadas e desencadeando um quadro de inflamação crônica e sistêmica, resultando no desenvolvimento de estresse oxidativo, resistência à insulina, síndrome metabólica e outras doenças relacionadas (ANDERSEN; MURPHY; FERNANDEZ, 2016; GUZIK *et al.*, 2017; CLIFTON, 2019).

O tecido adiposo é um órgão endócrino responsável pela produção de adipocinas, substâncias bioativas que possuem funções regulatórias e sinalizadoras. Dentre essas adipocinas, podemos destacar as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral - alfa (TNF- $\alpha$ ), que são capazes de estimular macrófagos e monócitos a produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). A leptina é outra importante adipocina que está relacionada ao metabolismo do tecido

adiposo e ao controle do apetite, além de atuar na resposta inflamatória induzindo atividade fagocítica de macrófagos e produção de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a adiponectina é uma adipocina que reduz a produção de EROs, bem como, promove ações antiaterogênica e anti-inflamatória, pois inibe a expressão de moléculas de adesão endotelial, além de inibir a produção de TNF- $\alpha$  e outros mediadores pró-inflamatórios (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011; BILSKI *et al.*, 2019). A disfunção do tecido adiposo provoca mudanças no perfil das células e moléculas, de modo que elas tendem a adquirir características de um estado inflamatório crônico de baixa intensidade (Figura 1) (MANNA; JAIN, 2015).

Figura 1 - Moléculas e células envolvidas na disfunção do tecido adiposo na obesidade. Interleucina (IL), Células T reguladoras (Cél. Treg), Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), Proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1).

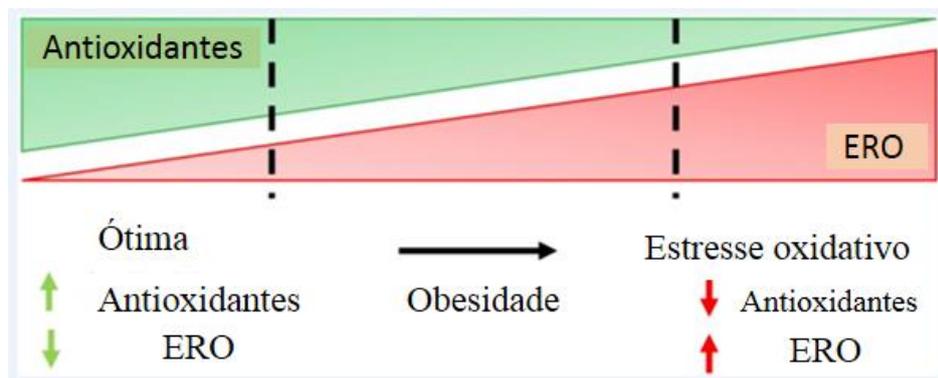


Fonte: Adaptado de CATALÁN *et al.*, 2013.

A inflamação crônica que cursa com a obesidade, promove a produção contínua de EROs e ERNs, sendo as adipocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  capazes de aumentar a atividade da NADPH oxidase e a produção de O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (ânion superóxido). Assim, uma resposta inflamatória crônica culmina em excesso de liberação de espécies reativas que podem, ao invés de impedir, induzir dano tecidual e estresse oxidativo local ou generalizado (MANNA; JAIN, 2015; BISWAS *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que em situações de sobrepeso e obesidade ocorre a ativação de vias intracelulares de produção de EROs e ERNs, contribuindo para o desenvolvimento do estresse oxidativo (MANNA; JAIN, 2015).

O estresse oxidativo é um processo que decorre do desbalanço entre produção e eliminação de EROs e ERNs causando interrupção da sinalização e do controle redox (Figura 2) (BISWAS *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2020). Nesse processo, altas concentrações de espécies reativas livres no organismo levam a destruição de proteínas, lipídios e DNA, geram um estado de inflamação, além de contribuir para o agravamento de diversas patologias sendo a obesidade uma delas. As evidências sugerem que EROs também contribuam para o aumento do tecido adiposo por atuarem na adipogênese nas etapas de proliferação de pré-adipócitos e diferenciação desses em adipócitos maduros, bem como, estimulam deposição de tecido adiposo branco (TAB) (MANNA; JAIN, 2015; RANI; *et al.*, 2016). Ainda, foi demonstrado que EROs podem inibir a adiponectina produzida pelo tecido adiposo, efeito que resulta em resistência à insulina pelos adipócitos, redução da ação anti-inflamatória e aumento da circulação de ácidos graxos livres, os quais podem ser oxidados e gerar mais espécies radicalares. Além disso, as EROs podem regular de forma negativa a expressão de enzimas do sistema de defesa antioxidante, piorando cada vez mais o quadro de estresse oxidativo (FURUKAWA *et al.*, 2004; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

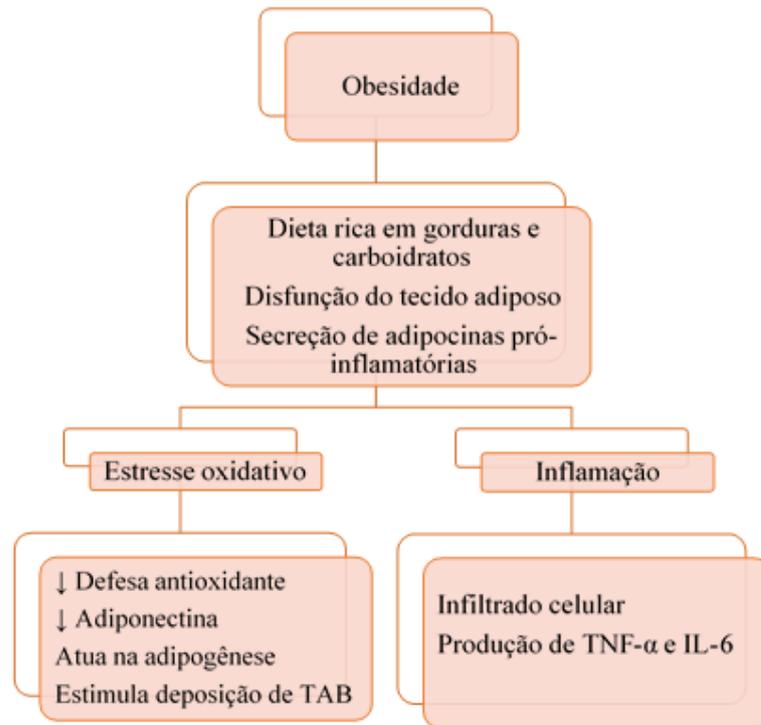
Figura 2 - Desequilíbrio na quantidade de agentes antioxidantes e espécies reativas de oxigênio que podem levar ao desenvolvimento do estresse oxidativo. Espécies reativas de oxigênio (ERO).



Fonte: Adaptado de Masschelin *et al.*, 2020.

A ativação de vias intracelulares de produção de EROs e ERNs, através das vias de fosforilação oxidativa nas mitocôndrias e da ativação da enzima NADPH oxidase, provocando alteração do metabolismo do oxigênio, foi observada em indivíduos obesos, os quais geralmente ingerem dieta hipercalórica rica em gorduras e carboidratos. Além disso, o excesso de peso corporal leva a um aumento da carga mecânica, elevando o consumo de oxigênio e gerando mais espécies radicalares (Figura 3) (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2011).

Figura 3 - Relação entre obesidade, estresse oxidativo e inflamação. Tecido adiposo branco (TAB), Interleucina (IL), Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Considerando os problemas de saúde associados à obesidade, muitas vezes, é fundamental a intervenção terapêutica para que a recuperação seja adequada. Nesse sentido, a farmacoterapia é uma grande aliada às práticas não farmacológicas, como a reeducação alimentar e a prática de exercícios físicos, de modo que é utilizada, principalmente, quando houver falhas no resultado das mesmas. Assim, o desenvolvimento de medicamentos de baixo custo e acessíveis para a população são de grande importância para garantir eficácia no tratamento, bem como, promover uma melhora na qualidade de vida do paciente (COSTA; DUARTE, 2017).

Nas últimas décadas, tem sido relatada a grande capacidade das plantas em promover efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, ações benéficas que, geralmente, estão associadas à presença de polifenóis, alcaloides e terpenoides, metabólitos secundários, amplamente conhecidos por exercerem atividades biológicas terapêuticas (GAUTAM; JACHAK, 2009; WANG *et al.*, 2013). Dessa forma, a fitoterapia tem cada vez mais ganhado espaço como alternativa aos tratamentos farmacológicos convencionais. O uso empírico das plantas medicinais, aliado à descoberta e comprovação científica das potencialidades farmacológicas

de várias espécies, tem incentivado e impulsionado as pesquisas na área da farmacognosia. Nesse sentido, o Brasil, com sua rica biodiversidade, compõe um importante cenário para o estudo de espécies vegetais utilizadas com finalidades farmacológicas, nutricionais e cosméticas (FIORAVANTI, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

Dentre as espécies vegetais de uso tradicional, na região do Cerrado em Minas Gerais, está a *Cordia salicifolia* (sinonímia *Cordia ecalyculata*) (FREITAS *et al.*, 2013; OZA; KULKARNI, 2017), popularmente chamada de porangaba, chá de bugre, bugrinho ou café do mato (CRUZ, 1995; FRYDMAN *et al.*, 2008). *C. salicifolia* é uma espécie de porte arbóreo que pode atingir até 20m de altura, seu tronco varia em torno dos 30 cm de diâmetro (Figura 4A), os ramos possuem folhas, frutos e flores (Figura 4B - C). As folhas apresentam-se, predominantemente, de formas lanceoladas ou ablongolanceoladas de ápice acuminado e margens lisas. Ainda, as folhas possuem uma nervura central mediana bem evidente na face dorsal e ventral, da qual emerge em aproximadamente 60° as nervuras secundárias que são menos evidentes. O pecíolo, que prende a folha ao ramo, tem comprimento de 1 a 2cm. O fruto possui forma que varia de subcônica a globosa, com presença de arestas longitudinais (Figura 4D) (SAITO, 1984).

Figura 4 - Características física de *C. salicifolia* (porangaba). A – Arbusto, B – flores, C – folhas, D – frutos.





Fonte: Floradigital.UFSC.br, 2020.

Na medicina popular, essa planta é utilizada principalmente na forma de chá e tinturas para auxiliar a perda de peso. A infusão das folhas também é indicada para diurese, como inibidor de apetite e para redução de gordura localizada e celulite (TAYLOR, 2005; SILVA; BASTOS; TAKAHASHI, 2010; FARMA, 2020). Em outros países, é usada para alívio da tosse, regulação da função renal, redução do ácido úrico e para cicatrização de feridas externas (TAYLOR, 2005). Estudos científicos mostraram o efeito do extrato etanólico contra vírus herpes simples tipo I (HAYASHI *et al.*, 1990), atividade inibitória do extrato diclorometano sobre *Helicobacter pylori* (MENGHINI *et al.*, 2008) e do extrato bruto e frações sobre *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans* (ASSONUMA, 2009).

A atividade hipolipidêmica do extrato etanólico das folhas de *C. salicifolia*, com redução dos níveis séricos de colesterol e triglicérides, foi demonstrada por Cardozo *et al.* (2008) e, resultado semelhante, foi verificado por Siqueira *et al.* (2006) com o uso de extrato aquoso das folhas de *C. salicifolia* em modelos experimentais de hipertrigliceridemia. Alguns pesquisadores avaliaram o efeito de extratos aquosos e hidroetanólico de *C. ecalyculata* na redução de peso corpóreo, mas os resultados ainda são controversos (CAPARROZ-ASSEF *et al.*, 2005; SIQUEIRA *et al.*, 2006; SILVA, BASTOS, TAKAHASHI, 2010; ARALDI *et al.*, 2014; SANTOS, 2014).

Atualmente, a íntima e importante relação entre propriedade farmacológica e composição química de extratos e preparações fitoterápicas é amplamente conhecida. Apesar das atividades biológicas descritas da *C. salicifolia*, poucos são os dados na literatura sobre sua constituição fitoquímica, sendo relatada a presença de compostos fenólicos como taninos e flavonoides, alcaloides como a cafeína, além de alantoína e ácidos graxos (SAITO, 1984; ASSONUMA, 2009).

Os compostos fenólicos compõem um grande grupo de substâncias formadas durante o metabolismo vegetal, podendo ser encontrados em frutas e bebidas derivadas de plantas, como sucos de frutas, chá, café e vinho tinto. Embora eles não façam parte dos nutrientes essenciais para o organismo humano, estudos demonstram que a ingestão regular de polifenóis na dieta promove ações terapêuticas que incluem modulação de processos inflamatórios, capacidade hipoglicêmica e hipolipidêmica, além da prevenção ao câncer, sendo que esses efeitos parecem estar relacionados com o alto potencial antioxidante que apresentam (FIGUEIRA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018; MATTIOLI *et al.*, 2019; GUTIÉRREZ-GRIJALVA *et al.*, 2019).

Em virtude do uso empírico para redução ponderal, dos constituintes fitoquímicos presentes, e das propriedades farmacológicas de *C. salicifolia* descritas, acredita-se que essa espécie seja promissora para o desenvolvimento de um novo fitoterápico, principalmente no que diz respeito a doenças que cursam com o desenvolvimento de estresse oxidativo e processos inflamatórios, condições estas intimamente correlacionadas com a obesidade. Desta forma, deslumbra-se a possibilidade de buscar alternativas terapêuticas simples para minimizar os danos causados ao organismo pelos radicais livres, além de diminuir os custos no tratamento de comorbidades, as quais estão associadas ao estresse oxidativo e aos processos inflamatórios.

## **2 OBJETIVOS**

## 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antioxidantes dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de folhas e talos da *Cordia salicifolia*, identificar as espécies radicalares sequestradas, investigar seus efeitos sobre a viabilidade celular e produção de citocinas, além de identificar os principais grupos fitoquímicos presentes nestas preparações fitoterápicas.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e/ou quantificar os seguintes grupos fitoquímicos presentes nos extratos de *C. salicifolia*: fenóis totais, taninos, flavonóis e flavonas, flavononas e alcaloides;
- Avaliar o potencial antioxidante dos EE e EA;
- Identificar a espécie radicalar sequestrada pelos extratos, entre elas: radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e óxido nítrico (NO);
- Verificar o efeito dos extratos sobre a viabilidade de células McCoy e macrófagos RAW 264.7 *in vitro*;
- Avaliar o efeito dos extratos sobre produção das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ .

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O presente estudo utilizou folhas e talos secos de *Cordia salicifolia* (sinonímia *Cordia ecalyculata*) adquiridas, comercialmente, da empresa Chá & Cia. O laudo de identificação botânica da espécie é apresentado no ANEXO I.

### 3.2 PREPARAÇÃO DOS FITOTERÁPICOS DE *Cordia salicifolia*

O extrato etanólico (EE) foi obtido utilizando-se 100 g de folhas e talos por litro de álcool etílico absoluto. O material vegetal ficou submerso no solvente por 15 dias à temperatura ambiente, sendo o frasco homogeneizado a cada dois dias. Posteriormente, o extrato foi filtrado e submetido à evaporação completa do solvente. O processo de maceração foi repetido por mais duas vezes e o extrato seco foi acondicionado em frascos de vidro âmbar com tampa e armazenados à temperatura ambiente.

O extrato aquoso (EA) foi preparado pelo método de infusão, utilizando-se 10 g de folhas e talos em 1000 mL de água fervente, por 10 minutos, conforme indicação da medicina popular. Posteriormente, foi submetido à filtração e liofilização. O extrato seco foi armazenado em frasco de vidro âmbar com tampa à temperatura ambiente.

### 3.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA

#### 3.3.1 Identificação e quantificação de fenóis totais

##### 3.3.1.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO (dimetilsulfóxido) e a concentração final utilizada nos testes foi  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .
- Substância padrão: Ácido gálico foi preparado em água destilada e as concentrações finais utilizadas no teste foram 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,025 e  $0,0125 \text{ mg mL}^{-1}$ .
- Carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7,5 %: Preparado em água destilada e armazenado a  $4^\circ\text{C}$ .

##### 3.3.1.2 Procedimento

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada através da técnica espectrofotométrica utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu descrita por Roesler *et al.* (2007). Uma alíquota de  $80 \mu\text{L}$  dos extratos, foi adicionada a  $400 \mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu e 300

$\mu\text{L}$  de solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Os tubos foram agitados e depois mantidos em repouso por 5 minutos, a  $50\text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, leitura espectrofotométrica foi realizada em  $750\text{ nm}$ . O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em EAG (equivalentes de ácido gálico).

### 3.3.2 Identificação e quantificação de taninos

#### 3.3.2.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO e a concentração final utilizada nos ensaios foi  $1\text{ mg mL}^{-1}$ .
- Substância padrão: Ácido tânico foi preparado em água destilada e as concentrações finais utilizadas no teste foram  $0,1$ ,  $0,05$ ,  $0,025$ ,  $0,0125$  e  $0,00625\text{ mg mL}^{-1}$ .
- Reagente de Folin-Denis: Constituído por  $125\text{ g}$  tungstato de sódio,  $25\text{ g}$  ácido fosfomolibdico,  $62,5\text{ mL}$  ácido fosfórico  $\text{L}^{-1}$  de água destilada. Essa solução foi levada a refluxo por 2 horas. Após o resfriamento, o volume foi completado para  $100\text{ mL}$  de água destilada, em balão volumétrico, e armazenado a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .
- Carbonato de sódio  $8\%$ : Preparado em água destilada e armazenado a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 3.3.2.2 Procedimento

Uma alíquota de  $250\text{ }\mu\text{L}$  dos EE e EA, em cada uma de suas concentrações, foi adicionada à  $250\text{ }\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Denis. A mistura foi agitada e deixada em repouso por 3 minutos. Em seguida,  $250\text{ }\mu\text{L}$  de carbonato de sódio foram adicionados e novamente o tubo foi agitado e deixado em repouso por 2 horas. Posteriormente essas soluções foram centrifugadas a  $2000\text{ rpm}$  e o sobrenadante foi levado para leitura espectrofotométrica  $725\text{ nm}$ . A quantidade de taninos totais foi determinada por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido tânico. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em EAT (equivalentes de ácido tânico) por  $\text{mg/mL}$  de extrato (SEIGLER *et al.*, 1986).

### 3.3.3 Quantificação de flavonóis e flavonas

#### 3.3.3.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO, diluídos em etanol 80 % e a concentração final utilizada nos ensaios foi 1 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Quercetina foi preparada em etanol 80 % e as concentrações finais utilizadas no teste foram 0,2, 0,1, 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625 mg mL<sup>-1</sup>.
- Cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) 10 %: Preparado em água destilada no momento do uso.
- Acetato de potássio (CH<sub>3</sub>COOK) 1 Molar: Preparado em água destilada no momento do uso.

#### 3.3.3.2 Procedimento

A determinação de flavonóis e flavonas foi realizada pelo método colorimétrico utilizando cloreto de alumínio. Alíquota de 500 µL dos extratos foram adicionados a 1500 µL de etanol 95 %, 100 µL de AlCl<sub>3</sub>, 100 µL de CH<sub>3</sub>COOK e 2800 µL de água destilada. Após 30 minutos à temperatura ambiente, foi realizada leitura espectrofotométrica em 405 nm. O conteúdo de flavonóis e flavonas foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de quercetina. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em EQ (equivalentes de quercetina) por mg/mL de extrato (CHANG *et al.*, 2002).

### 3.3.4 Quantificação de flavanonas

#### 3.3.4.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO, diluídos em metanol e a concentração final utilizada nos ensaios foi 1 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Naringin foi preparada em DMSO e diluída em metanol para obter as seguintes concentrações 3,2, 1,6, 0,8, 0,4, 0,2 e 0,1 mg mL<sup>-1</sup>.
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DF) 1 %: Preparado em água destilada no momento do uso.
- Metanol 70 %: Preparado em água destilada e utilizado imediatamente.
- Hidróxido de potássio (KOH): preparado a 10 % em metanol 70 % e armazenado a 4 °C.

#### 3.3.4.2 Procedimento

Uma mistura constituída por 250 µL dos extratos, 500 µL de 2,4-DF e 500 µL de metanol foi incubada a 50 °C em banho-maria por 50 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 1250 µL de KOH e novamente as soluções foram incubadas, a temperatura ambiente, por 2 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1250 µL de metanol e as amostras submetidas a centrifugação a 1000 G por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e a leitura espectrofotométrica foi feita em 495 nm (CHANG *et al.*, 2002). O conteúdo de flavanonas foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com diferentes concentrações de naringin. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em EN (equivalentes de naringin) por mg/mL de extrato.

### 3.3.5 Análise qualitativa para alcaloides

#### 3.3.5.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos foram solubilizados em água destilada na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>.
- Controle positivo da reação: Pilocarpina (*Colírio solução 2 %* - Medicamento genérico), um alcaloide natural.
- Reagente de Mayer: Constituído por 13,6 g de cloreto de mercúrio (Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), 20 g de iodeto de potássio (KI)/L de água destilada e armazenado a 4 °C.
- Reagente de Bertrand: Constituído por 50 g ácido sílico-tungstico e ácido sulfúrico 6 N/L de água destilada e armazenado a 4 °C.
- Reagente de Dragendorf: Inicialmente, foram preparadas duas soluções: Solução A (21,24 g subnitrito de bismuto, 250 mL ácido acético glacial/L de água destilada) e solução B (400 g iodeto de potássio (KI)/L de água destilada). Para o preparo de 100 mL desse reagente, foram utilizados: 12,5 mL da solução A, 12,5 mL da solução B, 25 mL de ácido acético e 50 mL de água destilada, sendo armazenado a 4 °C.
- Reagente de Wagner: Constituído por 12,7 g iodo ressublimado, 20 g Iodeto de potássio (KI)/L de água destilada e armazenado a 4 °C.
- Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 10 %: Preparado em água destilada e armazenado a 4 °C

### 3.3.5.2 Procedimento

A análise qualitativa de alcaloides nos extratos foi realizada através de método descrito por Costa (2002), que utiliza os reagentes de Mayer, Bertrand, Dragendorff e Wagner. Uma alíquota de 2 mL de cada extrato foi adicionada a 15 mL de água destilada e 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A mistura foi fervida por 2 minutos e, após resfriamento, foi submetida à filtração em papel de filtro. Cerca de 500 µL das amostras foram misturadas a 500 µL de cada reagente em orifícios de uma placa para verificar a positividade da reação (formação de precipitado).

## 3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 3.4.1 Teste do DPPH (1,1 – difenil-2-picril-hidrazila)

#### 3.4.1.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO e diluídos em água destilada até as seguintes concentrações 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Ácido gálico foi preparado em água destilada e as concentrações finais utilizadas nos testes foram 0,4, 0,2, 0,1, 0,05 e 0,025 mg mL<sup>-1</sup>.
- DPPH: Preparada em metanol na concentração de 4 µg mL<sup>-1</sup>.

#### 3.4.1.2 Procedimento

Uma alíquota de 100 µL de solução de DPPH foi adicionada à 50 µL dos extratos e a mistura incubada por 30 minutos, em temperatura ambiente, na ausência de luz. Após esse período, as amostras foram submetidas à leitura espectrofotométrica em 540 nm. Como referência de absorção máxima foi utilizada a leitura obtida com 100 µL da solução de DPPH adicionada de 50 µL de água. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA), quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, foi determinada através da equação:

$$\%AA = \left\{ \frac{(A_0 - A)}{A_0} \right\} \cdot 100 \quad (i)$$

na qual A<sub>0</sub> é a absorbância do DPPH sem a substância teste, e A corresponde à absorbância verificada com a adição da amostra teste. Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de substância antioxidante controle (ácido gálico) (MENSOR *et al.*, 2001).

### 3.4.2 Identificação da espécie reativa sequestrada

#### 3.4.2.1 Sequestro do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ )

##### 3.4.2.1.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO e diluídos em água destilada até as seguintes concentrações 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Ácido gálico foi preparado em água destilada e as concentrações finais utilizadas nos testes foram 0,8, 0,4, 0,2, 0,1 e 0,05 mg mL<sup>-1</sup>.
- Deoxirribose: Preparada em água destilada na concentração de 3,75 mg mL<sup>-1</sup>.
- Solução de Fe-EDTA: Preparada na proporção de 1:1 (v/v) com solução de cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) 0,4 mg mL<sup>-1</sup> de água destilada e solução de EDTA a 3,72 mg mL<sup>-1</sup> de água destilada.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,8 mM): preparada em água destilada no momento do uso.
- Ácido ascórbico 100 mM: Preparado em água destilada.
- Tampão: Constituído por 1,36 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 0,56 g KOH/L de água destilada e o pH foi ajustado em 7,4.
- Ácido tiobarbitúrico 1 %: Preparado em NaOH.
- Ácido tricloroacético 2,8 %: Preparado em água destilada.

##### 3.4.2.1.2 Procedimento

A capacidade de sequestrar o radical  $\bullet\text{OH}$  foi avaliada pela metodologia descrita por Halliwell, Gutteridge e Aruoma (1987) com algumas modificações. Em um tubo de ensaio foram adicionados 890  $\mu\text{L}$  de tampão, 12  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico, 120  $\mu\text{L}$  de deoxirribose, 34  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,8 mM), 24  $\mu\text{L}$  de solução de Fe-EDTA e 120  $\mu\text{L}$  dos extratos e incubados a banho-maria a 37 °C, por 30 minutos. Posteriormente, 1000  $\mu\text{L}$  de ácido tiobarbitúrico e 1000  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético foram adicionados. O tubo foi novamente a banho-maria a 100 °C por 10 minutos e, posteriormente, leitura espectrofotométrica foi realizada a 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e acompanhados de substância antioxidante controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de radical  $\bullet\text{OH}$  e calculados utilizando a fórmula descrita no item 3.4.1.2

### 3.4.2.2 Sequestro do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

#### 3.4.2.2.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram ressuspensos em DMSO e diluídos em tampão fosfato até as seguintes concentrações 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Vitamina C foi preparada em água destilada e as concentrações finais utilizadas nos testes foram 1, 0,5, 0,25, 0,125 mg mL<sup>-1</sup>.
- Tampão fosfato dextrose: Para a preparação de 1 litro deste tampão, foram utilizados 8,18 g de NaCl (100 mM), 1,361 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10 mM) e 0,991 g de dextrose (5,5 mM), pH 7,0.
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 μM: 2 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram diluídos em 9,998 mL de tampão fosfato/dextrose.
- Vermelho de fenol: 1 mg do corante foi diluído em 1 mL de tampão.
- Peroxidase tipo II (HRP): Preparada em tampão fosfato na concentração de 8,5 U/mL
- NaOH 1 N: 1,0 g de NaOH foi dissolvido em 25 mL de água deionizada.

#### 3.4.2.2.2 Procedimento

A capacidade dos extratos em neutralizar o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada através da técnica de oxidação do vermelho de fenol dependente de peroxidase (PICK; KEISARI, 1980). Em um tubo de ensaio foram adicionados 740 μL de tampão fosfato dextrose, 10 μL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 μL da amostra teste, 100 μL vermelho de fenol e 50 μL de peroxidase. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de NaOH e leitura espectrofotométrica foi realizada em 630 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e acompanhados de substância antioxidante controle. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e calculados utilizando a fórmula descrita no item 3.4.1.2

### 3.4.2.3 Sequestro do óxido nítrico (NO)

#### 3.4.2.3.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EA e EE foram ressuspensos em DMSO e diluídos em tampão fosfato até as seguintes concentrações 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Substância padrão: Ácido gálico foi preparado em tampão fosfato e as concentrações finais utilizadas nos testes foram 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Nitroprussiato de sódio (NPS): Constituído por 0,11918 g de NPS em 20 mL de tampão fosfato e preparado no momento do uso.

- Tampão fosfato (100 mM, pH 7,4): Solução constituída por 1,361 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 0,5611 g de KOH, diluídos em água destilada e o pH sendo ajustado para 7,4.

- Reagente de Griess: Constituído por 1,0 g de sulfanilamida, 0,1 g de naftiletilenodiamina, 2,94 mL de ácido orto-fosfórico, dissolvidos em 100 mL de água destilada e armazenado a 4 °C.

#### 3.4.2.3.2 Procedimento

A capacidade do sequestro de NO foi testada por meio de técnica que utiliza o NPS seguida pelo método de Griess (TSIKAS, 2007). Para tanto, 50  $\mu\text{L}$  da solução de NPS juntamente com 50  $\mu\text{L}$  das diferentes concentrações dos extratos, dissolvidos em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) foram homogeneizados em microplaca e deixados em repouso por uma hora, a temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de reagente de Griess. Após 10 minutos, leitura espectrofotométrica foi realizada em 540 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e acompanhados de substância controle. Os resultados foram calculados conforme descrito no item 3.4.1.2 e expressos em porcentagem de sequestro de NO.

### 3.5 TESTES BIOLÓGICOS *in vitro*

#### 3.5.1. Citotoxicidade em células McCoy e macrófagos RAW 264.7

##### 3.5.1.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram, inicialmente, preparados em soluções estoque em DMSO e posteriormente, diluídos em meio RPMI nas concentrações finais de 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,06, 0,03, 0,02, 0,01  $\text{mg mL}^{-1}$  de EE e 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,06, 0,03  $\text{mg mL}^{-1}$  de EA para os testes em células McCoy. As concentrações dos EE e EA utilizadas para o teste com macrófagos RAW 264-7, foram: 0,06, 0,03, 0,02, 0,008, 0,004, 0,002  $\text{mg mL}^{-1}$  de EE e 1, 0,5, 0,25, 0,13, 0,06, 0,03  $\text{mg mL}^{-1}$  de EA.

- Meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*): Constituído por 10,3 g meio RPMI, 2,38 g HEPES, 2 g bicarbonato de sódio e água destilada quantidade suficiente para preparar 1 L de meio. O pH foi ajustado a 7,2, esterilizado em Membrana Millipore 0,22  $\mu\text{m}$  e acrescido de 10 % de soro fetal bovino inativado. No momento do uso, adicionou-se solução de L-glutamina – penicilina – estreptomicina e 50 mM de mercaptoetanol.

- Tampão PBS: Composto por 28,5 mL de solução A (0,908 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em 100 mL de água destilada) e 71,5 mL de solução B (0,9475 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  em 100 mL de água destilada). Em

seguida, adicionou-se 0,85 g de NaCl e o pH foi ajustado para 7,2-7,4 para posterior esterilização da solução a 121 °C por 15 minutos.

- Solução de vermelho neutro (VN): Preparada a 50 µg/mL em meio RPMI sem soro, esterilizada em membrana Millipore 0,22 µm e mantida *overnight* em estufa. Após este período, foi centrifugada a 1600 rpm por 5 minutos para a remoção de cristais remanescentes
- Mistura de ácido acético/etanol (1:50): Solução preparada com 1,0 mL de ácido acético glacial e 99,0 mL de álcool etílico 50 %.

### 3.5.1.2 Procedimento

Células McCoy B (ATCC 1696) e macrófagos RAW264.7 foram cultivadas em meio RPMI a 37 °C, sendo os macrófagos mantidos em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após tripsinização (2 mL de solução de tripsina 0,2 % + Versene 0,02 %, Instituto Adolfo Lutz), as células foram contadas em câmara de Neubauer e 200 µL do meio, contendo aproximadamente 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> células/mL, foram inoculadas em microplacas (96 orifícios), as quais foram incubadas em condições ideais para cada linhagem celular. Após 24 horas, o meio foi removido e cada orifício tratado com diferentes concentrações das amostras teste. Após incubação por mais 24 horas, as placas foram preparadas para o teste Vermelho Neutro (VN), (BORENFREUND, PUERNER, 1985). Esta técnica colorimétrica consiste na aplicação de 100 µL da solução de vermelho neutro em cada orifício e incubação a 37 °C por 3 horas. Subsequentemente, a placa foi vertida, lavada com tampão PBS e 100 µL de solução de ácido acético/etanol foram adicionados a cada orifício. A placa foi homogeneizada e mantida em repouso por 10 minutos, sendo então, realizada a leitura espectrofotométrica em 540 nm. Os testes foram acompanhados de crescimento controle (células tratadas apenas com meio de cultura), realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, 3 vezes. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular em relação ao controle.

## 3.5.2 Produção de citocinas

### 3.5.2.1 Soluções e reagentes

- Amostra teste: Os extratos EE e EA foram, inicialmente, preparados em soluções estoque em DMSO e posteriormente, diluídos em meio RPMI para a concentração final de 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.
- Meio RPMI: Preparado conforme descrito no item 3.5.1.1

- Lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* sorotipo O111:B4: Preparado em solução estoque na concentração de 1000 µg/mL em RPMI e armazenado a -20 °C, sendo utilizado nos testes na concentração de 1 µg/mL de RPMI.

#### 3.5.2.2 *Procedimento*

Macrófagos RAW 264-7 ( $10^5$  células mL<sup>-1</sup>) foram cultivados em meio RPMI e submetidos à exposição de EE, EA e LPS em concentrações que mantêm a viabilidade celular superior a 90 %. Após incubação por 24 horas, o sobrenadante da cultura foi coletado para a determinação da produção das interleucinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ . Esse teste foi acompanhado de controle negativo (macrófagos sem estímulo ou tratamento), controle positivo (estimulação com LPS) e controle de viabilidade celular pós-experimentos através da técnica de VN (BORENFREUND; PUERNER, 1985). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA, de acordo com instruções do fabricante (BD-PHARMINGEN-EUA).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e submetidos a análise estatística de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O intervalo de confiança utilizado foi de 95 % (LAPPONI, 2013).

## **4 RESULTADOS**

#### 4.1 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Após o processo de liofilização e secagem dos solventes dos extratos EA e EE, preparados a partir de folhas e talos secos de *C. salicifolia*, verificou-se o rendimento obtido. Os resultados mostraram que o EA apresentou maior rendimento de matéria prima seca (190 mg de extrato seco/g de folha seca) em relação ao EE, do qual foi obtido 74 mg de extrato bruto/g de folha seca.

#### 4.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os constituintes fitoquímicos, fenóis totais, taninos, flavonóis e flavonas, e flavanonas, presentes nos extratos preparados das folhas e talos de *C. salicifolia* foram quantificados através de curvas padrão construídas com diferentes concentrações de ácido gálico, ácido tânico, quercetina e naringin, respectivamente (Anexo II).

Os resultados da análise fitoquímica quantitativa dos extratos aquoso e etanólico de *C. salicifolia* são apresentados na Tabela 1. Ambos os extratos possuem substâncias fenólicas na sua composição, sendo verificado que o EA possui quantidades, significativamente, maiores de compostos fenólicos em relação ao EE. Tal resultado pode ser decorrente dos teores de flavonóis e flavonas encontrados no EA, os quais diferem do conteúdo encontrado no EE. A presença de taninos e flavanonas também foi verificada nos extratos avaliados, no entanto, as quantidades desses constituintes não diferiram entre si.

A análise qualitativa de alcaloides nos extratos está apresentada na Figura 5 e indica que, através da técnica utilizada, não foram detectados alcaloides nas diferentes preparações fitoquímicas de porangaba. Apenas no controle positivo, o qual continha o alcaloide natural pilocarpina, foi possível verificar a formação de precipitado na presença dos reagentes de Mayer (precipitado branco), Bertrand (precipitado branco), Dragendorff (precipitado alaranjado) e Wagner (precipitado marrom).

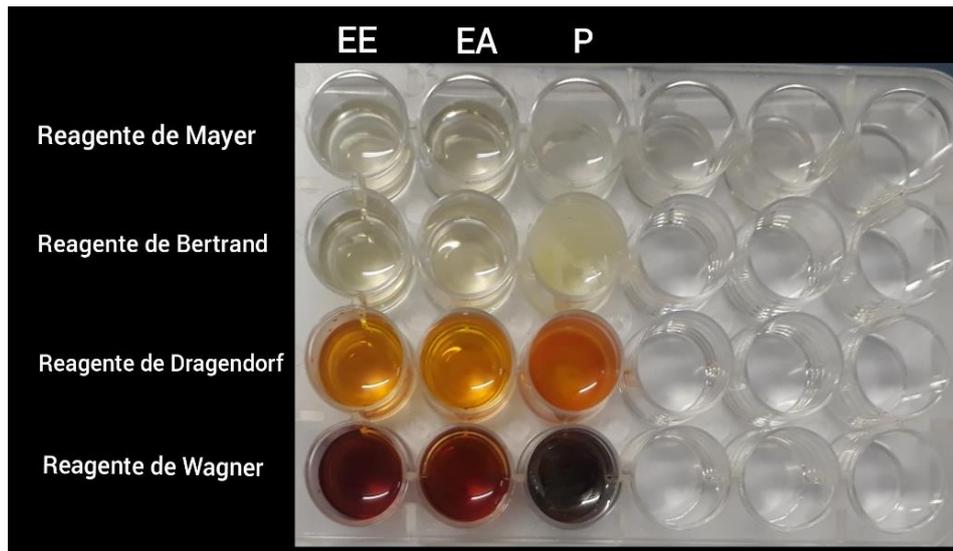
Tabela 1 - Conteúdo de fenóis totais, taninos, flavonol e flavonas e flavanonas presentes nos extratos aquoso (EA) e etanólico (EE) obtidos de folhas e talos de *C. salicifolia*. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

Constituintes Fitoquímicos	Fitoterápicos		<i>p</i> -valor
	EE	EA	
Fenóis totais (mg EAG/ mg mL <sup>-1</sup> fitoterápico)	0,079 $\pm$ 0,02	0,116 $\pm$ 0,02	0,0403*
Taninos (mg EAT/ mg mL <sup>-1</sup> fitoterápico)	0,117 $\pm$ 0,029	0,136 $\pm$ 0,05	0,5696
Flavonóis e Flavonas (mg EQ/ mg mL <sup>-1</sup> fitoterápico)	0,016 $\pm$ 0,01	0,038 $\pm$ 0,00	0,0263*
Flavanonas (mg EN/ mg mL <sup>-1</sup> fitoterápico)	1,9776 $\pm$ 0,66	1,552 $\pm$ 0,51	0,4273

\**p*<0,05: resultados estatisticamente distintos entre EE e EA. EAG: equivalente de ácido gálico; EAT: equivalente de ácido tânico; EQ: equivalente de quercetina; EN: equivalente de naringin.

Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 5 - Análise qualitativa da presença de alcaloides em extrato etanólico (EE) e aquoso (EA) de *C. salicifolia*. P: Solução de pilocarpina.



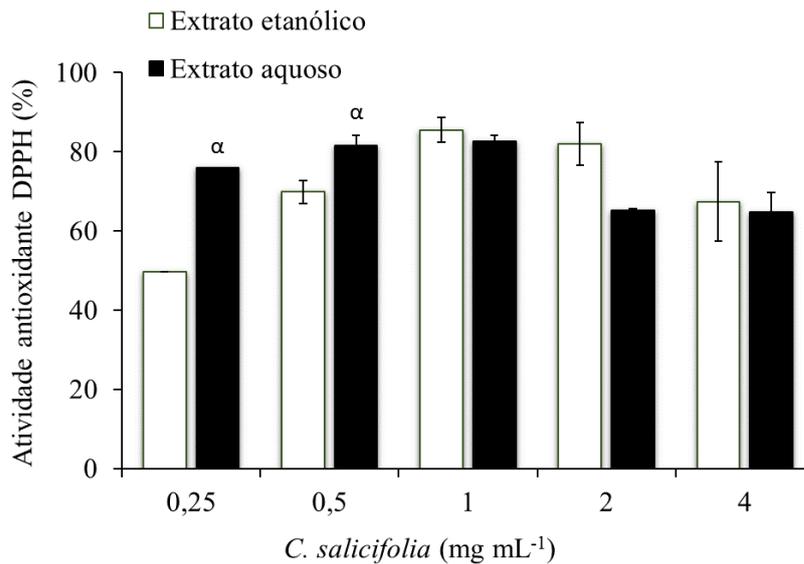
Fonte: Da autora, 2020.

#### 4.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das diferentes preparações fitoquímicas de porangaba está apresentada na Figura 6. Os resultados demonstraram que os extratos possuem capacidade de sequestrar o radical DPPH, sendo que, em concentrações menores (0,25 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>), o EA

foi mais efetivo nessa ação que o EE. Entretanto, ambos apresentaram similar efeito sequestrante máximo, na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Tais resultados são promissores, visto que, o ácido gálico, um antioxidante padrão, apresentou a mesma proporção de sequestro em concentrações igual ou superior a 2 mg mL<sup>-1</sup>.

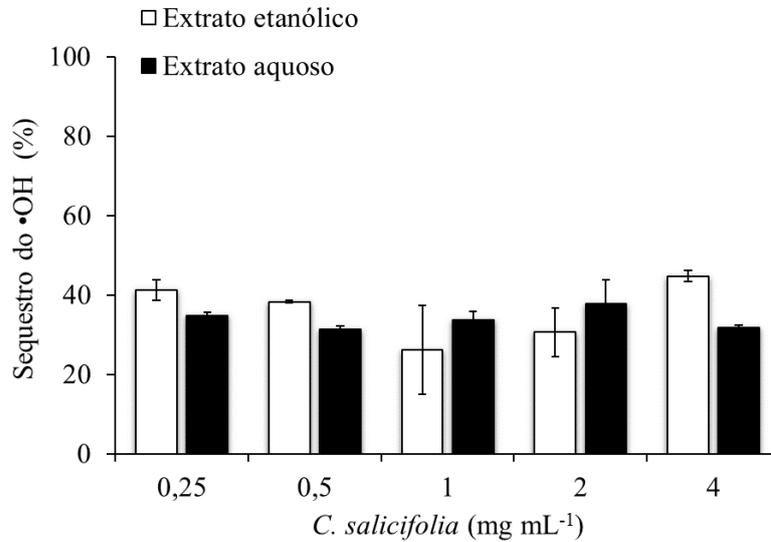
Figura 6 - Efeito de diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de *C. salicifolia* na redução do radical livre DPPH. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.  $\alpha$ :  $p < 0,05$  em relação as mesmas concentrações do EE.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Diante do potencial antioxidante dos extratos, os estudos foram conduzidos para identificação das espécies radicalares que poderiam ser neutralizadas pelos fitoterápicos em estudo. Os resultados foram indicativos de que os extratos de porangaba apresentam baixa capacidade de sequestro do radical  $\bullet$ OH, variando em torno de 30 a 40 % de atividade (Figura 7). O efeito mínimo de neutralização dessa espécie radicalar, exercido pela substância antioxidante padrão, foi de 64 %, na menor concentração avaliada (1 mg mL<sup>-1</sup>).

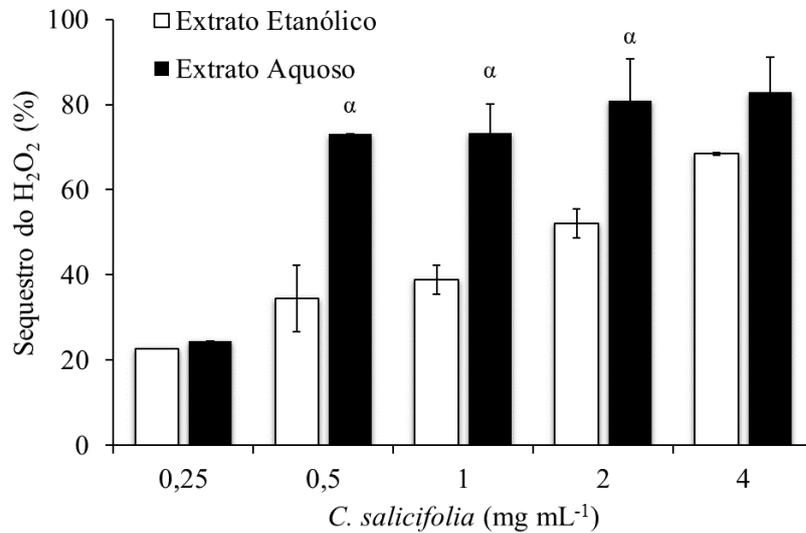
Figura 7 - Percentual de sequestro do radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) por diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de *C. salicifolia*. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

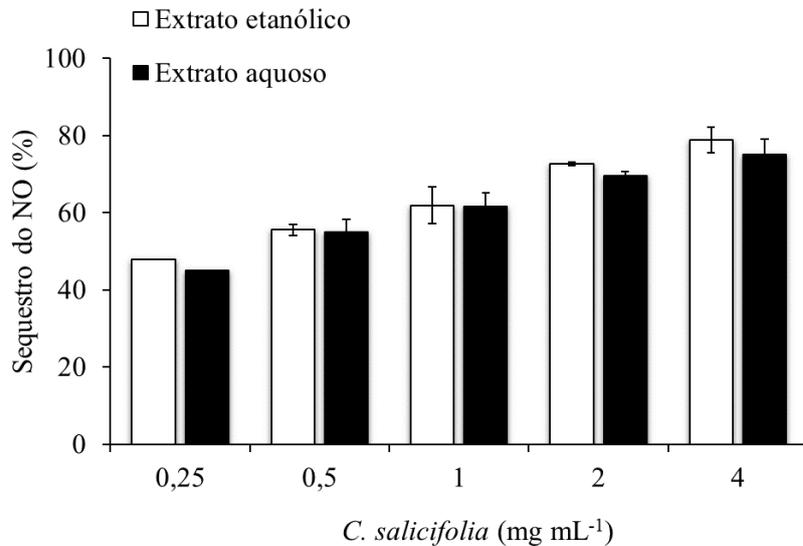
A capacidade dos extratos de *C. salicifolia* em sequestrar  $\text{H}_2\text{O}_2$  é apresentada na Figura 8. Os resultados demonstraram um efeito dose-dependente e mostraram que o EA apresenta eficácia superior ao efeito exercido pelo EE, além deste ser semelhante ao exercido pelo antioxidante padrão (81 %), ácido ascórbico, na concentração de  $0,125 \text{ mg mL}^{-1}$ . Ambos fitoterápicos foram capazes de sequestrar NO, de maneira similar e dose-dependente, apresentando atividade máxima, na maior concentração avaliada (Figura 9). Os efeitos exercidos pelos extratos de porangaba parecem promissores, visto que apresentaram atividade semelhante (56 %) ao da substância padrão, na concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Figura 8 - Percentual de sequestro do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por diferentes concentrações dos extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de *C. salicifolia*. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.  $\alpha$ :  $p < 0,05$  em relação as mesmas concentrações do EE.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Figura 9 - Percentual de sequestro do óxido nítrico (NO) por diferentes concentrações de extratos etanólico (EE) e aquoso (EA) de *C. salicifolia*. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.



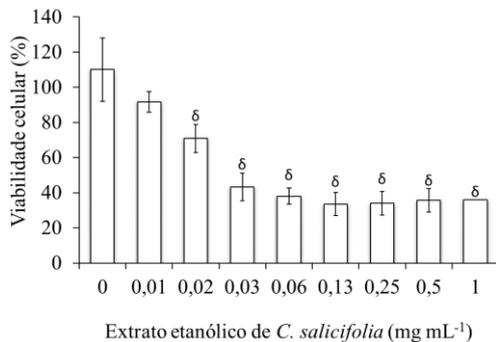
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

#### 4.4 TESTES BIOLÓGICOS *in vitro*

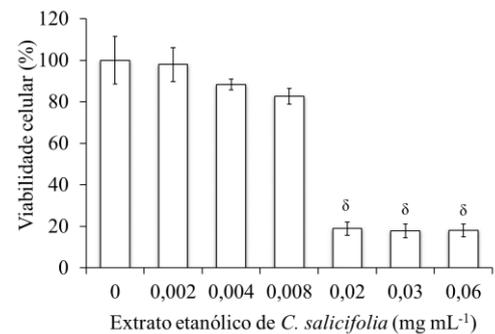
A Figura 10 apresenta os efeitos dos extratos (EE e EA) sobre a viabilidade de células McCoy e macrófagos RAW 264-7, tratados por 24 horas com estas preparações fitoterápicas. Os resultados demonstraram diminuição da viabilidade, sendo esse efeito dose-dependente, principalmente nas maiores concentrações avaliadas. O EE demonstrou ser mais tóxico que o EA, diminuindo, significativamente, a viabilidade de células McCoy e macrófagos a partir da concentração de 0,02 mg mL<sup>-1</sup> (Figura 10A-B), enquanto que o EA não interferiu na viabilidade celular de células McCoy e de macrófagos em concentrações iguais ou inferiores a 0,5 mg mL<sup>-1</sup> e 1 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 10C-D).

Figura 10 - Efeito de diferentes concentrações dos extratos de *C. salicifolia* sobre a viabilidade celular. A – Extrato etanólico (EE) sobre células McCoy; B – Extrato etanólico (EE) sobre macrófagos RAW 264-7; C – Extrato aquoso (EA) sobre células McCoy; D – Extrato aquoso sobre macrófagos RAW 264-7. Resultados apresentados como média ± desvio padrão.  $\delta$ :  $p < 0,05$  em relação ao 0.

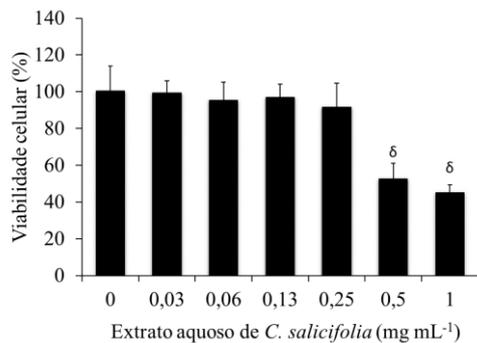
**A**



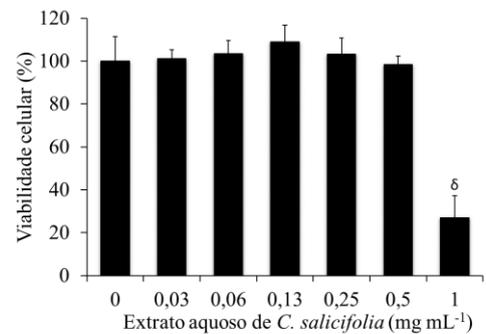
**B**



**C**



**D**



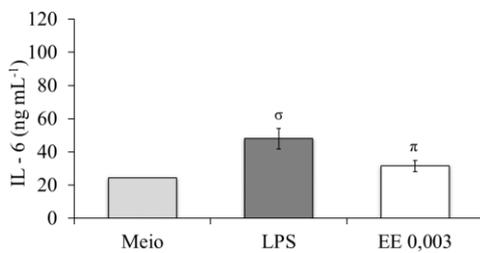
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Após determinação da viabilidade celular de macrófagos na presença dos extratos (EE e EA) de *C. salicifolia*, os ensaios foram conduzidos para análise dos níveis de citocinas

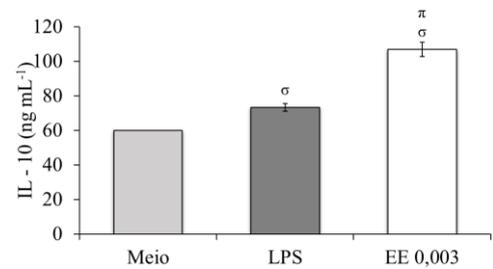
produzidas na presença dos extratos. Os resultados demonstraram que o EE não foi capaz de estimular a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, visto que os níveis IL-6 não diferiram do controle sem estímulo (Figura 11A). Entretanto, o aumento significativo da produção de IL-10 foi verificado em macrófagos tratados com o EE (Figura 11B). A análise da indução de adipocinas pelo EA mostrou que esse extrato não estimulou a produção de TNF- $\alpha$  e que os níveis de IL-10 detectados não diferiram, significativamente, do controle sem estímulo (Figura 11D). No entanto, os resultados mostraram aumento da produção de IL-6 (Figura 11C).

Figura 11 - Níveis de citocinas detectadas após tratamento de macrófagos RAW 264-7 com extratos de *C. salicifolia*. A – Interleucina-6 (IL-6) na presença de extrato etanólico (EE); B – Interleucina-10 (IL-10) na presença de extrato etanólico; C – Interleucina-6 (IL-6) na presença de extrato aquoso (EA); D – Interleucina-10 (IL-10) na presença de extrato aquoso (EA).  $\sigma$ :  $p < 0,05$  em relação ao meio.  $\pi$ :  $p < 0,05$  em relação ao LPS.

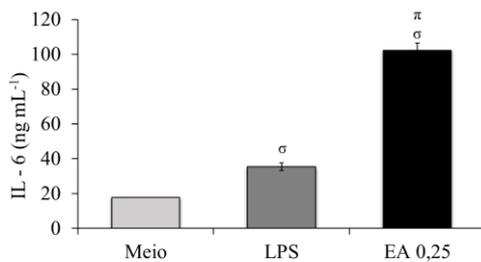
A



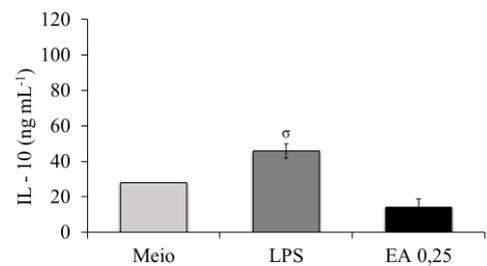
B



C



D



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

## **5 DISCUSSÃO**

A busca por medicamentos e suplementos alimentares que auxiliem a redução ponderal é constante e de grande interesse da população em geral. Neste trabalho, avaliamos os efeitos de preparações fitoquímicas de folhas e talos de *C. salicifolia*, espécie empregada em regimes de emagrecimento, sobre alguns parâmetros associados à obesidade, como biomarcadores envolvidos no estresse oxidativo e modulação da produção de citocinas.

Nos últimos anos, têm-se observado uma crescente exigência em relação a caracterização química de preparações fitoterápicas afim de garantir a qualidade e assegurar os efeitos biológicos, uma vez que estes estão condicionados a presença e a quantidade de determinados grupos químicos. Regularmente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tem usado como parâmetro um marcador, que é um componente ou uma classe de compostos químicos constituintes da matéria-prima vegetal, utilizado como referência no controle de qualidade dessa matéria-prima e dos medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2013). Além disso, o estudo da composição química das espécies vegetais possibilita o direcionamento para descoberta de novas potencialidades terapêuticas, de acordo com os fitoquímicos presentes.

Os resultados desse estudo mostraram que os extratos (EE e EA) possuem substâncias fenólicas, das quais foram identificados taninos e diferentes tipos de flavonoides, entretanto não foram detectados alcaloides (Tabela 1). Na literatura, há poucos relatos sobre a composição química de *C. salicifolia*. Menghini *et al.* (2008) identificaram espatulenol,  $\beta$ -sitosterol, ácidos graxos, hidrocarbonetos e álcoois alifáticos de cadeia longa nas folhas de *C. salicifolia* em preparações extraídas com diclorometano. A presença de fenóis totais em extrato hidroalcolico obtido da planta inteira foi descrita por Martins (2016). Saito (1984) identificaram flavonoides na composição do extrato etanólico e verificaram a existência de taninos no extrato aquoso de *C. ecalyculata*, dados que corroboram com os resultados obtidos neste estudo (Tabela 1).

Os procedimentos realizados para a extração de compostos fenólicos são de extrema importância para a obtenção dos metabólitos desejados. Nesse aspecto, os parâmetros que influenciam na composição fitoquímica são os solventes, a parte da planta utilizada e a técnica de extração, a qual pode ser maceração, infusão, percolação, decocção, dentre outras. Em particular, o solvente utilizado para extração está relacionado principalmente ao pH e à polaridade das substâncias fitoquímicas que se deseja extrair da espécie (PANDEY; TRIPATHI *et al.*, 2014). Alguns autores relatam que sistemas extratores hidroetanólico, hidrometanólico e álcool-cetônico são melhores para obtenção de substâncias fenólicas (LIU; ANG; SPRINGER,

2000; CASARIN *et al.*, 2013), enquanto outros pesquisadores acreditam que os chás e a utilização de água como líquido extrator sejam as técnicas extrativas mais eficazes para obtenção desses compostos (KO *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2015). Nossos resultados demonstraram que o método de infusão apresentou maior rendimento e eficiência na extração de compostos fenólicos, principalmente de flavonóis e flavonas (Tabela 1). Esses resultados são interessantes uma vez que o chá é a forma mais comum de consumo de ervas medicinais pela população e uma das bebidas mais consumidas do mundo (KUMAR *et al.*, 2013), sugerindo que essa forma de consumo facilite a adesão dos pacientes quando em tratamento com *C. salicifolia*.

Importantes atividades biológicas são atribuídas aos compostos fenólicos devido às suas propriedades em quelar íons metálicos, atuar no sequestro de radicais livres, diminuindo as espécies oxidantes, auxiliando na manutenção da saúde celular (ALU'DATT *et al.*, 2017). Os resultados sobre a capacidade em sequestrar o radical DPPH demonstraram que ambos os extratos de *C. salicifolia* possuem capacidade de sequestro superior a 80 % e, portanto, apresentam potencial antioxidante (Figura 6). A atividade antioxidante do extrato aquoso obtido de folhas e talos de *C. salicifolia* e do extrato hidroalcolico dessa planta também foi descrita por Nascimento *et al.* (2016) e Martins (2016). Monteiro (2019) e Oza & Kulkarni (2017) relataram que outras espécies do gênero *Cordia*, incluindo *C. verbenacea*, *C. macleodii* e *C. monoica*, *C. dichotoma*, *C. myxa*, *C. globosa* e *C. gillettii* também possuem propriedades antioxidantes.

A capacidade sequestrante demonstrada pelos extratos EA e EE de *C. salicifolia* pode estar relacionada aos constituintes fitoquímicos presentes em sua composição, destacando a identificação de maiores quantidades de fenóis, flavonóis e flavonas no EA, além da presença de taninos e de flavanonas nos dois extratos (Tabela 1). Em preparações de *C. verbenácea*, Santi *et al.*, (2014) relacionaram o potencial antioxidante do extrato etanólico à presença de flavonoides totais, enquanto Monteiro (2019) descreve o envolvimento de taninos e flavonoides no efeito antioxidante demonstrado pelo extrato aquoso.

A ação antioxidante das substâncias fenólicas é amplamente conhecida e esta propriedade as tornaram grandes aliadas na prevenção e tratamento de doenças crônicas relacionadas ao estresse oxidativo, tais como problemas cardiovasculares, câncer e obesidade (SIMÕES *et al.*, 2017; ZANCO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018; BANERJEE *et al.*, 2020). Tal potencial está relacionado a elevada facilidade em doar o hidrogênio do grupamento hidroxil fenólico, originando um radical fenoxil, que apresenta certa estabilidade e é capaz de sequestrar

radicais  $\bullet\text{OH}$ , peroxil ( $\text{ROO}\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), NO, além de quelar metais envolvidos na geração de radicais livres, ação que justifica a denominação de antioxidantes preventivos (SEABRA *et al.*, 2006).

O radical  $\bullet\text{OH}$  é a espécie radicalar mais reativa e lesiva em sistemas biológicos, pois sua reação com moléculas orgânicas é extremamente rápida. A hidroxilação pode provocar danos no DNA e em proteínas, inativar enzimas e induzir peroxidação lipídica (MAFRA, 1999; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os resultados desse estudo demonstraram que os extratos de *C. salicifolia* apresentam baixo potencial de neutralizar esse radical (Figura 7). Apesar disso, este resultado pode ser relevante a fim de minimizar os efeitos deletérios provocados por esse radical, visto que o organismo humano não dispõe de mecanismo de defesa contra essa espécie radicalar (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Em sistema *in vivo*, a inibição do radical  $\bullet\text{OH}$  ocorre pela ação de antioxidante sobre íons metálicos e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , através das reações de Haber-Weiss e Fenton (ARUOMA, 1996). Nesse contexto, a capacidade neutralizante dos extratos de *C. salicifolia* sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi investigada e os resultados mostraram que o EA foi mais efetivo nessa ação (Figura 8).

Outra fonte geradora do radical  $\bullet\text{OH}$  no organismo é a via de decomposição de peroxinitrito, um potente oxidante, formado a partir da reação entre o  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e NO (BARRETO *et al.*, 2005; VASCONCELOS *et al.*, 2007). O NO é uma molécula bioreguladora que está envolvida em processos de manutenção da homeostasia, mas que em altas concentrações pode contribuir para agravamentos de algumas doenças (WILEY, 2007). As ERNs formadas a partir do NO são altamente oxidantes, capazes de interagir com lipídeos, DNA, proteínas, podendo ocasionar danos celulares e até morte por apoptose ou necrose (BARRETO *et al.*, 2005; WILEY, 2007). Os dois extratos de *C. salicifolia* avaliados neste estudo foram capazes de sequestrar NO, sendo verificado um efeito dose-dependente e não havendo diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos (Figura 9). Outras espécies do gênero *Cordia*, entre elas *C. verbenacea* (MONTEIRO, 2019), *C. macleodii* e *C. monoica*, também foram capazes de sequestrar NO (OZA; KULKARNI, 2017).

A relação entre estresse oxidativo e citotoxicidade está bem estabelecida, mas as propriedades antioxidantes de compostos presentes nas preparações fitoquímicas nem sempre garantem a manutenção da vitalidade celular, visto que, dependendo da concentração, substâncias antioxidantes podem provocar efeitos pró-oxidantes. A realização de testes de citotoxicidade *in vitro* são essenciais para direcionamento dos estudos *in vivo*. Os resultados desse estudo mostraram que células McCoy e macrófagos mantêm-se viáveis na presença do

EE, em concentrações iguais ou menores que  $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ , enquanto que o EA demonstrou menor citotoxicidade, mantendo a viabilidade celular semelhante ao controle sem tratamento, em concentrações iguais ou inferiores a  $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  para células McCoy e macrófagos, respectivamente (Figura 10).

Outros estudos também verificaram a interferência de preparações alcoólicas de porangaba na viabilidade celular, diminuindo-a, enquanto outras pesquisas demonstraram menor efeito tóxico por fitoterápicos obtidos por extração aquosa. Hayashi *et al.* (1990) verificaram redução de 50 % na viabilidade de células Hela tratadas com  $0,22 \text{ mg mL}^{-1}$  de extrato etanólico de folhas de *C. salicifolia*, e que concentrações iguais ou inferiores a  $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ , não provocaram interferência na cultura celular. Vieira (2015) demonstrou efeitos tóxicos de  $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$  da fase etérea do extrato de *C. ecalyculata* sobre células-tronco mesenquimais. Toxicidade reprodutiva foi observada por Santos (2014) em ratos Wistar, tratados via oral durante 60 dias, com extrato hidroetanólico de *C. salicifolia*. Por outro lado, Assonuma (2009) não observou toxicidade proveniente do extrato bruto e fração aquosa de *C. ecalyculata*, em células normais e tumorais. Em estudos *in vivo* Caparroz-Assef *et al.* (2005) não identificaram toxicidade crônica ou aguda em ratos e camundongos tratados com o extrato aquoso de *C. salicifolia*.

Esses achados podem estar relacionados às características hidrofílicas e lipofílicas dos constituintes fitoquímicos presentes em cada extrato. De acordo com Woerdenbag *et al.* (1986), a citotoxicidade aumenta com o decréscimo da hidrofilicidade, facilitando a penetração ou ação das substâncias na membrana citoplasmática. Desse modo e, considerando que o etanol é um solvente com capacidade de extrair substâncias polares e apolares, diferentemente do extrato aquoso, que promove obtenção de princípios fitoquímicos principalmente hidrofílicos, o grau de lipofilicidade dos extratos pode estar diretamente relacionada à citotoxicidade.

Produtos naturais podem provocar efeitos imunotóxicos, contribuindo para o agravamento de uma condição fisiopatológica (MASSOCO; PALERMO-NETO, 1999; KAYSER; BROHOLM, 2000; FORMAN; TORRES, 2001), mas também podem atuar como imunomoduladores, inibindo citocinas e auxiliando no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (WANG *et al.*, 2018). Neste contexto, a ação moduladora dos extratos EE e EA sobre macrófagos frente a produção de citocinas foi avaliada. Em concentrações que mantiveram 90 % de viabilidade celular, foi verificada a capacidade do EE em estimular a produção de interleucina-10 (IL-10), enquanto o EA induziu a um aumento de interleucina-6 (IL-6). A

produção de TNF- $\alpha$  não foi detectada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos tratados com os extratos avaliados (Figura 11).

Outros autores também avaliaram o efeito modulador dessa espécie sobre citocinas. Vieira (2015) verificou redução na produção de interleucinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-6 em células tronco mesenquimais incubadas com extrato etéreo de *C. ecalyculata*. O óleo essencial de *C. verbenacea* também foi capaz de reduzir os níveis de IL-1 $\alpha$  e aumentar os níveis de IL-10 (PIMENTEL *et al.*, 2012). Coutinho, Muzitano e Costa (2009) relataram que *C. verbenacea* é capaz de modular a síntese de mediadores inflamatórios e que tal efeito esteja relacionado a presença de um polifenol. Atualmente, a *C. verbenacea* é comercializada como medicamento fitoterápico (Acheflan<sup>®</sup>), e utilizada, terapeuticamente, como anti-inflamatório tópico (DEVIENNE *et al.*, 2020). Apesar dessas ações benéficas, há estudos que mostraram que o extrato etanólico de *C. verbenacea* foi altamente tóxico, em bioensaios realizados com *Artemia salina* (OLIVEIRA *et al.*, 2010) e que provocou redução significativa da viabilidade de células McCoy tratadas com concentrações superiores a 0,125 mg mL<sup>-1</sup> de extrato etanólico (MONTEIRO, 2019).

Ressalta-se que a redução da viabilidade relatada por Monteiro (2019) e os efeitos sobre as citocinas descritos por Vieira (2015) e Pimentel *et al.* (2012) foram observados com preparações menos hidrofílicas, dados que corroboram com os resultados observados para o EE (Figura 10). Nessa perspectiva, talvez o EE pudesse ser utilizado terapeuticamente como anti-inflamatório tópico, no entanto, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos devem ser conduzidos a fim de garantir a eficácia e segurança dessa preparação fitoterápica.

Biomarcadores de atividade inflamatória e estresse oxidativo são utilizados para monitoramento de pacientes obesos. Remla *et al.* (2016) mostraram que os níveis de IL-6 e o estresse oxidativo são mais altos em obesos do que em indivíduos com peso normal, resultados que também foram verificados por Doğan *et al.* (2016). Em casos de obesidade infantil, Medeiros *et al.* (2017) verificaram aumento na frequência de neutrófilos expressando citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF e IL-12 e que a redução na expressão de IL-8 e IL-10 promove piora do quadro.

Apesar da participação da IL-6 em processos inflamatórios e ser uma citocina positivamente correlacionada com a obesidade, há estudos que relatam que esse mediador possui capacidade lipolítica e que desempenha um efeito antiobesidade (WALLENUS *et al.*, 2002; HALL *et al.*, 2003; PINTO, 2014). Em ratos, a administração de IL-6 aumentou o gasto energético, promovendo redução da gordura corpórea, um efeito decorrente da inibição da

enzima lípase lipoproteica e, concomitante, ao aumento da liberação de ácidos graxos livres e glicerol (NONOGAKI *et al.*, 1995). Em ratos com deleção específica de IL-6 foram observados o desenvolvimento de obesidade e distúrbios metabólicos associados, os quais foram revertidos pela administração de IL-6, sugerindo que essa interleucina está envolvida na prevenção dessas condições (PINTO, 2014). Fonseca-Alaniz *et al.* (2007) e Prestes *et al.* (2006) relataram que a administração de IL-6 promoveu lipólise em pessoas não obesas.

Diante do importante papel modulador da IL-6 no metabolismo lipídico (HALL *et al.*, 2003), os efeitos hipolipidêmicos do extrato aquoso de *C. salicifolia*, verificado por Siqueira *et al.* (2006), podem ser decorrentes da ação dessa citocina. Além disso, o aumento de IL-6 também resulta em concentrações aumentadas de leptina, uma adipocina responsável pela redução da ingestão alimentar e que, conseqüentemente, proporcionaria perda de peso corpóreo (PRADO *et al.*, 2009). Dessa forma, a administração do EA poderia auxiliar no controle e redução ponderal, já que os resultados indicam que 0,25 mg mL<sup>-1</sup> dessa preparação induz a produção de IL-6, além de apresentar atividade antioxidante e não interferir na viabilidade celular.

Além de avaliar o potencial terapêutico e verificar as propriedades biológicas de preparações fitoterápicas de *C. salicifolia*, espera-se que esse estudo possa subsidiar o desenvolvimento de terapias mais acessíveis a população, permitindo o controle do sobrepeso e das comorbidades associadas a essa condição, tais como o estresse oxidativo e o processo inflamatório.

## **6 CONCLUSÕES**

Através dos resultados obtidos pelas análises dos EE e EA, preparados a partir de folhas e talos *C. salicifolia*, podemos concluir que:

- ✓ Ambas as preparações fitoterápicas possuem compostos fenólicos, incluindo taninos, flavanonas, flavonóis e flavonas, sendo o EA constituído por maior conteúdo fenólico e de flavonóis e flavonas, quando comparado ao EE;
- ✓ De acordo com a metodologia utilizada, os extratos (EE e EA) de *C. salicifolia* não possuem alcaloides;
- ✓ Ambos os extratos estudados apresentam atividade antioxidante, sendo o EA mais efetivo que o EE nas concentrações 0,25 e 0,5 mg mL<sup>-1</sup>;
- ✓ As preparações fitoterápicas estudadas são capazes de sequestrar as espécies reativas •OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO e o EA apresenta maior eficácia na neutralização do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em relação ao EE;
- ✓ O EE apresenta maior citotoxicidade para células McCoy e para macrófagos RAW 264-7, em comparação ao EA;
- ✓ EE estimula a produção de interleucina-10 (IL-10) por macrófagos murinos, enquanto o EA induz interleucina-6 (IL-6). Ambos os extratos não interferem na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos tratados, nas concentrações avaliadas.

Considerando a utilização empírica do chá de folhas de *C. salicifolia* para redução de peso corpóreo e, de acordo com os resultados obtidos neste estudo, o uso do EA parece estar adequado e pode minimizar os efeitos deletérios provocados pelo acúmulo de gordura no organismo, sendo uma possibilidade terapêutica de baixo custo e acessível à população. No entanto, outros estudos, principalmente *in vivo*, devem ser conduzidos a fim de assegurar a eficácia e ausência de efeitos adversos com o uso de preparações de *C. salicifolia*. Além disso, o possível efeito anti-inflamatório do EE, decorrente do aumento dos níveis de IL-10, deve ser investigado para validação desta propriedade e para promover maior compreensão dos mecanismos envolvidos.

## **REFERÊNCIAS**

---

---

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- ALI, S. S. *et al.* Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, [S.l.], p. 1-13, 20 jan. 2020. <http://dx.doi.org/10.1111/jfbc.13145>.
- ALU'DATT, M. H. *et al.* A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. **Food Chemistry**, Bruxelas, v. 218, p. 99-106, 2017.
- ANDERSEN, C. J.; MURPHY, K.; FERNANDEZ, M. L. Impact of Obesity and Metabolic Syndrome on Immunity. **Advances in Nutrition**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 66-75, 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/an.115.010207>.
- ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC N° 14, de 14 de março de 2013**. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos de origem vegetal. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (2013). 6 p.
- ARALDI, R. P. *et al.* Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. **Genetics and Molecular Research**, [S.l.], v. 13, n. 3, p. 5207-5220, 2014. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2014.july.7.14>.
- ARUOMA, O. I. Characterization of drugs as antioxidant prophylactics. **Free Radical Biology & Medicine**, [S.l.], v. 20, n. 5, p. 675-705, 1996.
- ASSONUMA, M. M. **Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de *Cordia ecalyculata* vell. (chá de bugre)**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- BANERJEE, A. *et al.* Altered composition of high-lipid diet may generate reactive oxygen species by disturbing the balance of antioxidant and free radicals. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, [S.l.], v. 31, n. 3, 2020. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/jbcpp-2019-0141>.
- BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D.; MUSCARÁ, M. N. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.
- BILSKI, J. *et al.* Role of Obesity, Mesenteric Adipose Tissue, and Adipokines in Inflammatory Bowel Diseases. **Biomolecules**, [S.l.], v. 9, n. 12, p. 780-808, 26 nov. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom9120780>.
- BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [S.l.], v. 2016, p. 1-9, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5698931>.
- BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicology Letters**, [S.l.], v. 24, n. 2, p. 119-124, 1985.

---

<sup>1</sup> De acordo com o Manual para apresentação de trabalhos acadêmicos baseado nas normas de documentação da ABNT, elaborado pela Biblioteca Central da UFTM, 3ª edição, 2019.

- CAPARROZ-ASSEF, S. M. *et al.* Toxicity studies of *Cordia salicifolia* extract. **Acta Scientiarum: Health Sciences**, Maringá, PR, v. 27, n. 1, p. 41-44, 2005.
- CARDOZO, S. *et al.* Hypolipidemic activity of *Cordia salicifolia* extract in mice on a hyperlipidemic diet. **Associação Médica do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, p. 182-186, 2008.
- CASARIN, F. *et al.* Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos do chá de jabuticaba *Myrciaria Cauliflora*. **Anais do Simpósio Latino-Americano de Ciências de Alimentos**, Chapecó, v. 1, 2013. 1 p.
- CATALÁN, V. *et al.* Adipose tissue immunity and cancer. **Frontiers In Physiology**, [S.l.], v. 4, p. 1-13, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00275>.
- CHANG, C. C. *et al.* Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.
- CLIFTON, P. Metabolic Syndrome Role of Dietary Fat Type and Quantity. **Nutrients**, [S.l.], v. 11, n. 7, p. 1438, 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11071438>.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**, v. 2. 4 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1120p.
- COSTA, A. M. J.; DUARTE, S. F. P. Principais Medicamentos Utilizados no tratamento da Obesidade e Vias de Ação: Uma Revisão Sistemática. Id online. **Revista de Psicologia**, [S.l.], v. 11, n. 35, p. 199-209, 2017.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, A. S.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.
- CRUZ, G. L. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995. 599 p.
- DEVIENNE, K. F. *et al.* **Guia de Medicamentos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos**, v. 1, 1 ed. Brasil: Editora Appris, 2020. 523 p.
- DOĞAN, G. E. *et al.* Salivary IL-6 and IL-10 levels in subjects with obesity and gingivitis. **American Journal of Dentistry**, [S.l.], p. 261-265, 2016.
- FARMA, Oficial. **Oficial Farma**. 2020. Disponível em: <https://www.oficialfarma.com.br/cordia-ecalyculata-vell-300mg-60-capsulas/p>. Acesso em: 19 mar. 2020.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A. *et al.* Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.
- FIGUEIRA, I. *et al.* Polyphenols Beyond Barriers: A Glimpse into the Brain. **Current Neuropharmacology**, [S.l.], v. 15, n. 4, p. 562-594, 2017.
- FIORAVANTI, C. A maior diversidade de plantas do mundo. **Revista Fapesp**, São Paulo, ed 241, p. 42-47, 2016.

FONSECA-ALANIZ *et al.* Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, [S.l.], p. 192-203, 6 nov. 2007. <http://dx.doi.org/10.2223/jped.1709>.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. Signaling by the respiratory burst in macrophages. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, Hoboken, v. 51, n. 6, p. 365-371, 2001.

FREITAS, T. L. L. F. *et al.* Investigação medicinal de *Cordia salicifolia*: relato de experiência no curso de graduação em enfermagem. **Revista Enfermagem**, Chapecó, v. 9, n. 9, p. 70-76, 2013.

FRYDMAN, J. N. G. *et al.* Assessment of effects of a *Cordia salicifolia* extract on the radiolabeling of blood constituents and on the morphology of red blood cells. **Journal Medicine Food**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 11, p. 767-772, 2008.

FURUKAWA, S. *et al.* Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, [S.l.], v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GADDE, K. M. *et al.* Obesity: Pathophysiology and Management. **Journal of the American College of Cardiology**, [S.l.], v. 71, n. 1, p. 69-84, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>.

GAUTAM R.; JACHAK SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, [S.l.], v. 29, n. 5, p. 767-820, 2009. <https://doi.org/10.1002/med.20156>.

GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. *et al.* Cellular antioxidant activity and in vitro inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and pancreatic lipase of oregano polyphenols under simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, [S.l.], v. 116, p.676-686, 2019.

GUZIK, T. J. *et al.* The role of infiltrating immune cells in dysfunctional adipose tissue. **Cardiovascular Research**, [S.l.], v. 113, n. 9, p. 1009-1023, 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvx108>.

HALL, G. *et al.* Interleukin-6 Stimulates Lipolysis and Fat Oxidation in Humans. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.l.], v. 88, n. 7, p. 3005-3010, jul. 2003. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2002-021687>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; ARUOMA, O. I. The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. **Anal Biochemistry**, [S.l.], v. 165, n. 1, p. 215-219, 1987.

HAYASHI, K. *et al.* Antiviral activity of an extract of *Cordia salicifolia* on herpes simplex virus type 1. **Planta Medica**, [S.l.], v. 56, n. 05, p.439-443, 1990.

IBGE: Pesquisa Nacional de Saúde – **Um em cada quatro adultos do país estavam obesos em 2019; Atenção primária foi bem avaliada**. Brasília: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, (2020). Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/29204-um-em-cada-quatro-adultos-do-pais-estava-obeso-em-2019>. Acesso em: 25 out. 2020.

KAYSER, L. F.; BROHOLM, H. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial constitutive nitric oxide synthase in neoplastic and autoimmune thyroid

disorders. **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, [S.l.], v. 108, n. 11, p. 785-91, 2000.

KO, M.; CHEEIGH, C.; CHUNG, M. Relationship analysis between flavonoids structure and subcritical water extraction (SWE). **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 143, p. 147-55, 2014.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, [S.l.], v. 2013, p. 01-16, 2013.

LAPPONI, J. C. **Estatística usando Excel**, 4. ed. Brasil: Editora Campus, 2013. 496 p.

LIU, F. F.; ANG, C. Y.; SPRINGER, D. Optimization of extraction conditions for active components in *Hypericum perforatum* using surface methodology. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 3.364-3.371, 2000.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Lipid peroxidation in patients with chronic renal failure. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.13, p. 205-212, 1999.

MANNA, Prasenjit; JAIN, Sushil K. Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: causes and therapeutic strategies. **Metabolic Syndrome And Related Disorders**, [S.l.], v. 13, n. 10, p. 423-444, dez. 2015. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/met.2015.0095>.

MARTINS, U. E. C. **Determinação da composição de fenólicos e atividade antioxidante de espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira**, 2016. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2016.

MASSCHELIN, P. M.; COX, A. R.; CHERNIS, N.; HARTIG, S. M. The Impact of Oxidative Stress on Adipose Tissue Energy Balance. **Frontiers In Physiology**, [S.l.], v. 10, p. 1-8, 22 jan. 2020. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2019.01638>.

MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on peritoneal macrophage activity and corticosterone serum levels in Balb/C mice. **Life Sciences**, [S.l.], v. 65, n. 20, p. 2157-2165, 1999.

MATTIOLI, R. *et al.* Anti-inflammatory activity of a polyphenolic extract from *Arabidopsis thaliana* *in vitro* and *in vivo* models of alzheimer's disease. **International Journal Molecular Sciences**, [S.l.], v.20, n.3, p. 1 - 19, 2019.

MEDEIROS, N. I. *et al.* IL-10 and TGF- $\beta$  unbalanced levels in neutrophils contribute to increase inflammatory cytokine expression in childhood obesity. **European Journal of Nutrition**, [S.l.], v. 57, n. 7, p. 2421-2430, 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00394-017-1515-y>.

MENGHINI, L. *et al.* Phytochemical Investigation on Leaf Extract of *Cordia salicifolia* Cham. **Journal Medicine Food**, [S.l.], v. 11, n. 1, p.193-194, 2008.

MENSOR, L. L. *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research.**, [S.l.], v. 15, p. 127-130, 2001.

MONTEIRO, L. K. M. C. **Screening fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Cordia verbenaceae***. 2019. 51 f. TCC (Graduação) - Curso Bacharelado em Biomedicina, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2019.

NASCIMENTO, A. P. *et al.* **Atividade antioxidante de fitoterápicos para perda de peso.** *Revista de Saúde e Biologia*, Campo Mourão, v. 11, n. 3, p.29-33, 2016.

NONOGAKI, K. *et al.* Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*, [S.l.], v. 136, n. 5, p. 2143-2149, maio 1995. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.136.5.7720663>.

OLIVEIRA, L. G. S. Avaliação da atividade antifúngica e toxicidade do extrato etanólico de *Cordia verbenácea*. In: Simpósio brasileiro de plantas medicinais, 21., 2010. João Pessoa. *Anais*, João Pessoa: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, 2010.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: **Com mais pessoas passando fome e persistência da má nutrição, relatório da ONU levanta dúvida sobre atingir fome zero até 2030.** Brasil (2020). Disponível em:

[https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6228:com-mais-pessoas-passando-fome-e-persistencia-da-ma-nutricao-relatorio-da-onu-levanta-duvida-sobre-atingir-fome-zero-ate-2030&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=6228:com-mais-pessoas-passando-fome-e-persistencia-da-ma-nutricao-relatorio-da-onu-levanta-duvida-sobre-atingir-fome-zero-ate-2030&Itemid=839). Acesso em: 25 out. 2020.

OZA, M. J.; KULKARNI, Y. A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). *The Journal Pharmacy and Pharmacology*, [S.l.], v. 69, n. 7, p.755-789, 2017.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, Lucknow, v. 5, n. 2, p. 115-119, 2014.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *Journal Immunological Methods*, [S.l.], v. 38, p. 161-170, 1980.

PIMENTEL, S. P. *et al.* Protective effect of topical *Cordia verbenácea* in a rat periodontitis model: immune-inflammatory, antibacterial and morphometric assays. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 1-8, 21 nov. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-12-224>.

PINTO, W. J. A função endócrina do tecido adiposo. *Faculdade de Ciências Médicas*, Sorocaba, v. 16, n. 3, p. 111-120, 2014.

PRADO, W. L. *et al.* Obesidade e adipocinas inflamatórias: Implicações práticas para a prescrição de exercício. *Revista Brasileira de Medicina e Esporte*, Recife, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

PRESTES, J. *et al.* Papel Da Interleucina-6 Como Um Sinalizador Em Diferentes Tecidos Durante O Exercício Físico. *Fitness & Performance Journal*, [S.l.], p. 348-353, 2006. Colegio Brasileiro de Atividade Física Saúde e Esporte (COBRASE). <http://dx.doi.org/10.3900/fpj.5.6.348.p>.

RANI, V. *et al.* Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sciences*, [S.l.], v. 148, p.183-193, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2016.02.002>.

REMLA, N. *et al.* Increased Gustatory Response Score in Obesity and Association Levels with IL-6 and Leptin. *Journal of Nutrition and Metabolism*, [S.l.], v. 2016, p. 1-9, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7924052>.

- RODRIGUES, V. C. **Compostos bioativos de chás: comparação das infusões a quente e a frio**. 2015. 37 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2015.
- ROESLER, R. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.
- ROSS, R.; NEELAND, I. J.; YAMASHITA, S.; SHAI, I.; SEIDELL, J.; MAGNI, P.; SANTOS, R. D.; ARSENAULT, B.; CUEVAS, A.; HU, F. B. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a consensus statement from the ias and iccr working group on visceral obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, [S.l.], v. 16, n. 3, p. 177-189, 4 fev. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41574-019-0310-7>.
- SAITO, M. L. **Farmacognosia de *Cordia ecalyculata* vell. (Boraginaceae)**, 1984. 164 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1984.
- SANTI, M. M. *et al.* Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.2, p.256-61, 2014.
- SANTOS, M. C. **Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* vell, em ratos wistar**, 2014. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista, Assis, SP, 2014.
- SEABRA, R. M. *et al.* Antioxidant compounds extracted from several plant materials. In: FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM. **Biomaterials from aquatic and terrestrial organisms**, Enfield (NH) USA: Science, p. 115-74, 2006.
- SEIGLER, D. S. *et al.* Tannins from four common Acacia species of Texas and Northeastern Mexico. **Economic Botany**, [S.l.], v. 40, p. 220-232, 1986.
- SILVA, C. J.; BASTOS, J. K.; TAKAHASHI, C. S. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 127, n. 2, p.445-450, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.015>.
- SILVA, E. C. A. *et al.* Antioxidantes Polifenóis de Plantas Brasileiras Utilizados como Inibidores do Câncer. **International Journal Nutrology**, [S.l.], 2018.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**, Porto Alegre: Artmed, 2017. 486 p.
- SIQUEIRA, V. L. D. *et al.* Pharmacological Studies of *Cordia salicifolia* Cham in Normal and Diabetic Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [S.l.], v. 49, n. 2, p. 215-218, 2006.
- TAYLOR, L. **The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals**. Garden City Park: Square One Publishers, 2005. 528 p.
- TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L- arginine/ nitric oxide area of research. **Journal of chromatography B**, [S.l.], v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

VASCONCELOS S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v.30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, H. S. **Estudo comparativo de citocinas anti-inflamatórias em células tronco mesenquimais cultivadas com *Cordia ecalyculata* e biocurativo**, 2015. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bacharel em Ciências Biomédicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências de Botucatu, Botucatu, 2015.

VIGITEL: **Hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumenta prevalência de diabetes e hipertensão**. Brasília: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (2016). Disponível em: [http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel\\_17-4-17-final.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/abril/17/Vigitel_17-4-17-final.pdf). Acesso em: 25 out. 2020.

WALLENIUS, V. *et al.* Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. **Nature Medicine**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 75-79, 2002. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0102-75>.

WANG, K. *et al.* Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System. **Journal of Immunology Research**, [S.l.] v. 2018, p. 1-2, 2018.

WANG S. *et al.* Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, [S.l.], v. 25, n. 1, p. 1-18, 2014. <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jnutbio.2013.09.001>

WILEY, J. W. The many faces of nitric oxide: cytotoxic, cytoprotective and both. **Neurogastroenterology and Motility**, [S.l.], v.19, p. 541-544, 2007.

WOERDENBAG, H. J. *et al.* Evaluation of the *in vitro* cytotoxicity of some sesquiterpene lactones on a human lung carcinoma cell line using the fast green dye exclusion assay. **Planta Medica**, Stuttgart, v.2, p.112-114, 1986.

WHO: **Obesity and overweight**. *World Health Organization*, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 25 out. 2020.

ZANCO, P.; SOUZA, E. F.; BONACORSI, C. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de chá de folhas da amora-preta (*Morus nigra*). **Scientific Electronic Archives**, [S.l.], v.10, n.1, p.150-7, 2017.

**ANEXOS**

## ANEXO I - Laudo de identificação da espécie vegetal

### CERTIFICADO DE ANÁLISE

PRODUTO : CHA DE BUGRE		Cod CHBU	GRAU ALIMENTICIO	
Nome Científico:	<i>Cordia alliodora</i> Cham.		Método de Secagem:	ESTUFA
Família:	Boraginaceae		Solvente de Extração:	-
Parte Utilizada:	FOLHA E TALO		Excipiente:	-
Lote:	AUTO9AYD		Esterilização:	Não
Origem/Procedência:	BRASIL		GMO:	-
Fornecedor:	000466-01		BSE:	-
Lote de Fornecedor:	1017		Nº Certificado de Análise:	<b>801/18 R</b>
Data da Colheita:	01/10/2017		Data Emissão do Certificado:	01/09/2018
Data de Fabricação:	01/10/2017			
Data de Validade:	01/10/2019			

#### ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E DOSEAMENTO DE ATIVOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	REFERÊNCIA
Aspecto	FOLHA E TALO	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 192-193
Cor	VERDE/MARRON	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 192-193
Odor	CARACTERISTICO	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 192-193
Sabor	CARACTERISTICO	CONFORME	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 192-193
Água (105°C em Estufa)	MAXIMO 15%	13,28%	FARMACOGNOSTIA, 1998, P. 16
Cinzas Totais	MAXIMO 18%	7,73%	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 198
Material Estranho	MAXIMO 2%	AUSENTE	FARM. BRASILEIRA 5 ED, VOL I, P. 197

**Observações:**

- Mudança de cor pode ocorrer devido ao fato de que o produto é de origem vegetal/animal
- Armazenamento em local seco e arejado, sem umidade e calor
- Ensaos complementares podem ser realizados com custos adicionais
- NR - Não Realizado
- NA - Não Aplicável
- Esterilização sob consulta

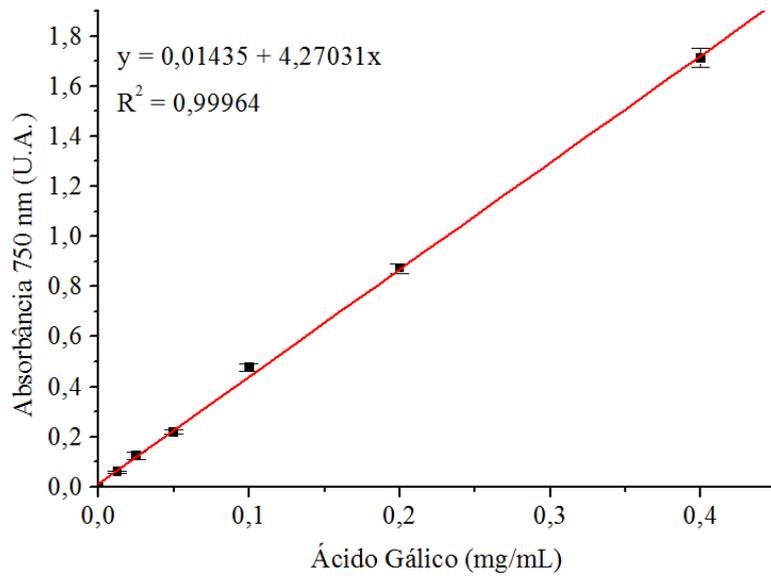


**ANDREA BERNARDES**

FARMACEUTICA RESPONSÁVEL - CRF/SP: 13.987

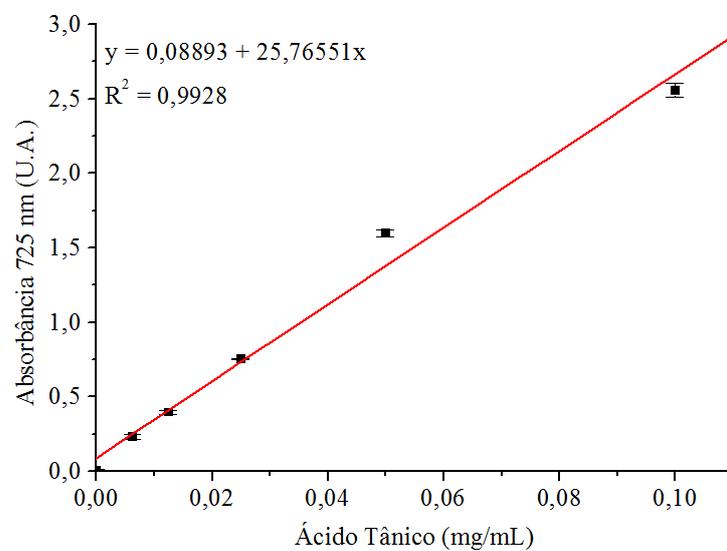
**ANEXO II - Curvas padrão utilizadas para obter os resultados do *screening* fitoquímico**

Gráfico 1 - Curva padrão de ácido gálico (mg/mL) para determinação de fenóis totais presentes nos extratos.



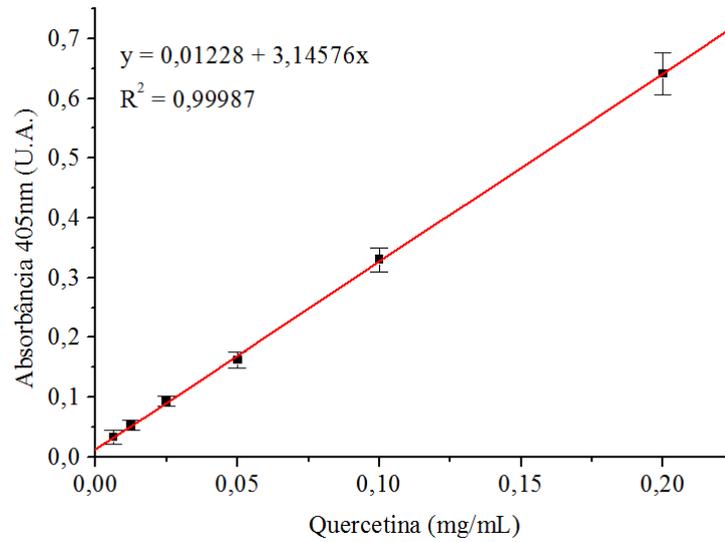
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Gráfico 2 - Curva padrão de ácido tânico (mg/mL) para determinação de taninos presentes nos extratos.



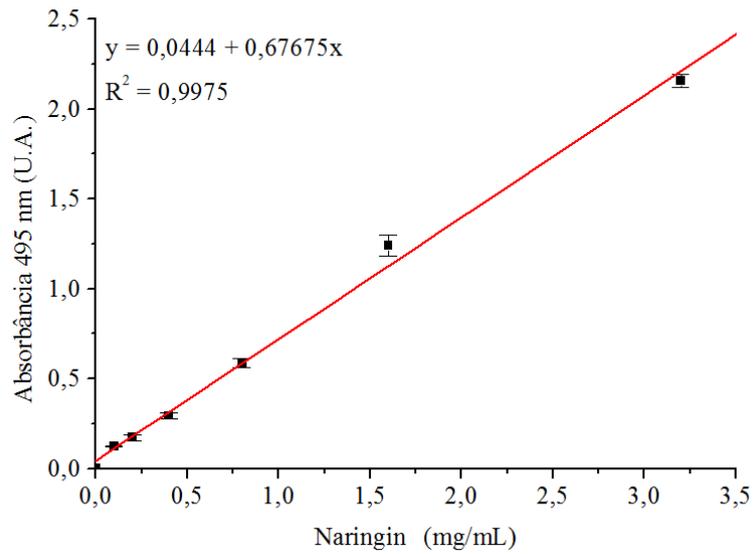
Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Gráfico 3 - Curva padrão de quercetina (mg/mL) para determinação de flavonóis e flavonas presentes nos extratos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

Gráfico 4 - Curva padrão de naringin (mg/mL) para determinação de flavanonas presentes nos extratos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2020.