

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Priscila de Lima Paula

Atividades antioxidante e anti-inflamatória das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Jaboticaba) e seus fitocomplexos com β -ciclodextrina

Juiz de Fora

2020

Priscila de Lima Paula

Atividades antioxidante e anti-inflamatória das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Jaboticaba) e seus fitocomplexos com β -ciclodextrina

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2020

Priscila de Lima Paula

Atividades antioxidante e anti-inflamatória das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Jaboticaba) e seus fitocomplexos com β -ciclodextrina


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Aprovado em 13 / Novembro / 2020.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Ângelo Márcio Leite Denadai - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª. Dr.ª Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof. Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo
Universidade Federal de São João del-Rei

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família, minha base, em especial meus pais, por todo apoio, incentivo, confiança e amor. E meus irmãos por vibrarem a cada conquista.

À Deus, pela minha existência, persistência, sabedoria, paciência e muita fé.

Ao programa de pós-graduação pela oportunidade de fazer parte da família PPGCF e pelo apoio dado durante toda a realização deste trabalho.

Ao Lucas Sales, que desde o início me deu suporte na pesquisa, nos experimentos realizados no Laboratório de Físico-Química e Fluidos em Governador Valadares e nas inúmeras ideias para incrementar no trabalho, fora os momentos excepcionais que passamos juntos desde então.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do ICB, que além de cooperarem nos ensaios realizados no laboratório, fizeram parte do meu progresso durante o mestrado, em especial ao Ari Lemos que me deu suporte nos experimentos várias vezes com muita paciência e atenção.

Ao meu orientador Ângelo Denadai, que desde o início acreditou e confiou na realização desta pesquisa, além de me receber em Governador Valadares com muito carinho e atenção, e que hoje tenho amizade externamente à pesquisa.

Ao meu co-orientador Rodrigo Fabri, o qual tive oportunidade de conhecer antes de ingressar no mestrado e que sempre foi muito solícito e atencioso comigo. Hoje, o tenho como amigo, fruto da ótima convivência que tivemos durante minha passagem no laboratório.

Aos laboratórios parceiros, que cederam seus espaços e equipamentos para a realização de experimentos fundamentais, contribuindo para um trabalho de excelência.

Aos meus colegas da 10ª turma do mestrado que fizeram parte do meu crescimento na pós-graduação, além dos momentos divertidos que passamos juntos em meio as turbulências.

As minhas amigas e amigos que fiz durante o caminho, que torcem para o meu sucesso e curtem acompanhar meu crescimento profissional.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Atualmente, a busca por novas moléculas ou combinações de moléculas com potencial anti-inflamatório tem sido crescente, devido principalmente aos efeitos adversos causados pelos medicamentos convencionais. O fruto da jabuticaba é utilizado popularmente para o tratamento da diarreia, irritação da pele e inflamação intestinal. No entanto, pouco é relatado sobre as atividades biológicas de folhas e ramos dessa árvore. Logo, o objetivo desse trabalho é avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos etanólico das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, bem como dos fitocomplexos supramoleculares produzidos a partir dos extratos e β -ciclodextrina, a fim de melhorar a solubilidade da formulação e potencializar as atividades biológicas. A caracterização dos complexos foi realizada por espectrometria no infravermelho, espalhamento de luz dinâmico, potencial Zeta e condutividade. As análises térmicas DTA e TGA foram usadas para comprovar o aumento da estabilidade térmica dos fitocomplexos. Através do doseamento de fenóis totais, de flavonoides e taninos, foi possível observar que o extrato das folhas apresentou maior teor de flavonoides, enquanto que o extrato dos ramos mostrou maior teor de taninos. Tal achado foi confirmado pela identificação dessas substâncias por meio da técnica de HPLC-MS-Q-TOF, sendo a telimagrandina I, castalagina e dilactona do ácido valoneico relatadas pela primeira vez nas folhas e ramos de *P. cauliflora* pelo nosso grupo de pesquisa. Através dos ensaios de inibição do radical DPPH, do sistema β -caroteno/ácido linoleico e da formação de MDA, e a redução do complexo fosfomolibdênio, foi possível verificar que ambos extratos e fitocomplexos apresentaram atividade antioxidante promissora. Posteriormente, foi comprovado que as amostras, em três concentrações distintas, foram eficazes nos testes *in vitro* e *in vivo* da atividade anti-inflamatória, realizados por meio da redução da produção de NO em linhagem celular J774A.1 e inibição do edema de orelha induzido com óleo de cróton, respectivamente. Além disso, os fitocomplexos demonstraram melhora na atividade anti-inflamatória no tratamento de 4 horas em relação aos extratos livres, comprovando que o encapsulamento molecular é uma importante estratégia a ser considerada para o desenvolvimento de formulações para uso tópico.

Palavras-chave: *Plinia cauliflora*. Jabuticaba. Atividade antioxidante. Atividade anti-inflamatória. Ciclodextrina. Complexo supramolecular.

ABSTRACT

Intending to minimize the side effects reported for current drugs on the market, the seek for new molecules with anti-inflammatory response has currently gained more attention. Jaboticaba fruit has been popularly used for the treatment of diarrhea, skin rashes and intestinal inflammation. However, there are few reports stating the biological activity of branches and leaves. The present study aimed to evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of branches and leaves from *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, as well as, the supramolecular phytocomplex produced through β -cyclodextrin and extract complexation seeking improvements in solubility and biological response. The phytocomplex characterization was performed by infrared spectroscopy, dynamic light scattering, zeta potential and conductivity analysis. The thermal analysis DTA/TGA reported thermal stability improvements of the phytocomplexes. The leaves extract revealed greater flavonoid content whereas the branches showed higher content for tannins the test was based on the total phenolic, flavonoid, and tannin dosage. All substances were identified by HPLC-MS-Q-TOF being tellimagrandin I, castalagin and valoneic acid dilactone reported for the first time in *P. cauliflora* branches and leaves. The promising antioxidant activity of the stated extracts and phytocomplexes was assessed by DPPH assay, β -carotene/linoleic acid system and the formation of MDA, and the reduction of the phosphomolybdenum complex. The anti-inflammatory efficacy of the samples was determined in three different concentrations for the *in vitro* and *in vivo* tests. The *in vitro* assay was performed by the reduction of nitric oxide in J774A.1 cell and the *in vivo* experiment by the inhibition of ear edema croton oil induced in mice. In addition, the phytocomplexes showed improved results for the four hours treatment assay when compared to the ethanolic extract, revealing how the complexation can work as an important strategy to be considered for the development of topical formulation.

Key words: *Plinia cauliflora*. Jaboticaba. Antioxidant activity. Anti-inflammatory activity. Cyclodextrin. Supramolecular complex.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de sistemas supramoleculares, período de descoberta e suas aplicações tecnológicas	30
Tabela 2 - Dimensões das três ciclodextrinas naturais	37
Tabela 3 - Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos dos extratos e fitocomplexos supramoleculares	57
Tabela 4 - Identificação dos compostos do extrato etanólico das folhas (EEF) de <i>Plinia cauliflora</i> por HPLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (T_R), massa molecular exata, massa/carga (m/z) nos modos negativo e positivo $[M-H]^- / [M-H]^+$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências.....	60
Tabela 5 - Identificação dos compostos do extrato etanólico dos ramos (EER) de <i>Plinia cauliflora</i> por HPLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (T_R), massa molecular exata, massa/carga (m/z) nos modos negativo e positivo $[M-H]^- / [M-H]^+ [M-H]^-$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências.....	67
Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante de rutina, quercetina, EEF, EEF/ β CD, EER, EER/ β CD e β CD através dos métodos de inibição do radical DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico	90
Tabela 7 - Porcentagem de inibição do edema após tratamento de 6 horas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares e dexametasona. Os valores da massa do edema (mg) correspondem à média \pm desvio padrão. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de ANOVA seguida do teste Bonferroni ($p < 0,05$).....	101
Tabela 8 - Porcentagem de inibição do edema após tratamento de 4 horas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares e dexametasona. Os valores da massa do edema (mg) correspondem à média \pm desvio padrão. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de ANOVA seguida do teste Bonferroni ($p < 0,05$).....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore de jabuticaba	20
Figura 2 - Polifenol depsídeo identificado nos frutos de jabuticaba.....	21
Figura 3 - Flavonoides presentes nos frutos e folhas de jabuticaba.....	22
Figura 4 - Taninos presentes nos frutos e folhas de jabuticaba	22
Figura 5 - Galotaninos encontrados nos frutos e tronco da jabuticabeira.....	23
Figura 6 - Monômeros de proantocianidinas encontrados nos frutos de jabuticaba.....	23
Figura 7 - Elagitaninos encontrados nos frutos de jabuticaba	24
Figura 8 - Substâncias fenólicas encontradas nos frutos, tronco e na casca da árvore de jabuticaba	24
Figura 9 - Esquema representativo de formação de nanopartículas supramoleculares	31
Figura 10 - Representação esquemática da α CD, β CD e γ CD.....	34
Figura 11 - Representação esquemática da estrutura tronco-cônica da ciclodextrina	35
Figura 12 - Esquema de permeação da hidrocortisona através da pele complexada com ciclodextrina em meio aquoso	38
Figura 13 - Esquema de preparo do complexo de inclusão	42
Figura 14 - Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio ($AlCl_3$)	43
Figura 15 - Preparo da mistura mecânica (MM)	45
Figura 16 - Obtenção do espectro de Infravermelho	46
Figura 17 - Leitura das amostras por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	47
Figura 18 - Espectro de infravermelho do EEF, EEF/ β CD, MM e β CD pura	75
Figura 19 - Espectro de infravermelho do EER, EER/ β CD, MM e β CD pura.....	76
Figura 20 - TGAs dos extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e MMs na faixa de temperatura entre 0 e 700 °C. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD	78
Figura 21 - DTAs dos extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e MMs na faixa de temperatura entre 0 e 800 °C. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD	79

Figura 22 - Valores da condutividade dos extratos e fitocomplexos supramoleculares em meio aquoso em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD B) EER e EER/ β CD	81
Figura 23 - Distribuição dos valores de PZ para os extratos e fitocomplexos supramoleculares em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD B) EER e EER/ β CD.....	83
Figura 24 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão dos extratos e fitocomplexos supramoleculares em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD	85
Figura 25 - Gráficos do perfil de decaimento da absorvância do β -caroteno (curva de oxidação), avaliada em 470 nm, mostrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação na presença de (A) EEF, (B) EER, (C) EEF/ β CD, (D) EER/ β CD e (E) β CD	91
Figura 26 - Gráficos de redução da produção de malondialdeído na presença de (A) EEF, (B) EEF/ β CD, (C) EER (D) EER/ β CD (E) β CD e (F) rutina, nas concentrações nominais de extrato 10; 20 e 40 μ g/mL	93
Figura 27 - Avaliação do perfil de viabilidade celular de (A) EEF, (B) EER, (C) EEF/ β CD, (D) EER/ β CD e (E) β CD em macrófagos da linhagem J774A.1, nas concentrações nominais de extrato 250; 125; 62,5 e 31,25 μ g/mL	95
Figura 28 - Atividade anti-inflamatória in vitro por meio da redução da produção de óxido de nítrico (NO) na presença de EEF, EER, EEF/ β CD, EER/ β CD e β CD, nas concentrações nominais de extrato 125; 62,5 e 31,25 μ g/mL	98
Figura 29 - Atividade anti-inflamatória in vivo após 6 horas de tratamento. Diferença de massa entre as orelhas tratadas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e dexametasona, nas concentrações nominais de extrato 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL	100
Figura 30 - Atividade anti-inflamatória in vivo após 4 horas de tratamento. Diferença de massa entre as orelhas tratadas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e dexametasona, nas concentrações nominais de extrato 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL	102
Figura 31 - Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton e tratamento tópico por 6 horas com EEF, EEF/ β CD, EER, EER/ β CD, β CD e dexametasona	105

Figura 32 - Região central do corte histológico de orelha de camundongo corados com azul de toluidina, aumento de 100x, com evidência de infiltração leucocitária 107

Figura 33 - Espessura da região da base das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)..... 108

Figura 34 - Espessura da região central das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)..... 109

Figura 35 - Espessura da região da ponta das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)..... 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- α CD – Alfa-ciclodextrina
- μ g – micrograma(s)
- μ L – microlitro(s)
- μ M – micromolar
- bar – Unidade de pressão
- β -caroteno – Beta-caroteno
- β CD – Beta-ciclodextrina
- AA – Ácido araquidônico
- AAG – Ácido acético glacial
- AAR – Atividade Antioxidante Relativa
- Abs – Absorvância
- AIEs – Anti-inflamatórios esteroidais
- AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
- $AlCl_3$ – Cloreto de alumínio
- ATR – *Attenuated total reflection*
- CBR – Centro de Biologia da Reprodução
- CCD – Cromatografia em camada delgada
- CDs – Ciclodextrinas
- CEUA – Comissão de ética no uso animal
- CI_{50} – Concentração Inibitória de 50 %
- CO_2 – Dióxido de carbono
- COX – Ciclo-oxigenase
- DCM – Diclorometano
- DCV – Doença cardiovascular
- D_h – Diâmetro hidrodinâmico
- DLS – *Dynamic light scattering*
- DM- β CD – Dimetil-beta-ciclodextrina
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

DTA – *Differential thermal analysis*

EEF – Extrato etanólico das folhas de *P. cauliflora*

EEF/ β CD – Fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *P. cauliflora*

EER – Extrato etanólico dos ramos de *P. cauliflora*

EER/ β CD – Fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *P. cauliflora*

EFC – Extrato de fumaça de cigarro

EPVA – Células epiteliais de pequenas vias aéreas

EROs – Espécies reativas de oxigênio

ESI – *Electrospray ionization*

ESI-MS – *Electrospray ionization mass spectrometry*

EtOH – Etanol

eV – Elétron volt

FDA – *Food and Drug Administration*

Fe²⁺ – Íon ferroso com número de oxidação 2+

Fe³⁺ – Íon férrico com número de oxidação 3+

g – Grama(s)

GSPs – Proantocianidinas de semente de uva

h – Hora(s)

HDL – *High Density Lipoproteins*

HE – Hematoxilina-eosina

HP- β CD – Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

HPLC – *High performance liquid chromatography*

H₂O_{dest.} – Água destilada

H₃PO₄ – Ácido fosfórico

IFAs – Insumos farmacêuticos ativos

IFN- γ – Interferon-gama

IL-8 – Interleucina-8

IV – Infravermelho

J774A.1 – Linhagem de macrófagos murinos

L – Litro

LPS – Lipopolissacarídeo

MDA – Malondialdeído
MeOH – Metanol
mg – miligrama(s)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MM – Mistura mecânica
MMP-1 – Metaloproteinase 1 da matriz
MTT – 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
m/z – Relação massa/carga
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NEED – N-(1-naftil)-etilenodiamina
nm – Nanômetro(s)
NO – *Nitric oxide*
NO₂⁻ – Nitritos
NPH – Nanoprecipitado hidrofóbico
NPS – Nanopartícula supramolecular
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORAC – *Oxygen Radical Absorbance Capacity*
P. cauliflora – *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel
Psi – *Pound force per square inch*
PZ – Potencial Zeta
q.s.p. – Quantidade suficiente para
SFB – Soro fetal bovino
TBA – Ácido tiobarbitúrico
TGA – *Thermogravimetric analysis*
TNF- α – Fator de necrose tumoral – alfa
Tr – Tempo de retenção
UFJF – Universidade Federal de Juiz de Fora
UVB – Ultravioleta B
UV-Vis – Ultravioleta visível
V – Volts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE E A ESPÉCIE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	19
2.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	20
2.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E ESTUDOS COM <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	24
2.3.1 Atividade antioxidante	25
2.3.2 Atividade anti-inflamatória	26
2.4 BIODISPONIBILIDADE E METABOLISMO DOS POLIFENÓIS	27
2.5 COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES	29
2.6 CICLODEXTRINA	32
3. OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	41
4.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL	41
4.3 PREPARO DOS FITOCOMPLEXOS COM β CD	41
4.4 IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DE <i>PLINIA CAULIFLORA</i>	42
4.4.1 Teor de flavonoide	42
4.4.2 Teores de fenóis totais e taninos	43
4.4.3 Identificação dos constituintes por HPLC-MS-Q-TOF	44
4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS SUPRAMOLECULARES	45
4.5.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	45
4.5.2 Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TGA)	46
4.6 ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP)	46
4.6.1 Determinação do tamanho de partícula por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS)	46
4.6.2 Determinação da condutividade elétrica e do potencial Zeta (PZ), na ausência e na presença de βCD	47

4.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
4.7.1	Sequestro de radicais livres (DPPH•)	48
4.7.2	Poder de redução do complexo fosfomolibdênio	48
4.7.3	Sistema β -caroteno/ácido linoleico	49
4.7.4	Inibição da formação de malondialdeído	50
4.8	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	51
4.8.1	Linhagem de células e cultura	51
4.8.2	Ensaio de redução metabólica do MTT	52
4.8.3	Redução da concentração de óxido nítrico	53
4.9	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	53
4.9.1	Animais	53
4.9.2	Atividade anti-inflamatória tópica	54
4.10	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	54
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	TEORES DE FENOIS TOTAIS, FLAVONOIDES E TANINOS	56
5.2	IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR HPLC-MS-Q-TOF	57
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS SUPRAMOLECULARES	73
5.3.1	Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)	73
5.3.2	Estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)	77
5.4	ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP) DOS NANOPRECIPITADOS HIDROFÓBICOS	80
5.4.1	Condutividade elétrica	81
5.4.2	Potencial Zeta (PZ)	82
5.4.3	Diâmetro hidrodinâmico por DLS - $\langle D_h \rangle$	83
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	86
5.6	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	94
5.7	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	98
5.8	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	104
6.	CONCLUSÃO	112
	REFERÊNCIAS	113

ANEXO 1	138
ANEXO 2	139
ANEXO 3	140

1. INTRODUÇÃO

No Brasil observa-se um crescimento na utilização de fitoterápicos pela população, e basicamente, dois fatores poderiam explicar este aumento: o primeiro seria os avanços ocorridos na área científica, que permitiram o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes; o segundo é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas e menos onerosas, destinadas ao atendimento primário à saúde (HASENCLEVER et al., 2017).

Somado a isso, o nosso país possui a maior diversidade de flora do planeta, com mais de 55 mil espécies de plantas ou 22 % do total mundial (MMA, 2014). Em 2014, por volta de 41 mil espécies da flora foram catalogadas, o que concentra cerca de 11 a 14 % da diversidade de plantas do planeta (MMA, 2014). Esses dados confirmam o papel de destaque do país perante o mundo, e que, por representar uma vasta biodiversidade, atrai tanto interesses econômicos, botânicos, farmacológicos e turísticos.

Diante desse cenário, a jabuticaba, conhecida como a “árvore de uva brasileira”, é nativa da Mata Atlântica do Brasil e possui um centro secundário de disseminação no Paraguai e na Argentina (IDEMIR et al., 2010). Ela é oriunda da família Myrtaceae, amplamente distribuída no Brasil. Seu fruto é consumido *in natura*, bem como na forma de licores, vinhos, geleias e doces, cujo consumo tem aumentado no Brasil e no exterior (FORTES et al., 2011; ABE, LAJOLO & GENOVESE, 2012).

Algumas descobertas mostram a capacidade da jabuticaba em reduzir o processo oxidativo (REYNERTSON et al., 2008), a hiperglicemia associada a resistência à insulina (DRAGANO et al., 2013) e a dislipidemia (ARAÚJO et al., 2014). Além disso, a espécie tem comprovado efeito hipotensor e vasodilatador dependentes do endotélio vascular, efeitos estes mediados pela via do óxido nítrico (LOBO DE ANDRADE et al., 2015).

Atualmente, os produtos naturais bioativos despertaram o interesse dos pesquisadores como bons candidatos a fármacos por apresentarem baixo potencial toxicológico e alta eficácia terapêutica (VALLI et al., 2018; VALLE, 2018). Em contra partida, eles apresentam uma estabilidade limitada, dependendo das condições do meio, como a temperatura, luminosidade e pH (THAKUR et al., 2011). Alguns antioxidantes naturais são bastante instáveis durante a colheita, transporte, armazenamento e processamento. Por exemplo, o escurecimento de frutas e vegetais

através da oxidação de compostos fenólicos é uma das principais causas da redução da qualidade desses produtos naturais (MATHEW & PARPIA, 1971).

Como forma de melhorar as propriedades físico-químicas dos compostos bioativos e, possivelmente, suas atividades biológicas, o encapsulamento molecular é amplamente utilizado pelas indústrias de cosméticos e medicamentos, visando aumentar a estabilidade química, a taxa de dissolução, permeabilidade de membrana e biodisponibilidade de moléculas de baixa solubilidade (SZENTE & SZEJTLI, 2004). Além disso, há também algumas aplicações na indústria alimentícia, como potencializador ou mascarador de sabor, além de proteger contra a degradação e evaporação do alimento (GOUIN, 2004).

Muitos sistemas nanocarreadores solúveis em água possuem capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas formando uma estrutura supramolecular, a qual fornece características desejáveis, como a melhora da farmacocinética, vetorização na molécula nos tecidos específicos e diminuição dos efeitos adversos (MOYA-ORTEGA et al., 2012). Por causa da capacidade única de formar complexos de inclusão supramolecular e muitas outras propriedades físico-químicas e biológicas favoráveis, as ciclodextrinas (CDs) naturais e seus derivados têm sido aplicados em sistemas de entrega de fármacos, visando aumentar a solubilidade, estabilidade e absorção deles (UEKAMA et al, 1998; ZHU et al., 2016).

As CDs (oligossacarídeos cíclicos naturais compostos por 6, 7 ou 8 unidades de D(+)-glicose ligadas por ligações α -1,4 e denominadas α -, β - ou γ -CD, respectivamente) são moléculas quimicamente e fisicamente estáveis, formadas pela modificação enzimática do amido (CRINI, 2014). Elas podem auxiliar na absorção transdérmica de fármacos melhorando a solubilidade, estabilidade, liberação e/ou permeação dos mesmos. Provavelmente, a característica mais importante das moléculas encapsuladas em CDs é o aumento da solubilidade em água, principalmente de compostos hidrofóbicos (KALOGEROPOULOS et al., 2009).

Algumas formulações já conhecidas com seu uso são: a α CD com miconazol; a β CD com clorafenicol, betametasona, indometacina e piroxican, visando melhorar a liberação e/ou permeação do fármaco. A encapsulação de compostos bioativos isolados de vegetais com β CD e derivados tem sido promissor, como visto, por exemplo, os alcaloides (ROCKS et al., 2012) e compostos fenólicos (ZHAO et al., 2010; LI et al., 2011; FOLCH-CANO et al., 2013; ZHOU et al., 2013), além de matrizes

complexas, como os óleos essenciais (KFOURY et al., 2018; RAKMAI et al., 2018), extrato enriquecido de flavonoides (KALOGEROPOULOS et al., 2009) e o extrato das folhas de *Bryophyllum pinnatum*, conhecida como “folha da fortuna” (LANNA et al., 2016).

A maioria das atividades biológicas relatadas sobre a jabuticaba é oriunda do seu fruto inteiro ou da casca, que devido a sua característica adstringente é popularmente conhecido para o tratamento da diarreia, irritação da pele, inflamação intestinal, além de aumentar a lipoproteína de alta densidade (HDL) e melhorar a resistência à insulina em modelo obesidade (REYNERTSON et al., 2006; LIMA et al., 2009; LEITE-LEGATTIA et al., 2012). Um levantamento das plantas medicinais utilizadas na região Nordeste do Brasil por Agra et al. (2008) mostrou que a decocção das folhas e ramos de jabuticaba é utilizada para o tratamento da diarreia e disenteria, e o xarope é usado para tratar tosse e bronquite. No entanto, é necessário mais estudos que avaliem as atividades biológicas dos extratos obtidos das folhas e ramos de jabuticaba, destacando a importância do reaproveitamento e da sustentabilidade em seus aspectos socioambientais, principalmente pela utilização dos ramos. Além disso, não há relatos na literatura sobre atividades antioxidante e anti-inflamatória de formulações com extratos de jabuticaba e β -ciclodextrina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A FAMÍLIA MYRTACEAE E A ESPÉCIE *PLINIA CAULIFLORA*

A família Myrtaceae está inserida na ordem Myrtales, abrangendo cerca de 40 % do total das espécies da ordem (SOUZA & LORENZI, 2013; SILVA & MAZINE, 2016) Compreende aproximadamente 4.630 espécies e 144 gêneros (JUDD et al. 2009). No Brasil são conhecidas 1.034 espécies e 23 gêneros das quais 297 espécies e 17 gêneros têm ocorrência assinalada para o estado de São Paulo (BFG, 2015; SILVA & MAZINE, 2016).

As espécies dessa família são plantas lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas inteiras, de disposição alternada ou oposta e às vezes oposta cruzada, com estípulas muito pequenas. Suas flores são em geral brancas ou às vezes vermelhas, efêmeras hermafroditas, de simetria radial (JOLY, 1966). Encontram-se inseridos nesta família desde pequenos arbustos de não mais que 2 metros de altura, como a *Myrcia salzmanni*, até grandes árvores com mais de 100 m, como algumas espécies de *Eucalyptus* nativas das florestas australianas (CRONQUIST, 1981).

A *Plinia cauliflora* é popularmente conhecida como jaboticabeira, jaboticabapnhema, jaboticaba-açu, jaboticaba-paulista, jaboticaba-açu-paulista, jaboticabahíbrida e é sinônimo de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Plinia jaboticaba* (Vell.) Kausel, *Myrcia jaboticaba* (Vell.) Baill e *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg. O epíteto específico de cauliflora reflete esse hábito da flor incomum e as frutas amadurecem rapidamente dentro de 40 - 60 dias. A polpa é branca, contendo de 1 - 4 sementes. Essa espécie, conhecida como “pequena árvore”, possui de 3 - 6 metros de altura, com casca cinza suave. Suas folhas são normalmente de 2 - 6 cm de comprimento, com veias finamente reticulada (LORENZI et al., 2006).

Figura 1 - Árvore de jabuticaba



Fonte: RURAL PECUÁRIA (2016). Disponível em: <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/fruticultura/respostas-de-especialistas-sobre-o-cultivo-de-jabuticaba.html>>

2.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *PLINIA CAULIFLORA*

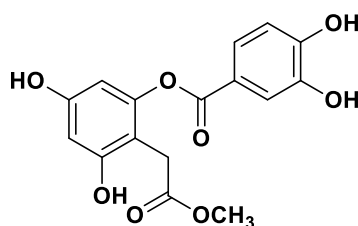
Através da prospecção fitoquímica de folhas de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Myrtaceae) por cromatografia em camada delgada (CCD), Souza-Moreira et al. (2010) mostraram presença de flavonoides e taninos, e os extratos polares, contendo essas substâncias, apresentaram alta atividade antioxidante. Em 2011 e 2013, Souza-Moreira et al. descreveram a presença de taninos hidrolisáveis como os ácidos gálico e elágico e derivados de flavonoides nas folhas. Recentemente, esse mesmo autor identificou e isolou, pela primeira vez nas folhas de *P. cauliflora*, dois derivados diferentes da quercetina, a quercetina-3-O- β -glicopiranosídeo (isoquercitrina) e quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo e da miricetina, a miricetina-3-O- β -galactopiranosídeo e miricetina-3-O- β -alopiranosídeo (SOUZA-MOREIRA et al., 2018).

A maioria dos estudos concentraram-se sobre os frutos, especialmente as cascas. Mais de trinta compostos fenólicos foram previamente isolados ou detectados a partir de jabuticabas. As antocianinas foram os principais constituintes em jabuticabas frescas e, atualmente, a maior parte dos relatos da literatura tem se concentrado principalmente sobre esses pigmentos (VEGGI, et al. 2011; LEITE-LEGATTI et al., 2012). As principais antocianinas presentes nas cascas de jabuticaba incluem delphinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo (BAILÃO et al., 2015).

Em 2006, Apel et al. estudaram a composição do óleo essencial das folhas dessa árvore e relataram que o espatulenol e óxido de cariofileno são os dois principais constituintes. A composição dos constituintes voláteis de jabuticabas também foi estudada por Plagemann et al. (2012). Terpenos e álcoois, bem como os ácidos orgânicos dodecanóico, tetradecanóico, ácidos hexadecanóico e ácido cinâmico, foram os mais abundantes (PLAGEMANN et al., 2012).

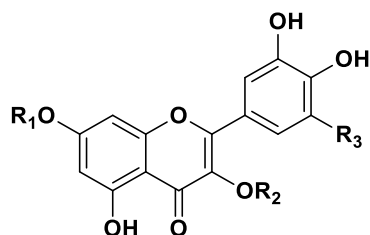
Reynertson et al. (2006) isolou pela primeira vez um novo depsídeo, a jabuticabina (Figura 2). Além disso, foram identificados a partir de espécies de jabuticaba, pelo mesmo grupo, o depsídeo 2-O-(3,4-di-hidroxibenzoil)-2,4,6-tri-hidroxifenilacético, piranocianina B, ácido cinâmico, ácido O-cumarico, ácido protocatecúico, isoquercitrina (1), quercimeritrina (2), quercitrina (3), miricitrina (4), quercetina (5), rutina (6) (Figura 3) e ácidos gálico e elágico (Figura 4). Os compostos da figura 3, exceto a rutina (6), foram confirmados por meio da análise de HPLC-Q-TOF-MS e experimentos de co-injeção por WU et al. (2012).

Figura 2 - Polifenol depsídeo identificado nos frutos de jabuticaba



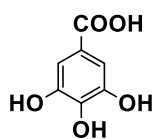
Jabuticabina

Fonte: Adaptada de REYNERTSON et al. (2006); WU et al. (2012).

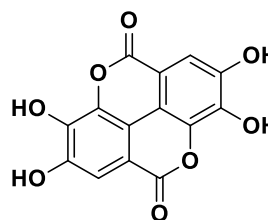
Figura 3 - Flavonoides presentes nos frutos e folhas de jabuticaba

Isoquercitrina	(1) R ₁ =H; R ₂ =Glc; R ₃ =H
Quercimeritrina	(2) R ₁ =Glc; R ₂ =H; R ₃ =H
Quercitrina	(3) R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =H
Miricitrina	(4) R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =OH
Quercetina	(5) R ₁ =H; R ₂ =H; R ₃ =H
Rutina	(6) R ₁ =H; R ₂ =Rut; R ₃ =H

Fonte: Adaptada de REYNERTSON et al. (2006); WU et al. (2012).

Figura 4 - Taninos presentes nos frutos e folhas de jabuticaba

Ácido gálico



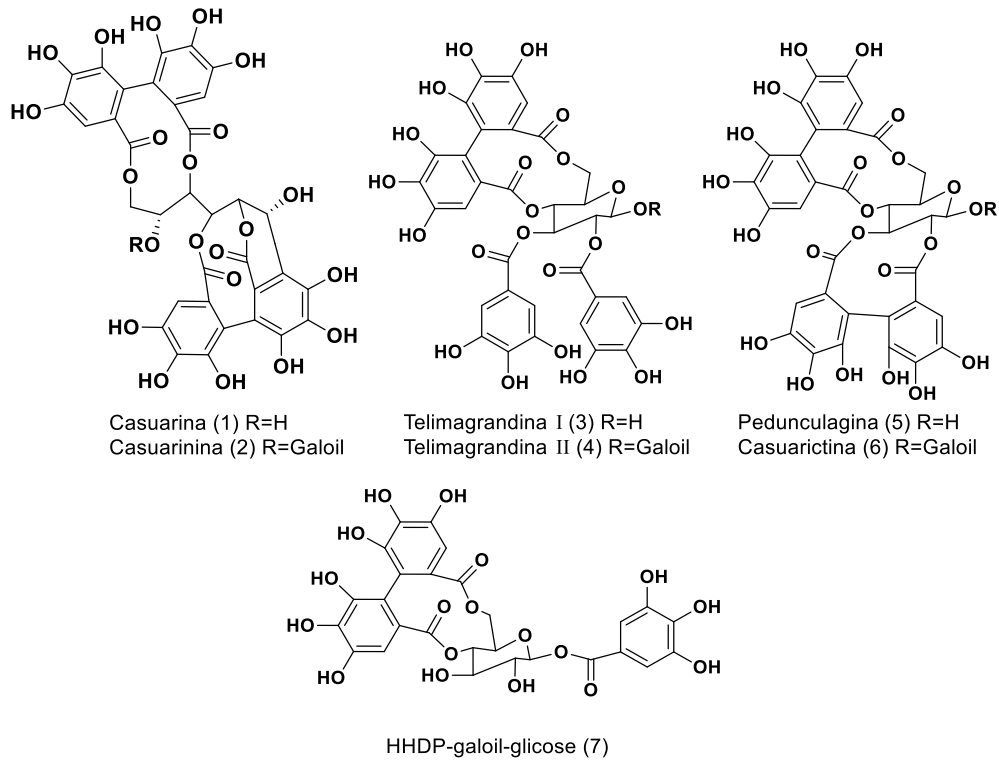
Ácido elágico

Fonte: Adaptada de REYNERTSON et al. (2006); WU et al. (2012).

Em 2012, Wu et al. encontraram sete galotaninos (Figura 5 (1-7)), juntamente com dois derivados do ácido elágico, dilactona do ácido valoneico e ácido elágico pentosídeo (Figura 8 (4-5)), detectados pela primeira vez no extrato metanólico do fruto de jabuticaba. Suas estruturas foram determinadas pela análise detalhada de seus padrões de fragmentação espectral de massa (LCMS). Além disso, Wu et al. (2013) isolaram e identificaram, dos frutos de jabuticaba, dois elagitaninos, a iso-oenoteina C (Figura 7 (1)) e oenoteina C (Figura 7 (2)).

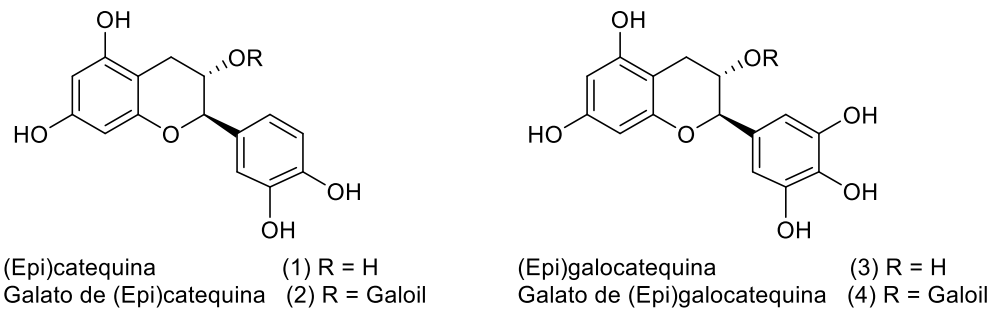
O estudo de Zhao et al. (2019) identificaram experimentalmente pela primeira vez os galotaninos e derivados do ácido elágico a partir do tronco e da casca da árvore, tais como a casuarinina (Figura 5 (2)) e casuarictina (Figura 5 (6)), ácido 3,3'-dimetilelágico-4-O-sulfato (Figura 8 (1)) e castalagina (Figura 8). A castalagina e derivados do ácido elágico também foram encontrados na casca e semente do fruto de jabuticaba por Inada et al. (2020). Além disso, monômeros de proantocianidinas foram detectadas nos frutos de jabuticaba por HPLC-ESI-MSMS, tais como os monômeros de flavan-3-ol: (epi)catequina (Figura 6 (1)), galato de (epi)catequina (Figura 6 (2)), (epi)galocatequina (Figura 6 (3)) e galato de (epi)galocatequina (Figura 6 (4)) (INADA et al., 2020).

Figura 5 - Galotaninos encontrados nos frutos e tronco da jabuticabeira

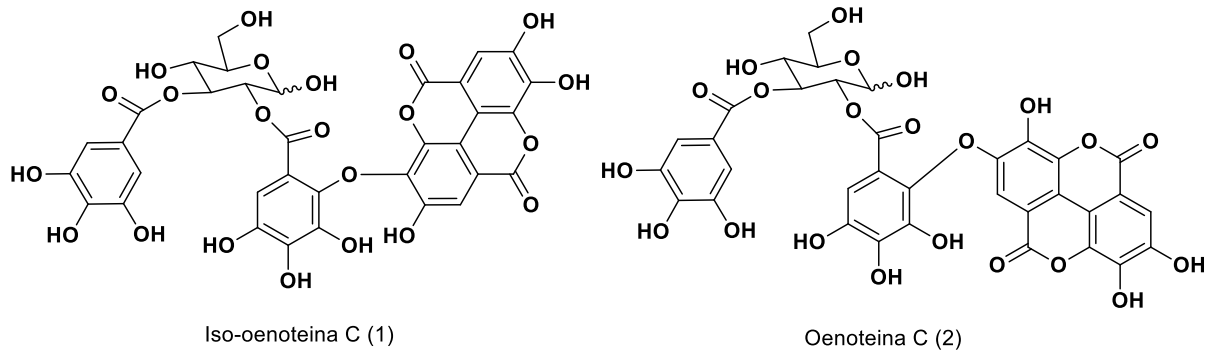


Fonte: Adaptado de WU et al. (2012).

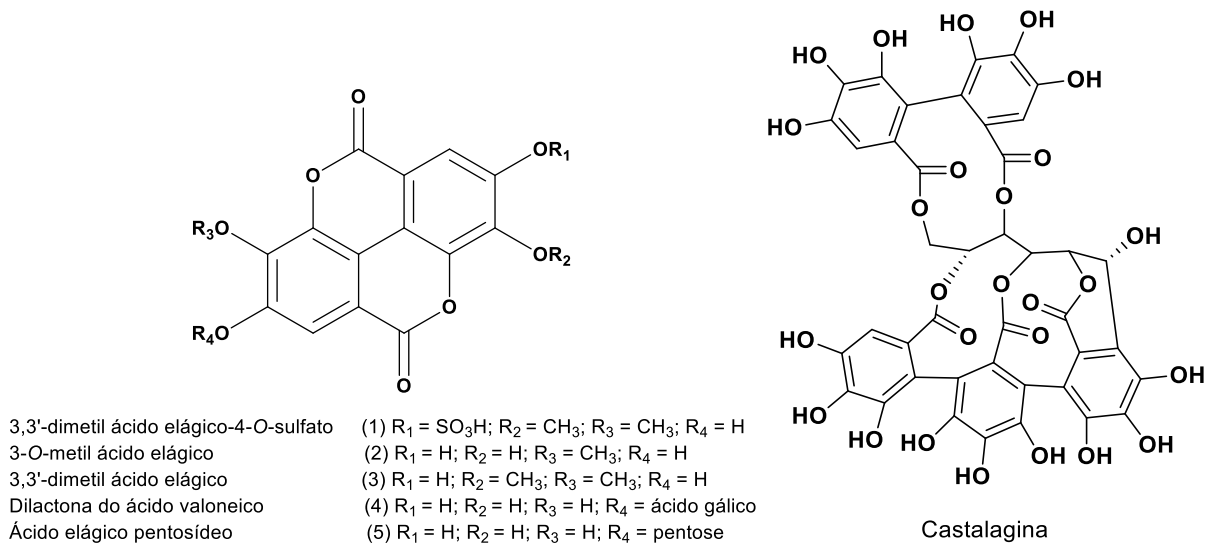
Figura 6 - Monômeros de proantocianidinas encontrados nos frutos de jabuticaba



Fonte: Adaptado de INADA et al. (2020).

Figura 7 - Elagitaninos encontrados nos frutos de jabuticaba

Fonte: Adaptado de WU et al. (2013).

Figura 8 - Substâncias fenólicas encontradas nos frutos, tronco e na casca da árvore de jabuticaba

Fonte: Adaptado de WU et al. (2012); ZHAO et al. (2019); INADA et al. (2020).

2.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS E ESTUDOS COM *PLINIA CAULIFLORA*

Fenólicos naturais presentes na dieta, tais como flavonoides, antocianinas, taninos e outros polifenóis, são considerados importantes para a saúde humana. Há muitas evidências epidemiológicas de que as dietas ricas em frutas comestíveis de cor escura podem reduzir a incidência de doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e derrame (CROZIER et al., 2009). Estes efeitos protetores são atribuídos, em parte, a metabólitos secundários, como os fenólicos, especialmente as antocianinas. Por essa razão, estas frutas comestíveis de cor escura, como mirtilo, uvas, romã e

jabuticaba, foram chamadas de "superfrutas" (AKTER et al., 2011; CROZIER et al., 2009; TOMÁS-BARBERÁN & ANDRÉS-LACUEVA, 2012).

2.3.1 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante ou de remoção de radicais livres é considerada uma atividade importante de frutas ricas em fenólicos, especialmente frutos comestíveis ricos em antocianinas. Estes metabólitos presentes comumente nos vegetais apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas (PANCHE, DIWAN & CHANDRA, 2016), tais como anti-inflamatória (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016) e antifúngicas (ALVES et al., 2014) e acredita-se que essas atividades biológicas sejam devido às suas propriedades antioxidantes (LIMA & BEZERRA, 2012). Choi et al. (2006) sugeriram que muitas atividades biológicas de plantas são devidas, principalmente, ao conteúdo de flavonoides e taninos.

Uma das consequências do estresse oxidativo descontrolado (desequilíbrio entre os níveis de pró-oxidante e antioxidante a favor dos pró-oxidantes) são lesões em células, tecidos e órgãos. Esse dano oxidativo está estreitamente relacionado ao processo inflamatório, uma vez que os radicais livres são produzidos por células do sistema imune que possuem participação ativa no surgimento da inflamação (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016).

Há muito tempo se reconhece que altos níveis de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem infligir danos diretos aos lipídios. Em resposta à peroxidação lipídica da membrana, e de acordo com as circunstâncias metabólicas e capacidades de reparo celulares específicas, as células podem promover a sobrevivência celular ou induzir a morte celular. Sob taxas fisiológicas ou baixas de peroxidação lipídica (condições subtóxicas), as células estimulam sua manutenção e sobrevivência através de sistemas de defesa antioxidantes constitutivos ou ativação de vias de sinalização que regulam positivamente as proteínas antioxidantes, resultando em uma resposta adaptativa ao estresse. Em contraste, sob taxas médias ou altas de peroxidação lipídica (condições tóxicas) a extensão do dano oxidativo supera a capacidade de reparo, e as células induzem morte celular programada por apoptose ou necrose; ambos os processos acabam por levar a danos celulares moleculares que podem facilitar o desenvolvimento de vários estados patológicos e o envelhecimento acelerado (PHANIENDRA et al., 2015).

A jabuticaba tem um grande potencial antioxidante, e tal característica se deve, principalmente, pela presença de compostos fenólicos. Tais compostos possuem papel quelante sobre os radicais oxidantes, podendo agir neutralizando as espécies reativas por meio da doação de elétrons ou prótons, e/ou sequestrar os metais catalizadores da formação de radicais livres, entre outras ações (WU, LONG & KENNELLY, 2013; LENQUISTE et al. 2015). Na literatura, os trabalhos avaliam, em sua maior parte, a atividade antioxidante dos frutos (DE SOUZA et al., 2017) e da casca (LIMA et al., 2011) de jabuticaba pelos ensaios de redução do complexo fosfomolibdênio, inibição do radical DPPH e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Embora Souza-Moreira et al. (2010) tenham determinado a capacidade antioxidante das folhas de *P. cauliflora* através da eliminação do radical DPPH, há poucos relatos na literatura sobre as folhas, sobretudo os ramos, para essa atividade.

Dentre as metodologias já conhecidas para produtos naturais o ensaio de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), ensaio de inibição do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico são muito utilizados (MELO & MANCINI FILHO, 1989; PRIETO et al., 1999; HUANG, OU & PRIOR, 2005; WU et al., 2013).

2.3.2 Atividade anti-inflamatória

Plantas medicinais contendo uma diversidade de fenólicos foram usadas por séculos para fins terapêuticos, e possuem um potencial papel na promoção da atividade anti-inflamatória. Gu et al. (2004 e 2005), Katiyar et al. (1997) e Mittal et al. (2003) descobriram que o tratamento tópico ou a ingestão dietética de proantocianidinas da semente de uva (GSPs) e da silimarina, um flavonoide obtido da planta cardo leite (*Silybum marianum*(L.)Gaertn), inibiram o edema induzido pela radiação UVB, eritema, infiltração de leucócitos inflamatórios e atividade de mieloperoxidase na pele de camundongos. Nichols e Katiyar (2009) mostraram que a mesma silimarina inibiu a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) induzida por UVB e, subsequentemente, a produção de metabólitos da prostaglandina, que são considerados promotores dos tumores de pele.

Embora a inflamação seja indispensável para manutenção da homeostase corporal, a exacerbação da resposta inflamatória gera um desconforto que, em alguns casos, exige o uso de medicamentos, para minimizar os danos teciduais e

proporcionar mais conforto ao paciente. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios utilizados são os glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (RANG et al., 2012). Tais agentes são capazes de reduzir o processo inflamatório, porém seu uso prolongado pode levar ao aparecimento dos efeitos adversos, principalmente os AINES, tais como úlceras pépticas, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio (MAROON, BOST & MAROON, 2010; MARCUM & HANLON, 2010). Por esse motivo, o interesse de se estudar novas substâncias de origem natural com potencial anti-inflamatório tem aumentado nos últimos anos.

Os frutos da jabuticaba são conhecidos por apresentar uma poderosa atividade anti-inflamatória e antioxidante. A jabuticabina (Figura 2), a delfinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo, encontrados nos frutos da jabuticaba, são conhecidos por inibirem a interleucina oito (IL-8) induzida por extrato de fumaça de cigarro (EFC) em células epiteliais de pequenas vias aéreas (EPVA) (REYNERTSON et al., 2006). O ácido elágico também inibe a expressão da metaloproteinase 1 da matriz (MMP-1) e IL-8 *in vitro* (DASTMALCHI et al., 2012). Recentemente, um derivado do ácido elágico, o ácido 3,3'-dimetilelágico-4-O-sulfato (Figura 8 (1)), presente no tronco da árvore da jabuticaba, foi isolado e identificado pela primeira vez no estudo de Zhao et al. (2019) e exibiu atividades anti-inflamatórias nas células EPVA expostas à EFC.

A busca por novos candidatos a fármacos de origem natural é necessário, uma vez que os produtos naturais bioativos possuem grande potencial terapêutico, sendo, na sua maioria, mais seguros e eficazes. Portanto, é importante avaliar a atividade anti-inflamatória da árvore de jabuticaba, sobretudo das folhas e ramos de *P. cauliflora*, através de ensaios que comprovam a capacidade de redução de alguns mediadores inflamatórios como, por exemplo, o ensaio de redução do óxido nítrico (NO) em linhagens de macrófagos e citocinas inflamatórias.

2.4 BIODISPONIBILIDADE E METABOLISMO DOS POLIFENOIS

A biodisponibilidade e o metabolismo dos polifenóis podem influenciar muito a sua eficácia diante das atividades biológicas. A biodisponibilidade dos polifenóis individualmente pode ser influenciada pela sua diversidade estrutural. Pequenas moléculas como os monômeros de catequina, podem ser facilmente absorvidas pela barreira intestinal, enquanto os polifenóis de grande peso molecular, como

proantocianidinas e mesmo (-)-epigallocatequina-3-galato, são pouco absorvidos. Uma vez absorvidos, os polifenóis são conjugados pelos grupos glicuronídeo, sulfato e metil na mucosa intestinal e nos tecidos internos. Os polifenóis não conjugados estão virtualmente ausentes no plasma. Tais reações facilitam sua excreção e limitam sua toxicidade potencial, se houver (SCALBERT et al., 2002).

Durante a digestão no intestino, as grandes moléculas polifenólicas se dividem em múltiplas moléculas pequenas ou metabólitos e podem, sistemicamente, induzir efeitos benéficos no organismo. Proantocianidinas poliméricas não são absorvidas como tal no intestino. A detecção dos dímeros de proantocianidina B1 e B2 no plasma humano indicou que a absorção deles era 100 vezes menor do que a dos flavonoides monoméricos (SCALBERT et al., 2002).

Para que um composto químico possa exercer sua atividade biológica, ele deve atingir o alvo fisiológico numa concentração mínima que determine tanto esse efeito biológico quanto o mecanismo de ação. A ingestão diária de vários gramas de compostos bioativos não necessariamente reflete a dose em que atingirá o alvo fisiológico (OLIVEIRA & BASTOS, 2011). Devido ao grande número de compostos estruturalmente diferentes, à captação limitada e à biodisponibilidade de alguns fitoquímicos, eles são reconhecidos pelo organismo como xenobióticos (HOLST & WILLIAMSON, 2008), estimulando os mecanismos de detoxificação e defesa antioxidante. Isso explica a relação entre o consumo diário de compostos fenólicos e as baixas concentrações (micromoles) desses compostos nos organismos (OLIVEIRA & BASTOS, 2011).

No caso de administração tópica dos polifenóis, a penetração na pele é limitada e requer formulações tópicas à base de solventes para ser bem sucedida, como orgânicos ou lipossolúveis que podem aumentar a penetração dos polifenóis (NICHOLS & KATIYAR, 2009). Além disso, os antioxidantes são por natureza sujeitos à oxidação, o que limita sua estabilidade no produto durante o armazenamento, processamento e digestão de alimentos e, portanto, sua capacidade de ser absorvido no lúmen intestinal (HOLST & WILLIAMSON, 2008).

A complexação de um fármaco em ciclodextrina pode promover modificações vantajosas em suas propriedades físico-químicas, como o aumento da solubilidade em meio aquoso e da taxa de dissolução, podendo contribuir assim para um aumento da biodisponibilidade dos fármacos e redução dos efeitos colaterais, que

consequentemente, leva ao aumento da qualidade de vida dos pacientes (RODINELLI, 2005; CUNHA-FILHO et al., 2007; LANNA et al., 2016).

2.5 COMPLEXOS SUPRAMOLECULARES

A química supramolecular é a química das interações moleculares, da auto-organização e do reconhecimento molecular. Conceituada por Lehn (LEHN, 1988; LEHN, 1995) como a “química além da molécula”, este ramo fundamenta-se no entendimento das interações e afinidades específicas entre moléculas que originam sistemas ou estruturas de maior complexidade, cada molécula agindo sinergisticamente uma com as outras, contemplando um propósito bem definido (TOMA, 2007).


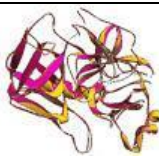
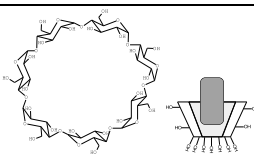
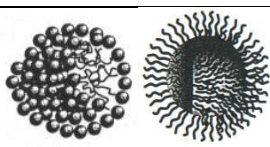
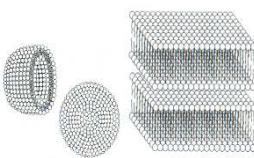
O estudo científico desse sistema ganhou seu espaço no final do século XIX quando bioquímicos descobriram que a relação enzima substrato se dava através de ligações não covalentes e, posteriormente, um estudo mais detalhado de células e organelas permitiu a descoberta de que no meio biológico as interações não covalentes desempenham papel fundamental nas funções bioquímicas (DENADAI, 2005).

Na tabela 1 estão exemplificados alguns sistemas supramoleculares conhecidos, bem como suas aplicações. A maioria dos sistemas supramoleculares é formada por pelo menos algum tipo de molécula anfifílica. Compreende-se que, substâncias anfifílicas são compostos que apresentam pelo menos duas características distintas: uma hidrofílica, formada por grupos polares ou iônicos; e uma hidrofóbica, formada geralmente por cadeias hidrocarbônicas (SAENGER, 1980; ISRAELACHVILI, 1991; DENADAI, 2005). Tal sistema confere a capacidade de formar diversos tipos de interações intermoleculares devido a característica anfifílica das moléculas.

Resumidamente, essas interações podem ser classificadas como interações de curta e longa distâncias. A primeira é caracterizada pelas ligações de hidrogênio, interações dipolares (dipolo permanente-dipolo permanente, dipolo permanente-dipolo induzido, dipolo induzido-dipolo induzido, múltipolos induzidos), interações eletrostáticas (ion-íon e íon-dipolo); enquanto que as interações a longa distância são como efeitos de exclusão de volume que são responsáveis por modificações na estrutura do solvente e interações devidas ao efeito hidrofóbico. Ambas as interações apresentam tanto aspectos energéticos como aspectos entrópicos, entretanto a

componente energética geralmente prevalece nas interações de curta distância e a componente entrópica prevalece nas interações de longa distância (ISRAELACHVILI, 1991; BLOKZIJL & ENGBERTS, 1993; DENADAI, 2005).

Tabela 1 - Exemplos de sistemas supramoleculares, período de descoberta e suas aplicações tecnológicas

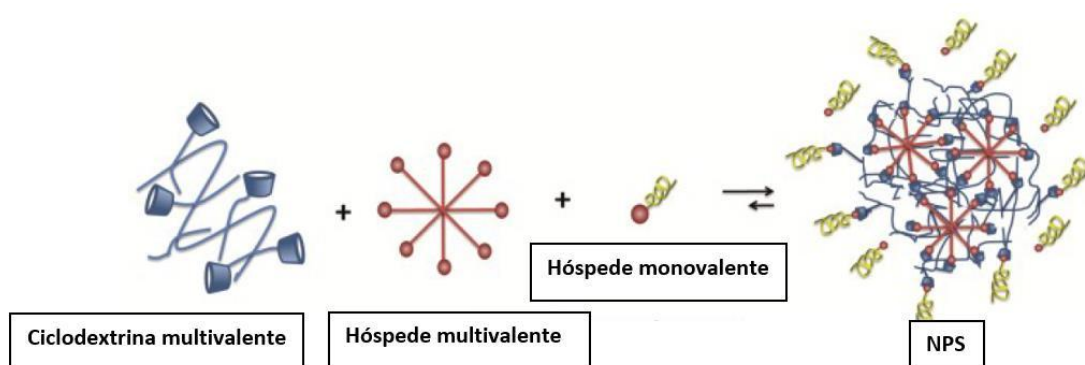
Sistemas Supramoleculares	Descoberta	Utilidade Tecnológica
 <p>DNA e RNA</p>	1953 e 1965 respectivamente	Armazenamento e transferência de informações.
 <p>Complexos enzimáticos</p>	Século XVII	Reações bioquímicas, catálise, reconhecimento molecular.
 <p>Ciclodextrinas e seus compostos de inclusão</p>	1948	Encapsulamento molecular, liberação sustentada de fármacos, solubilização de materiais insolúveis em água, emulsificação, catálise, etc.
 <p>Micelas de surfactantes sintéticos</p>	1918	Detergência, solubilização de materiais em água ou solventes orgânicos, formação de filmes, liberação controlada, extração avançada.
 <p>Vesículas e bicamadas biológicas</p>	Século XIX	Constituintes de membranas celulares ou sintéticas. Servem de barreira para difusão livre de moléculas. Permitem o encapsulamento de muitas substâncias ao mesmo tempo, como nas organelas celulares.

Fonte: Adaptado de DENADAI (2005).

A ciência supramolecular quando trazidas ao campo da nanotecnologia formam as nanopartículas supramoleculares (NPSs). O sistema NPS demonstra grande versatilidade por abordar tanto a estrutura hóspede-hospedeiro quando o conceito de multivalência das moléculas envolvidas (TOMIOTTO-POLLISSIER et al., 2017).

As NPSs são candidatos ideais para as novas tendências da biomedicina, devido a sua natureza multifuncional de permitir com que a carga no seu interior seja incorporada e liberada para o meio sem a necessidade de redesenvolvimento de todo o sistema. Em resumo, elas são múltiplas cópias de “tijolos” de construção ligados por ligações não covalentes que resultam na montagem de “blocos de construção” ainda maiores. No esquema representativo de formação das NPSs (Figura 9) vê-se um sistema contendo ciclodextrina, um hóspede multivalente e um agente monovalente para controlar o tamanho da partícula foram adicionados (DENADAI, 2005; MEJIA-ARIZA et al., 2017).

Figura 9 - Esquema representativo de formação de nanopartículas supramoleculares



Fonte: Adaptado de MEJIA-ARIZA et al. (2017).

A nanoprecipitação é um método de troca de solvente para a dispersão de nanopartículas poliméricas utilizando polímeros pré-formados e foi descrita pela primeira vez por Fessi et al. (1989). A amostra é dissolvida em um bom solvente menos polar que a água (usualmente um solvente miscível em água, volátil, que é facilmente removido após o processo, por exemplo, acetona) e adicionado a um anti-solvente (normalmente água) sob agitação. Esse processo pode ser revertido; a água, por exemplo, pode ser adicionada ao polímero dissolvido no solvente volátil. O princípio básico por trás da técnica envolve a rápida difusão do solvente na fase aquosa e a diminuição subsequente da tensão interfacial entre as duas fases. Isso aumenta a área de superfície e leva à formação de pequenas gotículas de solvente orgânico, podendo ser chamado de nanoprecipitado hidrofóbico (RAO et al., 2011).

2.6 CICLODEXTRINA

O uso de ciclodextrinas (CDs) é bastante promissor mediante à possibilidade de formação de complexos supramoleculares com componentes de um extrato vegetal, uma matriz complexa, produzindo um fitocomplexo supramolecular. A presença de numerosas hidroxilas aromáticas na estrutura de compostos fenólicos leva à limitações sob aplicações farmacêuticas devido à baixa solubilidade no meio fisiológico (PRALHAD & RAJENDRAKUMAR, 2004; WANG Y.J. et al., 2014). Portanto, as CDs podem hospedar esses compostos em concentração suficiente durante todo o tempo de tratamento e direcioná-las para o local de ação desejado (LANNA et al., 2016), além de aumentar sua estabilidade no meio.

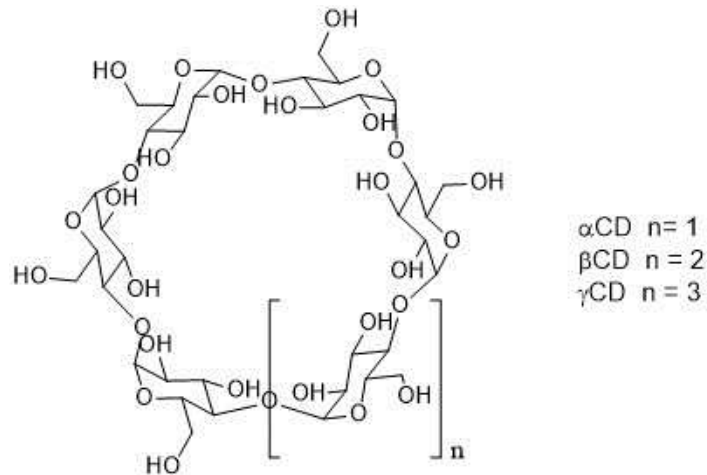
A catequina, por exemplo, é um polifenol que possui característica amarga, castanho e facilmente oxidável e, portanto, difícil de ser utilizado como medicamento ou como aditivo alimentar natural. Ela apresenta baixa estabilidade em soluções, decaindo em pelo menos 50 % durante o primeiro mês de armazenamento à temperatura ambiente (SU et al., 2003). Uma alternativa para melhorar a biodisponibilidade, a permeabilidade e estabilidade da formulação seria a inclusão em CDs (HE et al., 2004; ZHU et al., 2016). Carlotti et al. (2010) revelaram que o complexo de inclusão de quercetina com hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β CD) melhorou a fotoestabilidade e solubilidade dessa substância. Devido à presença da superfície externa hidrofílica e da cavidade central interna hidrofóbica, a CD permite facilmente formar complexos de inclusão com várias moléculas de fármaco através de interações hospedeiro-hóspede (XU et al. 2017).

No início, a maioria dos estudos concentrava-se nas propriedades dos compostos nativos e, particularmente, em seus efeitos nas reações orgânicas (FERNÁNDEZ & ROSSI, 2003; ROUGIER et al., 2011). A falta de toxicidade em humanos estimulou estudos sobre o uso como aditivo em produtos medicinais e nutricionais. Portanto, o uso da CD expandiu-se acentuadamente após o *Food and Drug Administration* (FDA) aprovar seu uso. Esse excipiente abre perspectivas promissoras quanto à possibilidade em melhorar a estabilidade, solubilidade, biodisponibilidade e controlar a liberação de compostos bioativos (ABBAS et al., 2015; NEVES et al., 2015). Além disso, os sistemas supramoleculares podem conferir o sinergismo entres os constituintes do extrato vegetal e ser capazes de potencializar a ação de substâncias bioativas em doses e efeitos adversos reduzidos.

Em particular, as áreas farmacêuticas estão interessadas no uso das CDs e seus derivados como excipientes. Recentemente, uma revisão do uso de CD em ciências farmacêuticas foi publicada e o termo “ciências farmacêuticas supramoleculares”, combinando química supramolecular e ciência farmacêutica, foi sugerido para essa área de pesquisa. Embora o uso de CD como agente para aumentar a solubilidade aparente e a biodisponibilidade de ingredientes ativos tenha sido estudado nos últimos 50 anos, há pouco tempo, investiga-se o papel potencial como insumos farmacêuticos ativos (IFAs) para o tratamento de diversas doenças, e o assunto é atualmente de grande interesse. Também pode-se destacar sua utilização para mascarar odores e sabores desagradáveis de certos fármacos, para reduzir ou eliminar irritações oculares ou gastrointestinais, na prevenção de interações e incompatibilidades e na conversão de fármacos líquidos em produtos sólidos (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; UEKAMA, 2004).

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos biodegradáveis produzidos por degradação enzimática do amido. Eles contêm várias unidades de α -D-glicose, as mais comuns contêm 6, 7 ou 8 unidades de glicose e são denominadas α , β e γ -ciclodextrinas, respectivamente (Figura 10). Sua descoberta pode ser rastreada desde 1891, quando Villiers relatou uma substância cristalina obtida a partir da digestão de amido por *Bacillus amylobacter*, que ele chamou de "celulosina". Uma década depois, Schardinger relatou dois produtos cristalinos diferentes, chamados de dextrina Schardinger, obtidos da digestão do amido de batata usando *Bacillus macerans*. Após mais de 30 anos, foi demonstrado que as dextrinas eram uma família de oligossacarídeos de 6, 7 e 8 unidades de glicose (1,4) ligadas (SZEJTLI, 1998; CRINI, 2014), conforme ilustrado na figura abaixo.

Figura 10 - Representação esquemática da α CD, β CD e γ CD

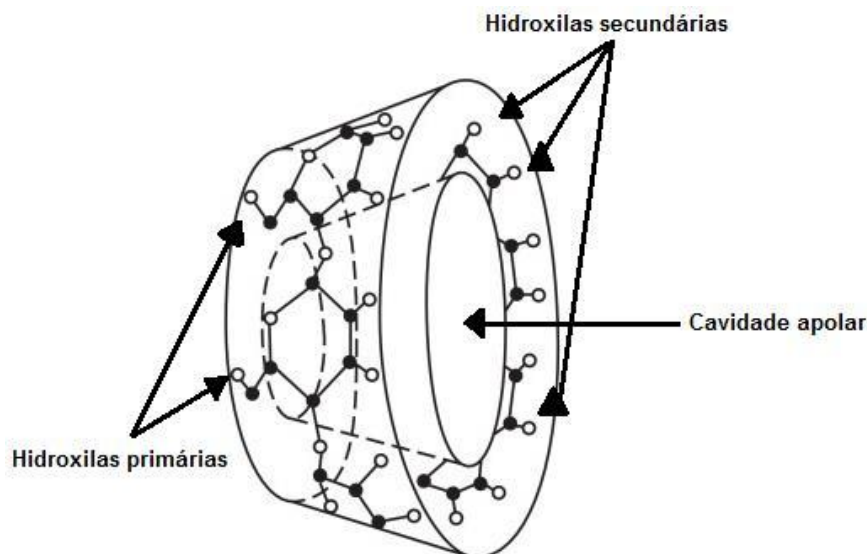


Fonte: Adaptado de DE PAULA et al. (2011).

Devido à ausência de livre rotação das ligações glicosídicas e da conformação em cadeira apresentada pelas unidades de glicose, sua conformação espacial é tronco-cônica, diferentemente de ser um cilindro perfeito (LOFTSSON et al., 2005). Os grupos hidroxílicos, referentes a água intersticial (hidrogênio aquoso ligado à amilose), orientam-se para o exterior do cone conferindo um caráter externo hidrofílico. As hidroxilas primárias estão posicionadas na cavidade estreita do cone enquanto que os grupos hidroxílicos secundários estão localizados na parte larga (Figura 11). A cavidade interna da CD é estruturada por esqueletos de carbono e pelas ligações éteres dos resíduos de glicose conferindo uma elevada densidade eletrônica. Esta conformação é a responsável pela solubilidade aquosa intrínseca das CDs, e ao mesmo tempo, grande capacidade de encapsular moléculas hidrofóbicas no interior da sua cavidade, constituindo a principal base de sua utilização farmacêutica (SÁ BARRETO & CUNHA-FILHO, 2008).

O tamanho de sua cavidade permite a seletividade para a complexação de moléculas hóspedes e, portanto, elas têm a capacidade de formar complexos de inclusão estabilizados por interações não covalentes com uma ampla variedade de compostos (LOFTSSON & BREWSTER, 1996; DENADAI et al., 2007; DE PAULA et al., 2011).

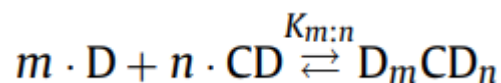
Figura 11 - Representação esquemática da estrutura tronco-cônica da ciclodextrina



Fonte: Adaptada de DENADAI et al. (2007).

Uma característica importante sobre a natureza das CDs é sua não toxicidade para os seres humanos. Elas são usadas ativamente em produtos farmacêuticos, incluindo formulações administradas via parenteral, que têm requisitos rigorosos em relação à tolerância humana. Várias publicações relatam listas completas de fármacos contendo CD que foram aprovados com sucesso por agências reguladoras nos EUA, na Europa e no Japão (LOFTSSON et al., 2005; LOFTSSON & DUCHÊNE, 2007).

Os complexos de inclusão com a CD são estruturas supramoleculares caracterizados por aprisionamento de uma molécula de caráter lipofílico ou, mais frequentemente, uma porção lipofílica da substância estudada fracamente solúvel em água na cavidade central hidrofóbica da CD. Quase sem exceção, a formação do complexo CD (D_mCD_n) é um processo reversível:



Equação 1

Onde, m moléculas de uma substância (D) se associam com n moléculas de CD para formar um complexo de estequiometria $m:n$. Na equação 1, $K_{m:n}$ é a constante de estabilidade do complexo, também conhecida como constante de ligação, constante de formação ou constante de associação.

A constante de estabilidade pode ser escrita da seguinte forma:

$$K_{m:n} = \frac{[D_m CD_n]}{[D]^m \cdot [CD]^n}$$

Equação 2

Onde, os colchetes denotam as concentrações molares (KURKOV & LOFTSSON, 2012).

Para que ocorra uma complexação, deve haver uma força motriz líquida favorável que atraia a molécula do fármaco para a cavidade da ciclodextrina, podendo ser interações eletrostáticas, contribuições de van der Waals, ligações de hidrogênio, liberação de deformação conformacional e interações de transferência de carga (LIU & GUO, 2002; BREWSTER & LOFTSSON, 2007).

Essas interações geram quatro etapas energeticamente favoráveis que ajudam a deslocar o equilíbrio para a formação complexa (ANON, 2006): (i) o deslocamento das moléculas de água (polar) da cavidade interna (apolar) da ciclodextrina; (ii) o aumento do número de ligações de hidrogênio formadas à medida que a água deslocada retorna a cavidade maior; (iii) uma redução nas interações repulsivas entre o ambiente hidrofóbico e o ambiente aquoso; e (iv) um aumento nas interações hidrofóbicas à medida que a molécula hóspede se insere na cavidade apolar da ciclodextrina (JAMBHEKAR & BREEN, 2016).

O tamanho da cavidade da ciclodextrina e da molécula hóspede reflete sobre a formação e dissociação de um complexo de inclusão, pois está associado à constante k (Equação 2), a qual indica afinidade da “molécula hóspede” para a cavidade da CD e estabilidade do complexo de inclusão. Como regra geral o complexo de inclusão é forte quando há complementariedade de tamanho entre a molécula hóspede e a cavidade da CD (CHALLA et al., 2005).

Com base nas dimensões, a α CD pode tipicamente formar um complexo com compostos de baixo peso molecular ou compostos com uma cadeia lateral alifática. A β CD complexará com moléculas aromáticas e heterocíclicas, e a γ CD acomodará moléculas maiores, como macrociclos e esteroides (DEL VALLE, 2003; RAO et al., 2011). A molécula hóspede também pode se ligar com a parte externa da CD, não formando complexo de inclusão (CHALLA et al., 2005). Na Tabela 2, é possível observar as dimensões das CDs de origem natural.

Tabela 2 - Dimensões das três ciclodextrinas naturais

Tipo de ciclodextrina	Número de unidades de glicose	Diâmetro interno da cavidade (Å)	Diâmetro externo da cavidade (Å)	Altura da cavidade (Å)	Volume da cavidade (Å)
α	6	4,7 – 5,3	14,6	7,9	174
β	7	6,0 – 6,5	15,4	7,9	262
γ	8	7,0 – 8,3	17,5	7,9	427

Fonte: Adaptado de MIRANDA et al., (2011); BAYKAL et al, (2019).

A estabilidade das CDs naturais é um fator interessante a ser explorado frente a diferentes meios biológicos como, por exemplo, em meios alcalinos ou ácidos. Sabe-se que em meios alcalinos as CDs se mantem estáveis sem alteração de sua estrutura, no entanto CDs naturais em solução 1M de HCl à 60 °C sofrem hidrólise em 6,7, 7,7 e 13,9 min para α CD, β CD e γ CD respectivamente. O que indica um aumento da taxa de abertura do anel das CDs em relação ao tamanho da molécula (IRIE & UEKAMA, 1997; JAMBHEKAR & BREEN, 2016).

As ligações glicosídicas presentes são degradadas no organismo pelas mesmas enzimas de degradação de amido. Essa degradação é bem mais lenta em relação a degradação dos açúcares de cadeias lineares. Em geral, elas são hidrolisadas pelas enzimas α -amilase que quebram as ligações α -1,4. A exemplo temos a amilase salivar e a pancreática que são capazes de hidrolisar as CDs com uma reatividade crescente na ordem α CD < β CD << γ CD (IRIE & UEKAMA, 1997).

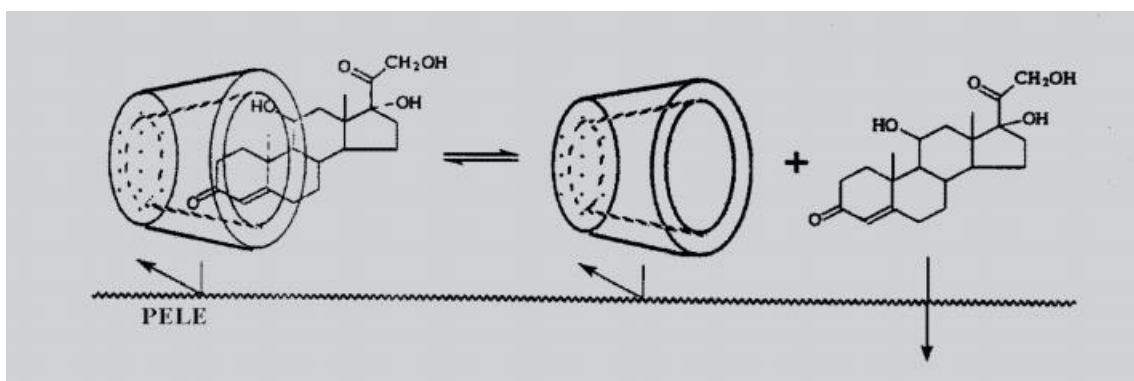
A viabilidade das CDs em formulações orais já é bem estabelecida tanto no Japão quanto na Europa, além disso, a via de absorção pelas mucosas também já foi exaustivamente avaliada. O uso dessas moléculas foi muito positivo para o melhoramento da absorção transmucosa de peptídeos e proteínas devido à redução de barreiras metabólicas e físicas, como por exemplo pela via nasal (IRIE & UEKAMA, 1997). As CDs também podem auxiliar na absorção transdérmica de fármacos melhorando a solubilidade, estabilidade, liberação e/ou permeação do mesmo. Algumas formulações já conhecidas com o uso de ciclodextrinas são: a α CD com miconazol; a β CD com clorafenicol, betametasona, indometacina e piroxican, melhorando a liberação e/ou permeação do fármaco. O fato é que as CDs são grupos de moléculas hidrofílicas e bastante volumosas, de 1000 até 1500 Da, o que dificulta

consideravelmente sua absorção através da pele. Assim, elas podem atuar de inúmeras formas melhorando a absorção dos fármacos por mecanismos diferentes, como melhora da solubilidade em um veículo ou geralmente como um transportador (MARTINS & VEIGA, 2002; CAL & CENTKOWSKA, 2008).

As membranas biológicas são lipofílicas e, portanto, apenas moléculas relativamente hidrofóbicas podem penetrar através das membranas. No entanto, a difusão passiva é impulsionada por alta concentração de fármaco (e alta atividade de fármaco) no exterior da membrana aquosa (por exemplo, fluido lacrimal ou saliva) ou no veículo do fármaco hidrofílico. Através da complexação da CD é possível aumentar a solubilidade aquosa de alguns medicamentos hidrofóbicos sem alterar sua estrutura molecular, isto é, sem afetar suas habilidades intrínsecas de permear as membranas biológicas lipofílicas (HE et al., 2004; ZHU et al., 2016).

Neste mesmo esquema, quando um fármaco hidrofóbico entra em contato com a pele ele é distribuído por toda a superfície da membrana (pele, mucosa ou córnea) enquanto que a CD permanecerá no veículo devido sua baixa afinidade pela membrana. Com isso, dificilmente as CDs são absorvidas através da pele, ou seja, apenas a fração de fármaco livre vai sendo absorvida. Portanto, cria-se um equilíbrio dinâmico entre o fármaco complexado com fármaco em solução (CAL & CENTKOWSKA, 2008). A figura 12 ilustra a liberação do fármaco (hidrocortisona) complexado com CD em meio aquoso na superfície da pele formando um equilíbrio dinâmico, até que toda a hidrocortisona seja absorvida na pele, restando apenas a solução de CD na superfície.

Figura 12 - Esquema de permeação da hidrocortisona através da pele complexada com ciclodextrina em meio aquoso



Fonte: Adaptado de MARTINS & VEIGA (2002).

Não é simplesmente uma adição de ciclodextrinas à formulação farmacêutica que irá automaticamente resultar em promoção de permeação do fármaco através da pele. Alguns trabalhos alegam que os complexos fármaco-ciclodextrinas resultam num decréscimo da biodisponibilidade do fármaco. Por isso, é importante usar apenas a quantidade de CDs suficiente para solubilizar o fármaco no veículo aquoso (MARTINS & VEIGA, 2002). Uma pequena quantidade de CDs em excesso resulta em decréscimo da biodisponibilidade ótima do fármaco (LOFTSSON et al., 1998). O tipo de veículo também pode afetar significativamente os efeitos promotores das CDs na liberação de fármacos, segundo alguns autores. Por exemplo, Matsuda e Arima alegam que as CDs hidrofílicas podem aumentar significativamente a liberação de corticoides e anti-inflamatórios não esteroides (AINES), apenas quando um veículo hidrofílico é utilizado, sendo importante referir o tipo de veículo usado (MATSUDA & ARIMA, 1999; MARTINS & VEIGA, 2002).

A velocidade de permeação do fármaco com auxílio da CD por meio da pele pode ser determinada pela atividade termodinâmica do fármaco no veículo e pelo coeficiente de partição entre a pele e o veículo. O conceito de atividade termodinâmica representa a tendência que o fármaco tem em “liberar-se” do veículo. Supõe-se que aumento nesta atividade leva a aumento da velocidade de permeação do fármaco através da pele. A atividade termodinâmica é diretamente proporcional à solubilidade do fármaco no veículo e é máxima quando se tem solução saturada do fármaco, ou seja, a velocidade aumenta quando apenas a quantidade suficiente de CD é adicionada para dissolver todo o fármaco no veículo aquoso, e conforme for aumentando a quantidade de CD a velocidade de permeação diminui, devido à formação de quantidade adicional de complexos que não são absorvidos (MARTINS & VEIGA, 2002).

Considerando a importância de se desenvolver novas formulações farmacêuticas baseadas em produtos naturais, com potenciais vantagens diante das formulações convencionais, pretende-se no presente trabalho, produzir fitocomplexos supramoleculares de extratos de folhas e ramos de *P. cauliflora* com β CD, visando à melhoria da sua solubilidade e biodisponibilidade, especialmente da sua capacidade de difusão sobre o epitélio e potencialização das atividades antioxidante e anti-inflamatória.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória dos extratos etanólico das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* e seus fitocomplexos com β -ciclodextrina, visando melhorar a solubilidade e biodisponibilidade dos extratos, além de reaproveitar partes da planta que são subutilizadas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a incorporação dos extratos etanólico das folhas e ramos de *P. cauliflora* em β -ciclodextrina (fitocomplexos supramoleculares);
- Avaliar o teor de fenóis totais, flavonoides e taninos dos extratos de *P. cauliflora* e seus fitocomplexos supramoleculares;
- Identificar os componentes majoritários dos extratos de *P. cauliflora* por HPLC-MS-Q-TOF;
- Promover a caracterização físico-química dos fitocomplexos supramoleculares;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *P. cauliflora* e seus fitocomplexos supramoleculares;
- Avaliar a viabilidade celular dos extratos e fitocomplexos supramoleculares;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* dos extratos de *P. cauliflora* e seus fitocomplexos supramoleculares.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e ramos da jabuticabeira foram coletadas em setembro de 2018, na faculdade de Educação Física, do Campus Pampulha da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais, nas coordenadas 19°52'30,8" S; 43°58'31,7" O e 820 metros de altitude. Uma amostra da planta inteira contendo folhas, ramos, frutos e flores foi utilizada na preparação da exsicata (BHCB 174029) e identificada como *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Myrtaceae) (SISGEN/Brasil A032F41) pelo professor Dr. Alexandre Salino, Curador do Herbário BHCB (UFMG).

4.2 PREPARO DO EXTRATO VEGETAL

Coletou-se cerca de 2 kg de material vegetal cada (folhas e ramos), o qual foi submetido à secagem em estufa à temperatura de 45 °C por 48 horas. As folhas foram pulverizadas em moinho de facas com malha MESH 20 até se obter um pó de granulometria 0,84 mm e os ramos em um liquidificador industrial. Logo após, procedeu-se a extração por maceração estática utilizando etanol como fase líquida, à temperatura ambiente, até exaustão completa do material vegetal. Para a obtenção do extrato etanólico bruto removeu-se o solvente em um evaporador rotatório de marca BUCHI Labortechnik AG (V-700), à pressão reduzida e temperatura do banho-maria de 45 - 55 °C. Os extratos etanólico das folhas (EEF) e ramos (EER) brutos foram armazenados em frascos de vidro com tampas, sob refrigeração à 5 °C até a realização dos experimentos.

4.3 PREPARO DOS FITOCOMPLEXOS COM β CD

Os fitocomplexos supramoleculares das folhas e ramos foram obtidos pelo método de co-precipitação combinado com liofilização. Foram pesados 1 g de EEF e EER e duas pesagens de 1 g cada de β CD. Em seguida, solubilizou a β CD em 50 mL de água destilada e os extratos em 50 mL de solvente orgânico (1:4 diclorometano:metanol) até completa dissolução. Posteriormente, verteu-se as

soluções dos extratos nas soluções de β CD cada, sob agitação constante. As soluções dos fitocomplexos supramoleculares permaneceram sob agitação por 24 horas à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Em seguida, essas soluções foram concentradas em evaporador rotatório à 50 °C (Figura 13). Os fitocomplexos supramoleculares das folhas (EEF/ β CD) e ramos (EER/ β CD) foram congelados à - 80 °C e, posteriormente, liofilizados e armazenados em frascos de vidro com tampas, sob proteção da luz.

Uma vez que a proporção do fitocomplexo supramolecular é 1:1 de extrato puro e β CD, foi utilizado nos testes biológicos a seguir o dobro da quantidade de fitocomplexo supramolecular em relação ao extrato puro (2:1), para comparação equivalente de substâncias bioativas presentes entre eles e confirmar a melhora nas atividades biológicas dos extratos complexados.

Figura 13 - Esquema de preparo do complexo de inclusão



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT (2016).

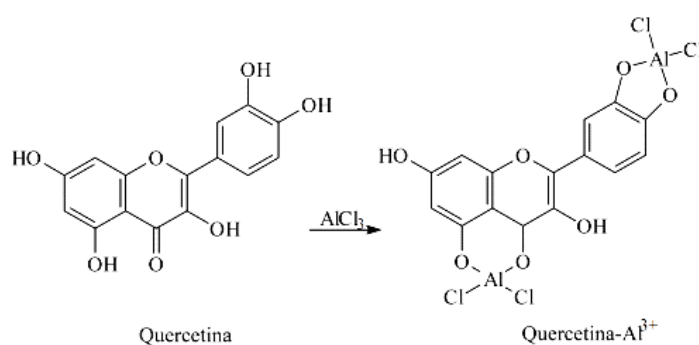
4.4 IDENTIFICAÇÃO E DOSEAMENTO DOS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS DE *PLINIA CAULIFLORA*

4.4.1 Teor de flavonoide

O conteúdo de flavonoides foi determinado pelo método descrito por Miliauskas e colaboradores (2004), com modificações. Preparou-se a curva de calibração com o padrão rutina, em variações de concentrações de 2 à 120 μ g/mL a partir de uma solução etanólica à 0,5 mg/mL. Para o doseamento das amostras foram preparadas soluções estoques dos extratos e fitocomplexos à 1 e 2 mg/mL em etanol (EtOH),

respectivamente, as quais 0,2 mL foi transferido para tubos de ensaio e, posteriormente, adicionou-se 4,6 mL de EtOH, 1 gota de ácido acético glacial e 0,2 mL da solução etanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) à 2 %, obtendo-se uma solução final de 5 mL por tubo. O branco da amostra foi preparado substituindo a solução de AlCl_3 por EtOH. Após 40 min de incubação e ao abrigo da luz, as absorvâncias foram registradas em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific Skanlt® Multiskan GO, software 3,2) à 415 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de flavonoides. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato vegetal, em equivalentes de rutina.

Figura 14 - Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl_3)



Fonte: MABRY et al. (1970).

4.4.2 Teores de fenóis totais e taninos

A determinação de fenóis totais e taninos foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível adaptando os métodos de Folin–Ciocalteu (DOWD, 1959; FOLIN, 1927) e da monografia do Barbatimão da 6ª ed. da Farmacopeia Brasileira (2019). A curva de calibração foi preparada com a substância padrão ácido tânico, em variações de concentrações de 7,5 à 350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a partir de uma solução metanólica à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para o doseamento das amostras foi preparada uma solução estoque dos extratos e fitocomplexos à 1 e 2 mg/mL em metanol (MeOH), respectivamente. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 120 μL do reagente Folin Ciocalteu à 20 %, 30 μL da amostra e 100 μL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) à 4 %. Para o branco da amostra foi substituído a solução reagente por MeOH. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorvância foi medida em

espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific Skanlt® Multiskan GO, software 3,2) à 770 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e a média \pm desvio padrão foi utilizada para o cálculo do teor de fenóis. O conteúdo total de fenóis foi expresso em mg/g de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico.

Para a quantificação de taninos foram preparadas as mesmas concentrações anteriores a um volume de 10 mL. Adicionou às soluções 100 mg de gelatina e promoveu a agitação mecânica durante 60 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e posteriormente filtradas em papel de filtro. A solução filtrada foi utilizada para análise de fenóis não adsorvidos na gelatina, pelo método de Folin-Ciocalteu. O conteúdo total de taninos foi expresso pela diferença entre fenóis totais e fenóis não adsorvidos na gelatina em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extrato vegetal, em equivalentes de ácido tânico.

4.4.3 Identificação dos constituintes por HPLC-MS-Q-TOF

A identificação das substâncias presentes nos extratos foi realizada por HPLC-MS-Q-TOF no equipamento de marca Agilent modelo Infinity 1260 hifenado ao espectrômetro de massas de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (ESI). Os parâmetros cromatográficos foram: coluna de fase reversa Agilent modelo Poroshell, 3 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 μm ; fase móvel: água (filtração Milli-Q) acidificada com ácido fórmico (0,1 % v/v) (A) e metanol (grau cromatográfico) (B), com gradiente de eluição de 10 % de B (0 min), 98 % de B (0 - 10 min); 100 % de B (10 - 17 min), à pressão de 600 bar e volume de injeção de 3,0 μL .

As condições de ESI-MS foram realizadas nos modos negativo e positivo com as seguintes especificações: pressão do nebulizador de 20 psi; temperatura e fluxo do gás secante de 220 °C e 8 L/min, respectivamente; voltagem no capilar de 4,5 KV; energia de fragmentação de 175 V e taxa de fluxo de infusão 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Para as análises MS/MS foi estabelecido uma taxa de variação de m/z entre 100 - 3000 e a energia de colisão feito em modo rampa variando de 5 - 30 eV.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS SUPRAMOLECULARES

4.5.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

A identificação das principais classes de constituintes presentes nas amostras bem como a investigação das interações entre esses compostos com a β CD foram realizadas no estado sólido por espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV). Os espectros das amostras EEF, EER, EEF/ β CD, EER/ β CD e das respectivas misturas mecânicas (MMs) foram obtidos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier. As misturas mecânicas foram preparadas usando uma proporção de 1:1 dos extratos e da β CD, ambos no estado sólido, os quais foram homogeneizados em gral de ágata com auxílio de pistilo (Figura 15). Posteriormente, as misturas foram acondicionadas em tubos *ependorf*[®] e armazenadas em geladeira.

Figura 15 - Preparo da mistura mecânica (MM)



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT; LANNA, et al. (2016).

Os espectros foram obtidos em acessório de refletância total atenuada (ATR) da marca PIKE acoplado ao espectrômetro. Após a aplicação direta de cada amostra, pura ou combinada com β CD, sobre a superfície de diamante do módulo de ATR, os espectros foram obtidos como a média de 16 varreduras consecutivas, com resolução de 2 cm^{-1} e adquiridos em um intervalo de número de onda $4000\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$. Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum Two, da OXFORD Instruments. Os dados foram então exportados e tratados no Microcal Origin 8.0[®]. Este procedimento está esquematizado na figura 16.

Figura 16 - Obtenção do espectro de Infravermelho



Fonte: Adaptado de BITTENCOURT; LANNA et al. (2016).

4.5.2 Análise Térmica Diferencial (DTA) e Termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA) foram realizadas em atmosfera oxidante (ar) à 50 mL/min e a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min para as amostras EEF, EER, EEF/ β CD, EER/ β CD e respectivas misturas mecânicas (MMs). Durante os experimentos, foram utilizados cadinhos de platina e massa aproximada de 13 mg de cada amostra (DENADAI et al., 2006b; LANNA et al., 2016). Os experimentos foram realizados em módulo termogravimétrico TGA/DTA STA-7800 da HITACHI.

4.6 ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP)

4.6.1 Determinação do tamanho de partícula por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

O caráter nanométrico das amostras foi avaliado por medidas de tamanho de partículas (diâmetro hidrodinâmico – D_h) por espalhamento de luz dinâmico (DLS) de acordo com Lanna et al. (2016) com algumas modificações. Os experimentos foram realizados em um módulo fotométrico de DLS (Zetasizer Nano ZS90 da Malvern) à 25 °C, com termostatização via sistema Peltier. As amostras foram inseridas em cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malvern, e submetidas a um feixe de luz monocromático (Laser He-Ne de 4 mW e comprimento de onda de 633 nm),

com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90° . O D_h foi determinado pela média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida a partir da média de 5 contagens.

Para os experimentos, foram preparadas inicialmente soluções etanólica a $0,0033 \text{ g/mL}$ dos extratos e $0,0067 \text{ g/mL}$ dos fitocomplexos supramoleculares. Um volume de $50 \mu\text{L}$ de cada uma dessas soluções foi aplicado na cubeta de polietileno e então foi acrescentado 2 mL de água deionizada, obtendo uma solução final de extratos etanólico a $8,25 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$ e solução final de complexo supramolecular a $1,68 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ (Figura 17). Os dados foram então exportados e tratados no Microcal Origin 8.0®.

Figura 17 - Leitura das amostras por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS)



Fonte: Adaptado de LANNA et al. (2016).

4.6.2 Determinação da condutividade elétrica e do potencial Zeta (PZ), na ausência e na presença de βCD

Para determinação do potencial Zeta (PZ) e da condutividade elétrica foram utilizadas as mesmas amostras usadas nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico. O PZ e a condutividade das nanoestruturas foram determinados no Zetasizer Nano-ZS90 através da técnica de micro-eletroforese Doppler, com ângulo de espalhamento de luz a 173° e DDP alternada 10 V , a partir dos valores de mobilidade eletroforética, calculado pelo modelo de Smoluchowski (LANNA et al., 2016). As amostras foram inseridas em célula capilar de polietileno DPS1060. O valor

final de PZ e condutividade foram calculados como a média de 5 medidas independentes com 5 contagens cada e o tratamento dos dados executado com o auxílio do programa Microcal Origin 8.0®.

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Sequestro de radicais livres (DPPH•)

A atividade sequestrante de radicais DPPH• foi determinada pelo método descrito por Brand-Williams et al. (1995). Foi transferido para microplaca de 96 poços 100 µL de uma solução à 1 mg/mL dos extratos e controles positivos (rutina e quercetina) e 2 mg/mL dos fitocomplexos, em metanol (MeOH). Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas com 50 µL de MeOH, e, logo após, adicionou-se 150 µL de solução reagente de DPPH à 20 µg/mL em MeOH, obtendo-se 10 concentrações entre 250 à 0,49 µg/mL. A placa foi incubada ao abrigo da luz e, após 30 minutos, a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific Skanlt® Multiskan GO, software 3,2) à 517 nm. O branco da amostra foi preparado substituindo a solução reagente de DPPH pelo MeOH. Procedeu-se também a medida da absorvância do DPPH sem as amostras (controle negativo). As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em média ± desvio padrão da concentração inibitória de 50 % (CI₅₀) em µg/mL, que é a quantidade necessária da amostra para inibir em 50 % a ação oxidante do radical DPPH.

4.7.2 Poder de redução do complexo fosfomolibdênio

O ensaio foi baseado no método descrito por Prieto et al. (1999). Os extratos, fitocomplexos supramoleculares, βCD e os controles positivos (quercetina, rutina e ácido ascórbico) foram solubilizados em solução hidroalcoólica 1:1 (MeOH : H₂O), obtendo-se a concentração de 0,5 mg/mL para os extratos, controles positivos e βCD e 1 mg/mL para os fitocomplexos. Tubos de ensaio contendo 300 µL da amostra e 2 mL da solução reagente (1,12 mL da solução de fosfato, 0,48 mL de molibdato, 0,4 mL de H₂SO₄) foram fechados hermeticamente e aquecidos no banho-maria à 95 °C

por 90 minutos, e em seguida resfriados em banho de gelo. Posteriormente, 200 μ L dessas soluções foram adicionadas à microplaca de 96 poços e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 695 nm. O branco da amostra foi preparado substituindo a solução reagente pelo MeOH. As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos em média \pm desvio padrão da porcentagem de Atividade Antioxidante Relativa (AAR%) ao ácido ascórbico, quercetina e rutina (NEGRI et al.; ZOCOLER et al., 2009), conforme a equação abaixo:

$$AAR\% = \frac{Abs(\text{amostra}) - Abs(\text{branco amostra})}{Abs(\text{controle positivo}) - Abs(\text{branco controle positivo})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde, $Abs_{(\text{controle positivo})}$: absorvância mensurada pelos controles positivos ácido ascórbico, quercetina e rutina; $Abs_{(\text{amostra})}$: absorvância mensurada para as amostras; $Abs_{(\text{branco amostra})}$: absorvância mensurada para o branco das amostras; e $Abs_{(\text{branco controle positivo})}$: absorvância mensurada para o branco dos controles positivos.

4.7.3 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade de inibição da peroxidação lipídica foi avaliada pelo método β -caroteno/ácido linoleico descrito por Melo & Mancini Filho (1989) com algumas modificações. Foram preparadas soluções estoques de 1 mg/mL dos extratos, β CD e do controle positivo rutina e 2 mg/mL dos fitocomplexos, solubilizados em metanol (MeOH). Posteriormente, procedeu-se a diluição das soluções estoques obtendo-se 6 concentrações entre 1000 e 31,25 μ g/mL, a fim de escolher a melhor concentração inibitória. A emulsão contendo o β -caroteno e o ácido linoleico foi preparada adicionando à um erlenmeyer, 30 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40, 500 μ L de diclorometano (DCM) e 100 μ L da solução β -caroteno à 10 mg/mL em DCM. Logo após, procedeu-se a evaporação completa do solvente em nitrogênio gasoso, e, posteriormente, adicionou-se 30 mL de água destilada à emulsão, previamente saturada com oxigênio por 1 hora, sob agitação. A absorvância da emulsão foi ajustada entre os valores de 0,6 e 0,7 em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 470 nm.

Em microplaca de 96 poços foram adicionados 250 μL de emulsão e 10 μL de amostra, obtendo-se 6 concentrações finais de 38,46 à 1,20 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo foi realizado com 250 μL da emulsão e 10 μL de MeOH, para determinar o 100 % de oxidação. A placa foi incubada à 45 °C, para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno. As absorvâncias foram mensuradas em espectrofotômetro UV-Vis à 470 nm. As leituras foram obtidas em tempo zero e em intervalos de 15 min durante 120 min de reação.

As análises foram realizadas em triplicatas e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de porcentagem de inibição (%I), calculada em relação ao decaimento da absorvância do controle negativo (Equação 4), devendo ser menor que 0,2 para que se considere 100 % de oxidação do ácido linoleico ao final da reação. Além disso, avaliou-se a curva de oxidação entre o controle negativo, as amostras e o controle positivo, utilizando o cálculo de tangente para encontrar os valores de F1 (capacidade de bloqueio da formação de peróxidos) entre 15 e 45 min após o início da reação e F2 (capacidade de inibir outras espécies radicalares, como os produtos da decomposição dos peróxidos) entre 75 e 90 min após início da reação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

$$\text{tg} = \frac{\text{Abs}_{(15')} - \text{Abs}_{(45')}}{45 - 15}$$

$$\text{tg} = \frac{\text{Abs}_{(75')} - \text{Abs}_{(90')}}{90 - 75}$$

$$\text{F1} = \frac{\text{tg } A_{\text{am}}}{\text{tg } A_{\text{cn}}}$$

$$\text{F2} = \frac{\text{tg } A_{\text{am}}}{\text{tg } A_{\text{cn}}}$$

$$\%I = \frac{\text{Abs}_{\text{cn}} - \text{Abs}_{\text{am}}}{\text{Abs}_{\text{cn}}} \times 100$$

Equação 4

Onde, Abs_{cn} : absorvância mensurada para o controle negativo; Abs_{am} : absorvância mensurada para as amostras; %I: porcentagem de inibição da lipoperoxidação; tg: tangente.

4.7.4 Inibição da formação de malondialdeído

A determinação da peroxidação lipídica pela quantificação de malondialdeído (MDA) foi baseada no método descrito por Osawa et al. (2005) com algumas

modificações. As concentrações utilizadas foram 5,0; 10 e 20 mg/mL em metanol dos extratos e controle positivo rotina, e β CD em água destilada ($H_2O_{dest.}$) e 10, 20 e 40 mg/mL em $H_2O_{dest.}$ dos fitocomplexos. Inicialmente foram preparados os homogenatos de cada amostra. Para isso, foi adicionado em cada béquer 25 g de carne moída, 17 mL de água destilada e as amostras solúveis. Os homogenatos foram aquecidos em chapa aquecedora até o aparecimento da coloração “amarronzada” (carne cozida). Em seguida, o volume de água foi completado q.s.p. 100 mL e procedeu-se a homogeneização do homogenato obtendo-se as concentrações nominais de extrato 10, 20 e 40 μ g/mL. Posteriormente, foram transferidos para frascos âmbar vedados e armazenados sob refrigeração à 5 °C durante 7 dias.

Para a quantificação de MDA, foram realizadas leituras das absorvâncias dos dias 0, 1, 3, 5 e 7. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 0,5 g de homogenato, 50 μ L de BHT, 2,5 mL de ácido fosfórico à 1 % e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA). As soluções foram aquecidas por 15 minutos em banho-maria à 100 °C e em seguida submetidas ao banho de gelo por 10 minutos. Após o resfriamento, adicionou-se 3 mL de butanol em cada tubo e centrifugou à 4000 rpm por 5 minutos. Logo após, alíquotas de 200 μ L do sobrenadante foram adicionadas à microplaca de 96 poços e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis (ThermoScientific SkanIt® Multiskan GO, software 3,2) à 535 nm. Foi realizada a curva padrão de MDA e, a partir desta, determinou-se a quantidade de MDA formada após tratamento com as amostras. Como controle negativo (100 % de oxidação), foi utilizado um homogenato apenas com adição de metanol e outro com água destilada (sem adição de amostra).

4.8 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

4.8.1 Linhagem de células e cultura

A linhagem celular testada para todas as amostras foi a J774A.1 de macrófagos murinos. Tais células foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico (estreptomicina e penicilina), mantidas em estufa umidificada à 37 °C e 5 % de CO₂. A cada dois ou três dias, realizou-se a troca do meio de cultura, monitorando as células até alcançarem confluência de aproximadamente 80 %, quando então foram congeladas usando-se meio apropriado

de congelamento (90 % SFB, 10 % DMSO), transferidas para garrafas maiores (75 cm²) ou ainda utilizadas nos ensaios. Uma vez que a linhagem celular utilizada é aderente, para sua remoção do interior das garrafas utilizou-se um suporte plástico (*cell scraper*).

4.8.2 Ensaio de redução metabólica do MTT

Para determinar a viabilidade celular utilizou-se o método descrito por Riss et al. (2013), com adaptações. As células J774.A1, anteriormente preparadas, foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se o corante Azul de Tripán, e transferidas para placas de 96 poços de fundo chato, na concentração de $0,5 \times 10^5$ células por poço. Após incubação das células por 24 horas procedeu-se a remoção do meio de cultura presente, com consequente retirada de células mortas, e adicionou-se 200 μ L de meio de cultura suplementado (2 % de SFB e 1 % de antibiótico) junto às soluções de extratos e fitocomplexos a serem testadas em diferentes concentrações nominais de extrato (250; 125; 62,5 e 31,25 μ g/mL), diluídas em DMSO à 0,5 %.

Imediatamente após 48 horas de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionou-se uma solução de meio de cultura contendo 10 % (v/v) do reagente 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) à 5 mg/mL, a qual foi plaqueada, anteriormente, no volume de 100 μ L/poço. A placa novamente foi incubada por um período de 2 horas e 30 minutos em estufa incubadora à 37 °C, com 5 % de CO₂. Ao final deste intervalo, o sobrenadante foi descartado e o cristal de formazan foi ressuscitado em DMSO, sendo realizada a leitura em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) à 595 nm. Os resultados foram realizados em quadruplicata. Como controle negativo foram utilizados células cultivadas em meio de cultura sem tratamento e células cultivadas em meio de cultura acrescido de DMSO à 0,5 %. Para o cálculo da viabilidade celular (%) dos macrófagos utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de células viáveis} = \frac{\text{Abs}_{(\text{amostra})}}{\text{Abs}_{(\text{DMSO } 0,5\%)}} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde, $Abs_{(Amostra)}$ = absorvância mensurada após tratamento das células com as amostras; $Abs_{(DMSO\ 0,5\ \%)}$ = absorvância mensurada após tratamento das células com DMSO à 0,5 %.

4.8.3 Redução da concentração de óxido nítrico

A atividade anti-inflamatória *in vitro* foi realizada através da determinação indireta de óxido nítrico (NO) baseada no método descrito por Tsikas (2007), com adaptações. A partir das células J774A.1, cultivadas conforme item 4.8.1, foi possível determinar a concentração de NO por meio da quantificação de nitritos (NO_2^-) no sobrenadante das culturas de células através da Reação de Griess (indicadora da produção de NO). As células foram tratadas com os extratos e fitocomplexos nas concentrações nominais de extrato 125; 62,5 e 31,25 $\mu\text{g/mL}$ em DMSO à 0,5 %. Após 1 hora de incubação, foram estimuladas com LPS e IFN- γ (9 $\mu\text{g/mL}$) e encubadas novamente por 48 horas. Em seguida, transferiu-se 50 μL dos sobrenadantes à placa de 96 poços e adicionou-se 30 μL da solução de sulfanilamida à 1 % diluída em H_3PO_4 à 2,5 % e 30 μL de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEED) à 0,1 % em solução de H_3PO_4 à 2,5 %. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M2, Molecular Devices, EUA) à 540 nm. A quantidade de nitrito (NO_2^-) nas amostras foi obtida por meio de curva padrão de diluição seriada de uma solução de nitrito de sódio ($NaNO_2$) na concentração de 200 μM (GUEVARA et al., 1998). O ensaio foi realizado em quadruplicata e os resultados expressos em μM . Como controle negativo foram utilizadas células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- γ e células estimuladas e tratadas apenas com DMSO à 0,5 % (veículo).

4.9 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

4.9.1 Animais

Para os ensaios biológicos foram utilizados camundongos Swiss pesando entre 25 a 30 g, machos, com 45 dias de idade, provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram alojados em gaiolas e mantidos sob

condições controladas de temperatura (22 °C) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12 h) com livre acesso a água e ração. Os protocolos utilizados para experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF (protocolos nº 006/2019 e 007/2019) (ANEXOS 1, 2).

4.9.2 Atividade anti-inflamatória tópica

A avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* foi realizada através do modelo de edema de orelha descrito por Schiantarelli et al. (1982), com adaptações. Os animais foram divididos em 15 grupos de 6 animais cada, sendo eles o controle negativo acetona (veículo), controle positivo dexametasona (5 mg/mL) diluída em acetona e os extratos nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL em acetona, e os fitocomplexos, nas mesmas concentrações nominais de extrato, solúveis em água destilada, sendo cada concentração equivalente a um grupo, e β CD testada apenas na maior concentração de 25 mg/mL.

Foi aplicado topicamente 20 μ L de uma solução do óleo de cróton à 2,5 % (v/v) em acetona no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona (veículo) no pavilhão auricular esquerdo de cada animal. Em seguida, os animais receberam o tratamento tópico com 20 μ L de cada amostra. Como controle positivo foi utilizado o mesmo volume de dexametasona 5 mg/mL em acetona. Como controle negativo os animais receberam somente o agente flogístico sem tratamento. Após desafio de 6 e 4 horas, os animais foram eutanasiados através da administração via intraperitoneal de cetamina à 10 % (90 mg/kg) e xilazina à 2 % (10 mg/kg) e, com o auxílio de um *punch* metálico, discos idênticos de 10 mm de diâmetro foram obtidos de ambas as orelhas (direita e esquerda) de cada animal. Os discos foram pesados em balança analítica e os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da diferença de peso entre as orelhas esquerda e direita do mesmo animal.

4.10 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os fragmentos de cada orelha obtidos no teste de edema de orelha induzido por aplicação de óleo de cróton no desafio de 6 horas foram preservados em formol à 10 % até o início do processamento histológico. As biópsias foram desidratadas,

emblocadas em parafina e, com auxílio de um micrótomo, foram realizados cortes transversais, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE). Realizou-se uma análise microscópica qualitativa da espessura do edema, a presença de vasodilatação e de infiltração leucocitária. Foi utilizado o microscópio de marca Olympus BX51 e as fotomicrografias representativas de cada grupo foram obtidas no aumento de 10x utilizando o software CellSens Standard.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada através de ANOVA seguido do teste de Bonferroni, por meio do programa GraphPrism 5.0. As diferenças foram consideradas significantes com $p < 0,05$ (95 % intervalo de confiança).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TEORES DE FENOIS TOTAIS, FLAVONOIDES E TANINOS

A análise dos teores de fenóis totais, flavonoides e taninos das amostras EEF, EER, EEF/ β CD e EER/ β CD foi realizada, pois estes compostos orgânicos são frequentemente associados a alta atividade antioxidante e anti-inflamatória devido à capacidade de eliminar os radicais livres que são produzidos no organismo humano. Além disso, vários compostos fenólicos já foram descritos em literatura para a jabuticaba, como a quercetina, rutina e derivados dos ácidos gálico e elágico (WU et al., 2012; BORGES et al., 2014; GARCIA et al., 2019).

Na tabela 3 estão apresentados os resultados dos teores de fenóis totais, flavonoides e taninos para todas as amostras testadas. Apesar de conter a mesma composição de fitoquímicos dos extratos, os fitocomplexos foram avaliados para fins de comparação com seus respectivos extratos puros, uma vez que a formação do complexo com a ciclodextrina pode causar algum efeito nos resultados.

Os teores de flavonoides para EEF ($72,52 \pm 0,72 \mu\text{g}/\text{mg}$) e EEF/ β CD ($74,20 \pm 3,38 \mu\text{g}/\text{mg}$) foram significativamente maiores do que em EER ($32,47 \pm 3,38 \mu\text{g}/\text{mg}$) e EER/ β CD ($30,15 \pm 1,56 \mu\text{g}/\text{mg}$) ($p < 0,05$). Enquanto que o extrato dos ramos e seu fitocomplexo apresentaram maior teor de taninos em comparação ao extrato e fitocomplexo das folhas ($p < 0,05$). Isso sugere que o conteúdo de flavonoides é superior nas folhas do que nos ramos e o teor de taninos é maior nos ramos em comparação as folhas. Além disso, pode-se afirmar que não houve diferença significativa entre os extratos e seus respectivos fitocomplexos, provando que a ciclodextrina não interferiu neste ensaio.

Investigações anteriores alegam que a produção de alguns flavonoides da jabuticaba, concentraram-se principalmente nos frutos inteiros, na casca, nas sementes (WANG W.H. et al., 2014), nos frutos de jabuticaba não fermentados e fermentados (MORALES et al., 2016), ou nos produtos comerciais das frutas (WU et al., 2012). Os taninos podem acumular de forma significativa no caule, folhas, frutas, sementes e raízes das plantas (HASLAM, 2007).

Chavasco et al. (2014) identificaram flavonoides e taninos nas folhas de *P. cauliflora* e apenas taninos nos ramos dessa mesma espécie. Souza-Moreira et al.

(2010) verificaram a presença de fenóis totais, flavonoides e taninos nas veias medianas, veias menores e no parênquima das folhas de *P. cauliflora*. Essas análises permitiram confirmar a presença das principais classes de metabólitos especiais relatados na literatura.

Tabela 3 - Teores de fenóis totais, flavonoides e taninos dos extratos e fitocomplexos supramoleculares

	EEF ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EEF/ β CD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EER ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	EER/ β CD ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Fenóis Totais	163,77 \pm 0,76	151,07 \pm 1,87	241,25 \pm 5,46 ^{a,b}	238,52 \pm 4,25 ^{a,b}
Flavonoides	72,52 \pm 0,72	74,20 \pm 3,38	32,47 \pm 3,38 ^{a,b}	30,15 \pm 1,56 ^{a,b}
Taninos	27,12 \pm 2,03	26,84 \pm 6,27	54,07 \pm 3,34 ^{a,b}	53,07 \pm 7,83 ^{a,b}

Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. a – Diferença estatística em relação à EEF ($p < 0,05$). b – Diferença estatística em relação à EEF/ β CD ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES POR HPLC-MS-Q-TOF

O método empregado por cromatografia líquida de alta eficiência associado à espectrometria de massas (HPLC-MS-Q-TOF) foi capaz para determinar a composição fenólica dos extratos das folhas e ramos de jabuticaba da espécie *Plinia cauliflora*, confirmando os resultados encontrados na tabela 3. Mais de 20 compostos foram encontrados no extrato das folhas, dentre eles, os ácidos quínico, gálico e elágico e derivados, a castalagina, dilactona do ácido valoneico e casuarictina foram identificados em ambos extratos.

A amostra EEF (Tabela 4) mostrou vários derivados flavonoídicos, como a quercetina, quercitrina, miricetina e miricitrina. Todas as substâncias identificadas foram determinadas por razão massa/carga (m/z) do íon molecular e dos fragmentos nos modos positivos e negativos e por comparação com os padrões de referência e relatos da espécie *Plinia* e espécies sinônimas. O flavonoide miricitrina (464.0954

g/mol *PubChem* CID: 5281673) (Figura 3 (4)) foi encontrada no tempo de retenção (Tr) 6,1 min e m/z 465.1019 [M+H]⁺ e 319.0459 [M+H-Ramnose]⁺ no modo positivo, 463.0876 [M-H]⁻ e 317.0295 [M-Ramnose]⁻ no modo negativo. Os fragmentos 319 e 317 correspondem a aglicona da miricitrina, também conhecida como miricetina (318.0375 g/mol *PubChem* CID: 5281672), após clivagem da ligação do glicosídeo (SALDANHA et al. 2013; FRACASSETTI et al. 2013; NEVES et al., 2018). A quercitrina (448.1005 g/mol *PubChem* CID: 5280459) (Figura 3 (3)) apresentou Tr 6,7 min, m/z 449.1072 [M+H]⁺ e 303.0494 [M+H-Ramnose]⁺, 447.0918 [M-H]⁻ e 301.0334 [M-Ramnose]⁻, sendo os fragmentos 303 e 301 referentes à quercetina sem o ramnosídeo em sua estrutura, confirmada através dos relatos da espécie na literatura (SALDANHA et al. 2013; FRACASSETTI et al. 2013; NEVES et al., 2018).

Além disso, foram identificados derivados dos ácidos gálico e elágico no extrato das folhas. No Tr 5,5 o ácido elágico hexosídeo (464.0590 g/mol *PubChem* CID: 76058086) mostrou m/z 465.0681 [M+H]⁺ e 303.0127 [M+H-Hexose]⁺ no modo positivo e 463.0501 [M-H]⁻ e 300.9984 [M-Hexose]⁻ no modo negativo, onde os fragmentos 300.99 [M-H]⁻ e 303 [M+H]⁺ correspondem ao ácido elágico livre (302.0062 g/mol *PubChem* CID: 5281855). Já o ácido gálico (170.0215 g/mol *PubChem* CID: 370) foi encontrado no modo negativo com m/z 169.0138 [M-H]⁻ e fragmentos 125.0241, 108.0242 e 107.0168. Esses compostos foram relatados previamente na espécie *P. cauliflora* (SOUZA-MOREIRA et al. 2011 e 2013; WU et al., 2012).

A telimagrandina I (786.0915 g/mol *PubChem* CID: 442690) (Figura 5 (3)) e castalagina (934.0712 g/mol *PubChem* CID: 168165) (Figura 8) também foram encontradas no extrato das folhas no modo negativo m/z 785.0861 [M-H]⁻ e 933.0634 [M-H]⁻, respectivamente. Até o presente momento, a telimagrandina I foi descrita apenas no fruto inteiro e na casca de jabuticaba (WU et al., 2012; PLAZA et al., 2016; INADA et al., 2020) e a castalagina no tronco e casca da árvore (ZHAO et al., 2019) e sementes dos frutos (INADA et al., 2020; FIDELISA et al., 2020) de espécies sinônimas à *Plinia cauliflora*, como *Myrciaria cauliflora*, sendo possivelmente relatadas pela primeira vez nas folhas e ramos de jabuticaba pelo nosso grupo.

Já o EER (Tabela 5) apresentou muitos constituintes tânicos, como achado nos resultados anteriores de doseamento (Item 5.1). Taninos condensados derivados da estrutura flavan-3-ol (catequina) foram encontrados (Figura 6), como a (epi)galocatequina (306.0739 g/mol *PubChem* CID: 72277) em Tr 2,3 min, m/z no

modo positivo 307.0809 [M+H]⁺ e no modo negativo 305.0644 [M-H]⁻. Taninos hidrolisáveis como o ácido elágico (Figura 4) também foram identificados, tais como o 3-O-metil ácido elágico (316.0219 g/mol *PubChem* CID: 13915428) que apareceu no Tr 7,3 min e tem m/z 315.0167 [M-H]⁻ e fragmento de 300.9942 [M-CH₂]⁻ e 317.0299 [M+H]⁺ e 303.0196 [M+H-CH₂]⁺. Outro derivado do ácido elágico, a dilactona do ácido valoneico (470.0121 g/mol *PubChem* CID: 10151874) (Figura 8 (4)) foi identificada apenas nos frutos de jabuticaba por Wu et al. (2012) e Inada et al. (2020), no entanto nosso grupo encontrou nas folhas e ramos da jabuticaba, no Tr 3,2 min, com m/z 471.0173 [M+H]⁺ e 469.0025 [M-H]⁻. Outro polifenol identificado foi a casuarictina (936.0868 g/mol *PubChem* CID: 73644) (Figura 5 (6)), nos modos positivo e negativo, com m/z 937.0928 [M+H]⁺ com fragmento 919.0797 [M+H-H₂O]⁺ e 935.0751 [M-H]⁻ e fragmento 917.0775 [M-H₂O]⁻, respectivamente. Souza-Moreira et al. (2013) isolaram a casuarinina (936.0868 g/mol *PubChem* CID: 157395), isômero de massa da casuarictina, das folhas de *P. cauliflora* e relatou atividade anti-fúngica contra a espécie *Candida*.

A maioria dos fenólicos encontrados em nosso estudo possui atividade biológica. A quercetina é descrita por apresentar atividade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, anti-obesidade, e tem grande potencial no tratamento de DPOC (WU et al., 2012; BAILÃO et al., 2015; DASTMALCHI et al., 2012). O ácido elágico e derivados são conhecidos pela alta capacidade antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiproliferativa e cardioprotetora (LARROSA & ESPÍN, 2010; SOUZA-MOREIRA et al., 2011; ABE et al., 2012; FRACASSETTI et al., 2013; BAILÃO et al., 2015; ZHAO et al., 2019). Além disso, os fenólicos em geral são importantes na promoção da saúde, tanto para o tratamento de doenças já instaladas e avançadas, quanto na prevenção de danos celulares que podem facilitar o desenvolvimento de vários estados patológicos (MIGUEL, 2010; LINK et al., 2010; DAI & MUMPER, 2010; WU et al., 2013; PHANIENDRA et al., 2015).

Tabela 4 - Identificação dos compostos do extrato etanólico das folhas (EEF) de *Plinia cauliflora* por HPLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (T_R), massa molecular exata, massa/carga (m/z) nos modos negativo e positivo $[M-H]^- / [M+H]^+$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências

Nº	T_R (min)	Massa molecular exata	$[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ (m/z)	Fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ (m/z)	Compostos identificados	Referências
1	0,999	192.0633	191.0559 $[M - H]^-$	173.0418 $[M - H - H_2O]^-$; 155.0343 $[M - H - 2 H_2O]^-$; 137.0293 $[M - H - 3 H_2O]^-$; 101.0237 $[M - H - 3 CH_2O]^-$	Ácido quínico	De Oliveira et al., 2013; Saldanha et al., 2013; Sun & Chen, 2012.
2	1,267	482.0696	481.0630 $[M - H]^-$	463.0682 $[M - H - H_2O]^-$; 421.0391 $[M - H - 2 CH_2O]^-$; 385.0812 $[M - H - 2 CH_2O - 2 H_2O]^-$; 319.0182 $[M - H - Hexose]^-$; 300.9977 $[M - H - Hexose - H_2O]^-$; 257.0008 $[M - H - Hexose - H_2O - CO_2]^-$	HHDP-hexose	Wu et al., 2012; Plaza et al., 2016; Albuquerque et al., 2019; Da Silva et al., 2014; Singh et al., 2015.
3	1,401	784.0785	783.0677 $[M - H]^-$	723.0536 $[M - H - 2 CH_2O]^-$; 481.0531 $[M - H - HHDP]^-$; 437.0713 $[M - H - HHDP - CO_2]^-$; 301.0027 $[M - H - HHDP - Hexose - H_2O]^-$;	Di-HHDP-hexose	Wu et al., 2012; Plaza et al., 2016; Albuquerque et al., 2019; Morales et al., 2016; Da Silva et al., 2014.

4	1,535	332.0743	331.0661 [M - H] ⁻	271.0445 [M - H - 2 CH ₂ O] ⁻ ; 241.0310 [M - H - 3 CH ₂ O] ⁻ ; 211.0213 [M - H - 4 CH ₂ O] ⁻ ; 169.0247 [M - H - Hexose] ⁻ ; 125.0303 [M - H - Hexose - CO ₂] ⁻	Galoil-hexosídeo	Plaza et al., 2016; Da Silva et al., 2014; Sun & Chen, 2012; Zyiwicki et al., 2002.
5	1,670	170.0215	169.0138 [M - H] ⁻	125.0241 [M - H - CO ₂] ⁻ ; 107.0168 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻	Ácido gálico	Wu et al., 2012; Palozi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Da Silva et al., 2014; Morales et al., 2016.
6	1,810	934.0712	933.0634 [M - H] ⁻ 935.0765 [M + H] ⁺	783.0442 [M - H - Galoil] ⁻ ; 631.0696 [M - H - HHDP] ⁻ 917.0589 [M + H - H ₂ O] ⁺ ; 633.0568 [M + H - HHDP] ⁺	Castalagina	Zhao et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Albuquerque et al., 2019; Singh et al., 2015; Zyiwicki et al., 2002.
7	2,877	952.6450	951.0712 [M - H] ⁻	907.0778 [M - H - CO ₂] ⁻ ; 783.0617 [M - H - Ácido gálico] ⁻ ; 481.0848 [M - H - Ácido gálico - HHDP] ⁻ ; 300.9928 [M - H - Ácido gálico - HHDP - Hexose - H ₂ O] ⁻	Trisgaloil-HHDP-hexose	Albuquerque et al., 2019; Singh et al., 2015; Negri & Tabach, 2013.
8	3,286	470.0121	469.0055 [M - H] ⁻	425.0171 [M - H - CO ₂] ⁻ ; 407.0059 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻	Dilactona do ácido valoneico	Inada et al., 2020; Morales et al., 2016;

				379.0330 [M - H - CO ₂ - H ₂ O - CO] ⁻					Wu et al., 2012;
				303.0171 [M + H - Ácido gálico] ⁺ ;					Wyrepkowski et al., 2014.
			471.0198 [M + H] ⁺	171.0281 [M + H - Ácido gálico - Pentose] ⁺ ;					
				127.0244 [M + H - Ácido gálico - Pentose - CO ₂] ⁺					
				917.0733 [M - H - H ₂ O];					
				783.0711 [M - H - Galoil];					
			935.0820 [M - H] ⁻	633.0701 [M - H - HHDP];					
				300.9986 [M - H - HHDP - Hexose - Galoil - H ₂ O];					
9	3,554	936.0868		169.0107 [M - H - HHDP - Hexose - 2 Galoil] ⁻	Galoil-bis-HHDP-hexosídeo/ Casuarictina				Plaza et al., 2016;
				919.0837 [M + H - H ₂ O] ⁺ ;					Albuquerque et al., 2019;
				635.0860 [M + H - HHDP] ⁺ ;					Da Silva et al., 2014;
			937.0924 [M + H] ⁺	617.0778 [M + H - HHDP - H ₂ O] ⁺ ;					Souza-Moreira et al., 2013.
				303.0136 [M + H - HHDP - Hexose - Galoil - H ₂ O] ⁺ ;					
				633.0852 [M - H - Galoil];					
				615.0846 [M - H - Galoil - H ₂ O];					
10	3,822	786.0915	785.0861 [M - H] ⁻	483.0721 [M - H - HHDP];	Telimagrandina I/ Digaloil-HHDP-glicose				Wu et al., 2012;
				300.9975 [M - H - HHDP - Hexose - H ₂ O];					Plaza et al., 2016;
				169.0210 [M - H - HHDP - Hexose - Galoil] ⁻					Fracassetti et al., 2013;
									Albuquerque et al., 2019;
									Singh et al., 2015.
				465.0748 [M - H - H ₂ O];					
				439.0868 [M - H - CO ₂];					
11	4,359	484.0853	483.1095 [M - H] ⁻	331.0687 [M - H - Galoil];	Digaloil hexosídeo				Wu et al., 2012;
				313.0591 [M - H - Galoil - H ₂ O];					Albuquerque et al., 2019;
				169.0124 [M - H - Galoil - Hexose];					De Oliveira et al., 2018;
									Da Silva et al., 2014;
									Li & Seeram, 2018.

				125.0359 [M - H - Galoíl - Hexose - CO ₂] ⁻		
12	4,359	636.0962	635.0889 [M - H] ⁻	483.1363 [M - H - Galoíl]; 465.0513 [M - H - Galoíl - H ₂ O]; 169.0102 [M - H - 2 Galoíl - Hexose] ⁻	Trigaloíl hexosídeo	Wu et al., 2012; Singh et al., 2015; Wyrepkowski et al., 2014; Zywicki et al., 2002.
13	5,559	464.0590	463.0501 [M - H] ⁻ 465.0681 [M + H] ⁺	300.9984 [M - H - Hexose] ⁻ 303.0127 [M + H - Hexose] ⁺	Ácido elágico hexosídeo	Palozi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Morales et al., 2016; Neves et al., 2018; Abdulla et al., 2018.
14	5,827	480.0903	479.0808 [M - H] ⁻ 481.0954 [M + H] ⁺	461.0808 [M - H - H ₂ O]; 317.0206 [M - H - Hexose]; 316.0213 [M - H - Hexose - H]; 271.0494 [M - H - Hexose - H ₂ O - CO]; 179.0042 [M - H - Hexose - 3H ₂ O - 3CO] ⁻ 503.0808 [M + Na] ⁺ ; 319.0434 [M + H - Hexose] ⁺	Miricetina-3-O-hexosídeo	Fracassetti et al., 2013; Neves et al., 2018; Saldanha et al., 2013; Negri & Tabach, 2013.
15	5,834	434.0485	433.0399 [M - H] ⁻	300.9999 [M - H - Pentose]; 299.9877 [M - H - Pentose - H] ⁻	Ácido elágico pentosídeo	Palozi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Da Silva et al., 2014; Wu et al., 2012; Morales et al., 2016.

16	5,968	610.1055	615.0975 [M - H] ⁻	463.0837 [M - H - Galoil]; 301.0334 [M - H - Galoil - Hexose] ⁻ ; 283.0281; 271.0349; 255.0279; 179.0497; 151.0048	Quercetina-O-galoil-hexosídeo	Saldanha et al., 2013; Da Silva et al., 2014.
17	6,103	464.0954	463.0876 [M - H] ⁻ 465.1036 [M + H] ⁺	317.0295 [M - H - Ramnose]; 316.0224 [M - H - Ramnose - H] ⁻ ; 271.0231 [M - H - Ramnose - H ₂ O - CO] ⁻ ; 179.0006 [M - H - Ramnose - 3H ₂ O - 3CO] ⁻ ; 151.0041 [M - H - Ramnose - 3H ₂ O - 4CO] ⁻ 487.0853 [M + Na] ⁺ ; 319.0459 [M + H - Ramnose] ⁺ ; 303.0503 [M + H - H ₂ O] ⁺ ; 153.0191 [M + H - Ramnose - 3H ₂ O - 4CO] ⁺	Miricitrina	Fracassetti et al., 2013; Saldanha et al., 2013; Wu et al., 2012; Neves et al., 2018.
18	6,103	450.0812	449.0732 [M - H] ⁻	317.0293 [M - H - Pentose]; 316.0267 [M - H - Pentose - H] ⁻ ; 271.0298 [M - H - Pentose - H ₂ O - CO] ⁻ ; 179.0054 [M - H - Pentose - 3H ₂ O - 3CO] ⁻ ; 151.0030 [M - H - Pentose - 3H ₂ O - 4CO] ⁻	Miricetina 3-O-pentosídeo	Fracassetti et al., 2013; Saldanha et al., 2013.
19	6,505	434.0849	433.0707 [M - H] ⁻	301.0366 [M - H - Pentose];	Quercetina-3-O-pentosídeo	Fracassetti et al., 2013;

				283.0105 [M - H - Pentose - H ₂ O] ⁻ ; 271.0245 [M - H - Pentose - CH ₂ O] ⁻ ; 255.0348 [M - H - Pentose - H ₂ O - CO] ⁻ ; 227.0259 [M - H - Pentose - H ₂ O - 2CO] ⁻ 891.1527 [2M + Na] ⁺ ; 303.0482 [M + H - Pentose] ⁺ ; 257.0404 [M + H - Pentose - H ₂ O - CO] ⁺ ; 229.0511 [M + H - Pentose - H ₂ O - 2CO] ⁺		Saldanha et al., 2013; Wu et al., 2012; Neves et al., 2018.
		435.0893 [M + H] ⁺				
20	6,505	448,0638	447.0558 [M - H] ⁻	315.0109 [M - H - Pentose] ⁻ ; 314.0083 [M - H - Pentose - H] ⁻ ; 300.9928 [M - H - Pentose - CH ₂] ⁻ ; 299.9905 [M - H - Pentose - CH ₂ - H] ⁻	Metil-ácido elágico pentosídeo	Neves et al., 2018; Fracassetti et al., 2013; Singh et al., 2015; Wyrepkowski et al., 2014.
				603.0039 [2M - H] ⁻ ; 283.9992 [M - H - H ₂ O] ⁻ ; 300.9982 [M - H] ⁻ 257.0092 [M - H - CO ₂] ⁻ ; 229.0168 [M - H - CO ₂ - CO] ⁻ ; 201.0164 [M - H - CO ₂ - 2CO] ⁻ ; 285.0043 [M + H - H ₂ O] ⁺ ; 303.0128 [M + H] ⁺ 275.0189 [M + H - CO] ⁺ ; 257.0067 [M + H - H ₂ O - CO] ⁺		
21	6,639	302.0062			Ácido elágico	Wu et al., 2012; Fracassetti et al., 2013; Morales et al., 2016; Singh et al., 2015; Plaza et al., 2016.
				895.1437 [2M - H] ⁻ ; 301.0334 [M - H - Ramnose] ⁻ ; 271.0209 [M - H - Ramnose - CH ₂ O] ⁻ ;		
22	6,773	448.1005	447.0918 [M - H] ⁻		Quercitrina	Wu et al., 2012; Morales et al., 2016; Palozi et al., 2019;

449.1072 255.0272 [M - H - Ramnose - H₂O - CO]⁻;
227.0388 [M - H - Ramnose - H₂O - 2CO]⁻
471.0884 [M + Na]⁺;
303.0494 [M + H - Ramnose]⁺;
153.1284 [M + H - Ramnose - 2H₂O - 3CO -
CH₂O]⁺

Plaza et al., 2016;
Fracassetti et al., 2013.

Tabela 5 - Identificação dos compostos do extrato etanólico dos ramos (EER) de *Plinia cauliflora* por HPLC-MS-Q-TOF. Tempo de retenção por minuto (T_R), massa molecular exata, massa/carga (m/z) nos modos negativo e positivo $[M-H]^- / [M+H]^+$ $[M-H]^-$, massa dos fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$, compostos identificados e referências

N°	T_R (min)	Massa molecular exata	$[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ (m/z)	Fragmentos do íon molecular MS^2 $[M-H]^-$ e $[M+H]^+$ (m/z)	Compostos identificados	Referências
1	0,992	192.0633	191.0563 $[M - H]^-$	173.0418 $[M - H - H_2O]^-$; 153.0200 $[M - H - 2 H_2O - H]^-$; 137.0293 $[M - H - 3 H_2O]^-$; 101.0187 $[M - H - 3 CH_2O]^-$	Ácido quínico	De Oliveira et al., 2013; Saldanha et al., 2013; Sun & Chen, 2012.
2	1,400	934.0712	933.0588 $[M - H]^-$ 935.0846 $[M + H]^+$	631.0605 $[M - H - HHDP]^-$; 479.0278 $[M - H - HHDP - Galoil]^-$; 169.0145 $[M - H - 2 HHDP - Galoil]^-$; 125.0234 $[M - H - 2 HHDP - Galoil - CO_2]^-$ 952.1028 $[M + H - H_2O]^+$ 633.0684 $[M + H - HHDP]^+$; 465.0545 $[M + H - HHDP - \text{Ácido gálico}]^+$	Castalagina	Zhao et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Albuquerque et al., 2019; Singh et al., 2015; Zyiwicki et al., 2002.
3	1,668	170.0215	169.0135 $[M - H]^-$	125.0229 $[M - H - CO_2]^-$; 124.0263 $[M - H - CO_2 - H]^-$; 109.2809 $[M - H - CO_2 - H_2O - H]^-$	Ácido gálico	Wu et al., 2012; Palozzi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Da Silva et al., 2014; Morales et al., 2016.
4	2,339	306.0739	305.0644 $[M - H]^-$	610.0572 $[2M - H]^-$;	(Epi)galocatequina	Inada et al., 2020;

			307.0809 [M + H] ⁺	277.0796 [M - H - CO] ⁻ ; 221.0470 [M - H - 3 CO] ⁻ ; 153.0288 [M - H - Galoil] ⁻ ; 137.0233 [M - H - Galoil - H ₂ O] ⁻ ; 125.0237 [M - H - Galoil - CO] ⁻ ; 289.0731 [M - H - H ₂ O] ⁺ ; 158.9733 [M - H - Galoil] ⁺		Zyiwicki et al., 2002; Tala et al., 2013.
5	2,339	594.1348	593.1268 [M - H] ⁻	423.0810 [M - H - Galato] ⁻ ; 305.0644 [M - H - Catequina] ⁻ ; 289.0701 [M - H - Catequina - H ₂ O] ⁻ ; 221.0538 [M - H - Catequina - 3 CO] ⁻ ; 165.0169 [M - H - Catequina - 5 CO] ⁻	(Epi)catequina-galocatequina	Zyiwicki et al., 2002; Tala et al., 2013.
6	2,473	610.0958	609.0566 [M - H] ⁻	457.0201 [M - H - Galoil] ⁻ ; 305.0639 [M - H - 2 Galoil] ⁻ ; 249.0365 [M - H - 2 Galoil - 2 CO] ⁻ ; 219.0591 [M - H - 2 Galoil - 2 CO - CH ₂ O] ⁻ ; 137.0214 [M - H - 2 Galoil - Galato] ⁻	(Epi)galocatequina-3,5-digalato/ Galocatequina-digalato	Zyiwicki et al., 2002; Tala et al., 2013.
7	3,278	470.0121	469.0025 [M - H] ⁻ ; 471.0173 [M + H] ⁺	425.0105 [M - H - CO ₂] ⁻ ; 407.0048 [M - H - CO ₂ - H ₂ O] ⁻ ; 379.0110 [M - H - CO ₂ - H ₂ O - CO] ⁻ ; 300.9913 [M - H - Ácido gálico] ⁻ ; 299.9911 [M - H - Ácido gálico - H] ⁻ ; 453.0088 [M + H - H ₂ O] ⁺	Dilactona do ácido valoneico	Inada et al., 2020; Morales et al., 2016; Wu et al., 2012; Wyrepkowski et al., 2014.

				255.2325 [M + H - Ácido gálico - H ₂ O - CO] ⁺		
8	3,278	578.1424	577.1327 [M - H] ⁻	289.0668 [M - H - Catequina]; 255.0371 [M - H - Catequina - 2 H ₂ O - H]; 221.0718 [M - H - Catequina - 3 H ₂ O - CH ₂]; 161.0356 [M - H - Catequina - 3 H ₂ O - CH ₂ - 2 CH ₂ O] ⁻	(Epi)catequina-(4β→8)-catequina/ Proantocianidina B	Zyiwicki et al., 2002; Tala et al., 2013; Sun & Chen, 2012; Ferreira, 2018.
9	3,412	458.0849	457.0270 [M - H] ⁻	289.0680 [M - H - Galato]; 275.0177 [M - H - Galato - CH ₂]; 137.0199 [M - H - Galato - Galoil]; 109.0275 [M - H - Galato - Galoil - CO] ⁻	Galato de (epi)galocatequina	Inada et al., 2020; Pérez-Navarro et al., 2019; Singh et al., 2015.
10	3,546	936.0868	935.0751 [M - H] ⁻ 937.0928 [M + H] ⁺	917.0775 [M - H - H ₂ O]; 916.0070 [M - H - H ₂ O - H]; 783.0538 [M - H - Galoil]; 633.0674 [M - H - HHDP]; 300.9905 [M - H - HHDP - Hexose - Galoil - H ₂ O] ⁻ 919.0797 [M + H - H ₂ O] ⁺ ; 635.0833 [M + H - HHDP] ⁺ ; 471.0169 [M + H - HHDP - Hexose - H] ⁺	Galoil-bis-HDDP-hexosídeo/ Casuarictina	Plaza et al., 2016; Albuquerque et al., 2019; Da Silva et al., 2014; Souza-Moreira et al., 2013.
11	3,814	290.0790	289.0697 [M - H] ⁻	245.0767 [M - H - CO ₂]; 221.0841 [M - H - C ₃ O ₂]; 203.0677 [M - H - H ₂ O - C ₃ O ₂];	(Epi)catequina	Inada et al., 2020; Da Silva et al., 2014; Tala et al., 2013.

				165.0160 [M - H - 3 H ₂ O - C ₃ O ₂]; 137.0247 [M - H - 3 H ₂ O - C ₃ O ₂ - CO]; 109.0283 [M - H - 3 H ₂ O - C ₃ O ₂ - 2 CO]		
12	4,753	484.0853	483.1111 [M - H]	439.0935 [M - H - CO ₂]; 331.0695 [M - H - Galoil]; 313.0809 [M - H - Galoil - H ₂ O]; 211.0171 [M - H - Galoil - 2 H ₂ O - 3 CO]	Digaloil-hexosídeo	Wu et al., 2012; Albuquerque et al., 2019; De Oliveira et al., 2018; Da Silva et al., 2014; Li & Seeram, 2018.
13	5,022	468.0882	467.0802 [M - H]	449.0604 [M - H - H ₂ O]; 423.0881 [M - H - CO ₂]; 315.0674 [M - H - Galoil]; 313.0519 [M - H - Galoil - H]; 169.0137 [M - H - Galoil - Deoxihexose]; 151.0032 [M - H - Galoil - Deoxihexose - H ₂ O]; 125.0223 [M - H - Galoil - Deoxihexose - CO ₂]; 109.0291 [M - H - Galoil - Deoxihexose - 2 CH ₂ O]	Digaloil-deoxihexosídeo	Li & Seeram, 2018.
14	5,552	464.0590	463.0491 [M - H]	300.9990 [M - H - Hexose]; 283.0867 [M - H - Hexose - H ₂ O]; 257.0919 [M - H - Hexose - CO ₂]; 201.0384 [M - H - Hexose - CO ₂ - 2 CO]	Ácido elágico hexosídeo	Palozi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Morales et al., 2016; Neves et al., 2018;

			303.0149 [M + H - Hexose] ⁺ ;		Abdulla et al., 2018.
		465.0669 [M + H] ⁺	243.0325 [M + H - Hexose - 2 CH ₂ O] ⁺ ; 153.0194 [M + H - Hexose - 5 CH ₂ O] ⁺		
		433.0392 [M - H] ⁻	300.9955 [M - H - Pentose]; 299.9899 [M - H - Pentose - H]; 257.0224 [M - H - Pentose - CO ₂]; 229.0157 [M - H - Pentose - CO ₂ - CO]; 169.6352 [M - H - Pentose - CO ₂ - CO - 2 CH ₂ O] ⁻	Ácido elágico pentosídeo	Palozi et al., 2019; Fracassetti et al., 2013; Da Silva et al., 2014; Wu et al., 2012; Morales et al., 2016.
15	6,363	434.0485	345.0979 [M + H - 3 CH ₂ O] ⁺ ; 303.0104 [M + H - Pentose] ⁺ ; 275.0303 [M + H - Pentose - CO] ⁺ ; 185.0198 [M + H - Pentose - CO - 3 CH ₂ O] ⁺		
		447.0543 [M - H] ⁻	300.9965 [M - H - Ramnose]; 299.9903 [M - H - Ramnose - H]; 257.0152 [M - H - Ramnose - CO ₂]; 229.0222 [M - H - Ramnose - CO ₂ - CO] ⁻	Ácido elágico ramnosídeo	Palozi et al., 2019; Da Silva et al., 2014; Wu et al., 2012; Fracassetti et al., 2013; Singh et al., 2015.
16	6,497	448.0641	303.0137 [M + H - Ramnose] ⁺ ; 183.0777 [M + H - Ramnose - 4 CH ₂ O] ⁺ ; 127.0164 [M + H - Ramnose - 4 CH ₂ O - 2 CO] ⁺		
17	6,631	302.0062	300.9979 [M - H] ⁻	Ácido elágico	Wu et al., 2012; Fracassetti et al., 2013;
			603.0029 [2M - H]; 257.0093 [M - H - CO ₂];		

			245.0068 [M - H - 2 CO] ⁻ ;		Morales et al., 2016;
			229.0115 [M - H - CO - CO ₂] ⁻ ;		Singh et al., 2015;
			201.0175 [M - H - 2 CO - CO ₂] ⁻ ;		Plaza et al., 2016.
			173.0175 [M - H - 3 CO - CO ₂] ⁻ ;		
			145.0349 [M - H - 4 CO - CO ₂] ⁻		
			324.9971 [M + H + Na] ⁺ ;		
			285.0040 [M + H - H ₂ O] ⁺ ;		
			275.0193 [M + H - CO] ⁺ ;		
		303.0155 [M + H] ⁺	257.0068 [M + H - H ₂ O - CO] ⁺ ;		
			201.0216 [M + H - H ₂ O - 2 CO] ⁺ ;		
			173.0288 [M + H - H ₂ O - 3 CO] ⁺ ;		
			143.0020 [M + H - H ₂ O - 3 CO - CH ₂ O] ⁺		
			300.9942 [M - H - CH ₂] ⁻ ;		
		315.0167 [M - H] ⁻	299.9923 [M - H - CH ₂ - H] ⁻ ;		
			243.9992 [M - H - CH ₂ - H - 2 CO] ⁻ ;		
			215.9976 [M - H - CH ₂ - H - 3 CO] ⁻		
			303.0052 [M + H - CH ₂] ⁺ ;		
			285.0029 [M + H - CH ₂ - H ₂ O] ⁺ ;		
18	7,302	316.0219	257.0075 [M + H - 2 CH ₂ O] ⁺ ;	3-O-Metil ácido elágico	Zhao et al.,2019;
			243.0139 [M + H - 2 CH ₂ O - CH ₂] ⁺ ;		Singh et al., 2015;
		317.0299 [M + H] ⁺	229.0145 [M + H - 2 CH ₂ O - CO] ⁺ ;		Da Silva et al., 2014;
			201.0202 [M + H - 2 CH ₂ O - 2 CO] ⁺ ;		Sun & Chen, 2012.
			173.0235 [M + H - 2 CH ₂ O - 3 CO] ⁺ ;		
			145.0286 [M + H - 2 CH ₂ O - 4 CO] ⁺ ;		
			117.0295 [M + H - 2 CH ₂ O - 5 CO] ⁺		

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS SUPRAMOLECULARES

As ciclodextrinas possuem em sua cavidade interna grupos C-H que lhes conferem caráter parcialmente hidrofóbico. Assim, moléculas de tamanho e polaridade adequados podem penetrar nesta região, estabelecendo interações e formando os compostos de inclusão moleculares (LOFTSSON et al., 1996; SZETJLI, 1998). No ambiente aquoso, a formação desses compostos é facilitada pela remoção das moléculas de água do interior da cavidade que contribuem entalpicamente e entropicamente para a espontaneidade do processo. Isso porque essas moléculas de água inicialmente confinadas não satisfazem completamente o potencial de formação de ligações de hidrogênio. Quando liberadas, elas passam a fazer ligações de hidrogênio estáveis com as moléculas de água do meio, produzindo, geralmente, valores exotérmicos de entalpia ($\Delta H < 0$). Essas moléculas, por sua vez, ganham liberdade conformacional e translacional, contribuindo para o aumento da entropia do processo (BREWSTER & LOFTSSON, 2007; DENADAI et al., 2007; SINGH et al., 2010).

A formação dos compostos supramoleculares provoca mudanças significativas nas propriedades físico-químicas das moléculas hóspedes uma vez incorporadas à CD e, por esse motivo, é fundamental a caracterização do material obtido, objetivando confirmar a formação do complexo e determinar suas propriedades (SINGH et al., 2010). Grande parte das caracterizações dos complexos supramoleculares é desenvolvida com o emprego de ferramentas espectroscópicas, como por exemplo, UV-Vis, Infravermelho, Fluorescência e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (MILLER et al., 2007; FRANCO et al., 2009) e métodos térmicos ou termodinâmicos como Análise Termogravimétrica (TGA), Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e Calorimetria Isotérmica de Titulação (ITC) (DENADAI et al., 2006a; CANNAVÀ et al., 2008).

5.3.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica analítica que se fundamenta na incidência de radiação na região do infravermelho em amostra sólida. Como a energia envolvida nos modos vibracionais

das ligações é da mesma ordem de grandeza da radiação infravermelho, esta técnica pode ser usada para monitorar as ligações químicas dos grupos funcionais.

A espectroscopia de FTIR é uma das principais ferramentas para a caracterização dos complexos de inclusão no estado sólido. Quando moléculas interagem para formar complexos supramoleculares podem ocorrer alterações no momento de dipolo das ligações ou grupos funcionais destas moléculas. Essas alterações podem provocar aumento ou redução de bandas, restrição ou intensificação do movimento vibratório que se reflete no espectro de IV, como deslocamento, redução ou supressão das bandas (CORTI et al., 2007; AALTONEN et al., 2008; BARBOSA, 2011; ARRAIS, 2012).

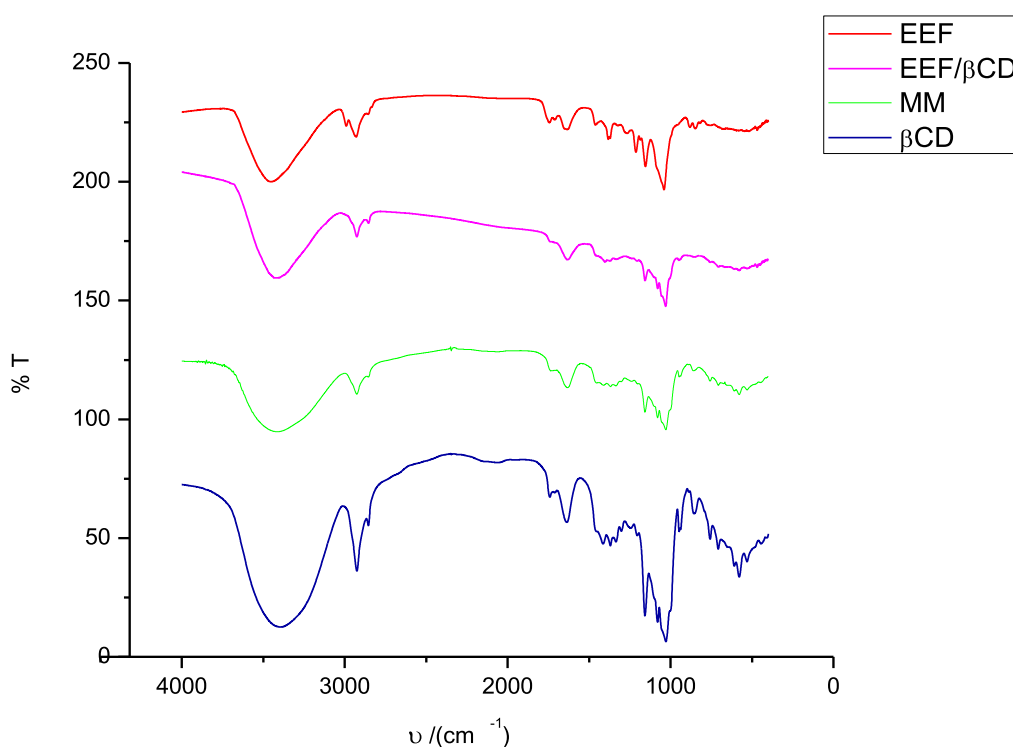
No espectro da β CD (Figura 18), observa-se principalmente a presença de bandas de absorção em 3393 cm^{-1} (estiramento O-H), 2922 cm^{-1} (estiramento C-H), uma banda em 1625 cm^{-1} referente a deformações O-H de moléculas de água de hidratação, bandas 1158 cm^{-1} (estiramento C-O) e 1029 cm^{-1} (estiramento C-O) e 941 cm^{-1} (pode ser atribuído a modos esqueléticos de β CD envolvendo ligação α -1,4) (EGYED, 1990).

As principais bandas presentes no espectro do EEF (Figura 18) são 3455 , 2992 , 2930 , 2854 , 1745 , 1632 , 1576 , 1382 , 1212 , 1150 , 1035 , 883 , 847 cm^{-1} . O pico forte e amplo na faixa de 3000 a 3600 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento O-H devido à ligação de hidrogênio e no espectro EEF observa-se a banda de absorção em 3455 cm^{-1} , como característica de compostos fenólicos (NETALA et al., 2016; HENECZKOWSKI et al., 2001; SAMPAIO et al., 2016). As bandas encontradas em 2992 cm^{-1} , 2930 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} poderiam ser atribuídas ao modo vibracional simétrico e assimétrico do estiramento C-H (KORA et al., 2012; SAMPAIO et al., 2016). O espectro também contém uma banda de estiramento em 1745 cm^{-1} , que pode ser atribuída à vibração de estiramento C=O. A região espectral entre 1600 e 1700 cm^{-1} admite a absorção infravermelha de C=C, e pode ser relacionada ao modo vibracional de estiramento do C=C aromático de um flavonoide, o que pode ser deduzido pela banda 1632 cm^{-1} (SAMPAIO et al., 2016). As bandas 1382 , 1212 , 1150 e 1035 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento simétrico do C-O dos grupos carboxilas, grupos OH alcoólicos e fenólicos (KORA et al., 2012; NETALA et al., 2016).

Pode ser observado nas figuras 18 e 19, em todos os espectros, desvios e alterações de intensidade de várias bandas quando se compara o espectro dos complexos supramoleculares e os respectivos extratos puros.

Observa-se que o pico 3455 cm^{-1} (Figura 18) sofreu afinamento no espectro do EEF/ β CD e um deslocamento para 3419 cm^{-1} em EEF/ β CD e mistura mecânica (MM). A banda 2992 cm^{-1} desapareceu enquanto que as bandas a 1745 cm^{-1} , 1382 cm^{-1} e 1212 cm^{-1} sofreram alargamento e atenuação tanto nos espectros do EEF/ β CD quanto da MM. No espectro do fitocomplexo supramolecular a banda 1035 cm^{-1} sofreu deslocamento para 1028 cm^{-1} . Adicionalmente, observou-se desaparecimento das bandas a 883 e 847 cm^{-1} tanto para o fitocomplexo supramolecular quanto para a mistura mecânica. Tais modificações são indicativos de interações intermoleculares, que podem ser associadas à inclusão. Além disso, as alterações nos espectros da mistura mecânica mostram que o contato entre as amostras na fase sólida são suficientes para se promover as interações.

Figura 18 - Espectro de infravermelho do EEF, EEF/ β CD, MM e β CD pura

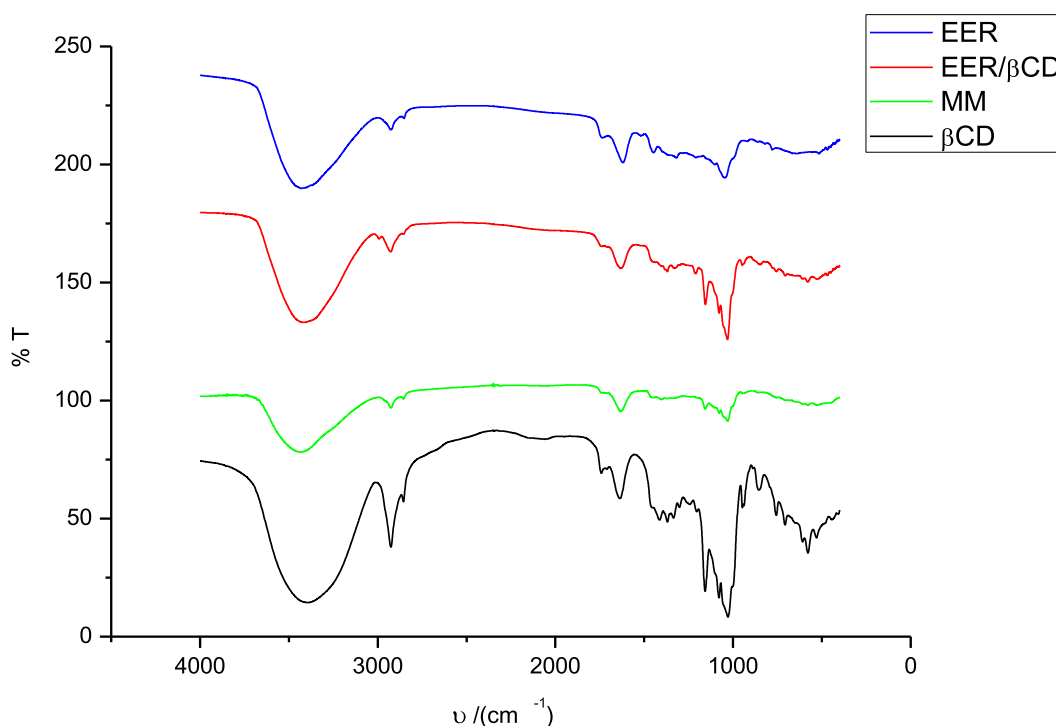


Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. MM – Mistura mecânica entre o extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* e a β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Para o EER (Figura 19), as principais bandas de absorvância estão localizadas a 3429, 2929, 2852, 1738, 1620, 1449, 1047 cm^{-1} . Observam-se bandas de absorção em 3429 cm^{-1} como possível estiramento O-H de compostos fenólicos (NETALA et al., 2016; HENECZKOWSKI et al., 2001). A banda 2929 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H (KORA et al., 2012). A banda 1620 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=O (KORA et al., 2012). As bandas 1449 e 1047 cm^{-1} poderiam ser atribuídos ao estiramento simétrico do C-O dos grupos carboxilas, grupos OH alcoólicos e fenólicos (NETALA et al., 2016; KORA et al., 2012).

Figura 19 - Espectro de infravermelho do EER, EER/ β CD, MM e β CD pura



Legenda: EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. MM – Mistura mecânica entre o extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* e a β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Para o espectro do EER/ β CD, o máximo de absorção da banda 3429 cm^{-1} sofreu deslocamento para 3416 cm^{-1} e na MM para 3435 cm^{-1} , além de alargamento e atenuação no espectro da MM. A banda 1738 cm^{-1} sofreu atenuação no espectro da

EER/ β CD e da MM. No espectro da EER/ β CD a banda 1620 cm^{-1} sofreu deslocamento para 1636 cm^{-1} e atenuação. Observa-se que a banda 1449 cm^{-1} sofreu atenuação, alargamento e deslocamento para 1460 cm^{-1} no espectro do EER/ β CD e apenas atenuação na MM. A banda 1158 cm^{-1} no espectro EER/ β CD corresponde à sobreposição do pico da CD referente ao estiramento C-O sobre os sinais dos extratos nesta região. A banda 1047 cm^{-1} sofreu deslocamento do máximo de absorção para 1031 cm^{-1} no espectro do EER/ β CD sendo mais intensa. A MM assemelhou-se ao extrato puro nesta mesma banda.

Deslocamentos de bandas correspondem à mudanças na energia dos modos vibracionais, enquanto que diferenças nas intensidades podem ser atribuídas a perturbações nos momentos de dipolo das ligações químicas de grupos funcionais envolvidos nas interações. De modo geral, a inserção de uma molécula hóspede no interior da cavidade da β CD leva a uma restrição conformacional, reduzindo a livre movimentação das moléculas encapsuladas, causando ambos os tipos de alterações (NASCIMENTO, 2013; OLIVEIRA et al., 2011).

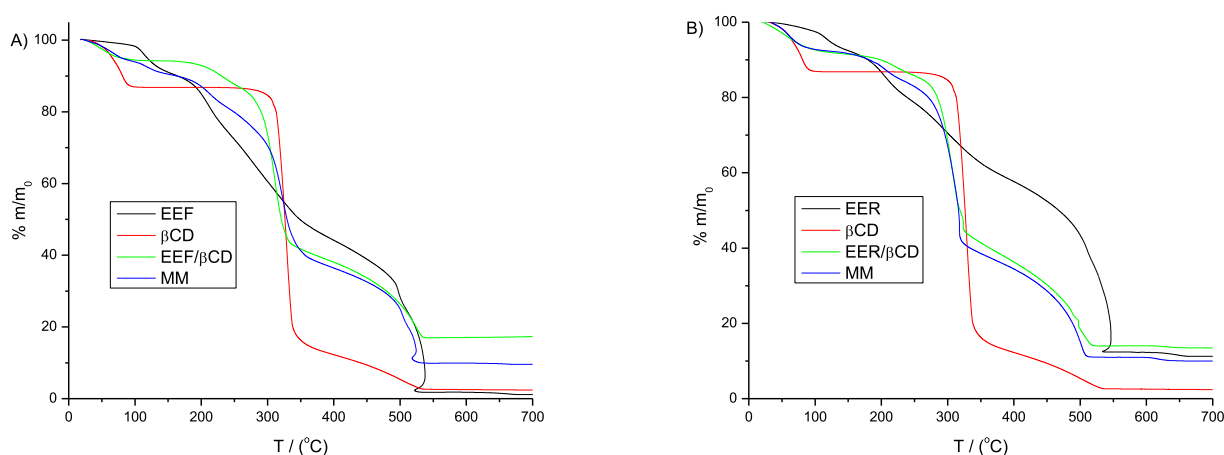
5.3.2 Estabilidade térmica por análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA)

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica que consiste no uso de uma termobalança, a qual é utilizada para determinar o perfil de perda de massa de um material em função do aumento de temperatura, sendo, portanto, utilizada para investigar fenômenos de perda de massa associados a desidratação e decomposição. Já a análise térmica diferencial (DTA) é uma técnica que permite determinar o fluxo de calor decorrente de quaisquer processos físico-químicos induzidos pela variação de temperatura, tais como transições de fase, além dos processos de desidratação e decomposição. Sendo assim, são técnicas complementares, na medida em que os processos envolvendo perda de massa são somente observados na TGA, enquanto que todos os processos, independente ou não da perda de massa, mas por gerarem fluxo de calor, são observados na DTA (MEISEL, 1984; WUNDERLICH, 2001; HĂDĂRUGĂ et al., 2019). No presente trabalho, os perfis térmicos dos extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD pura e as respectivas MMs foram avaliados por TGA (Figura 20) e DTA (Figura 21).

Para a β CD, a TGA apresentou uma perda de 16 % em massa, na faixa de 60-100 °C, decorrente da saída de doze moléculas de água. Após esta temperatura, observa-se uma estabilidade térmica até 280 °C, quando se inicia sua decomposição. Em seguida, observa-se outra perda de massa à 343 °C, atribuída a uma primeira decomposição, seguida de calcinação do composto (KOHATA et al., 1993).

Corroborando com os resultados anteriores, na curva DTA é possível perceber um pequeno pico endotérmico iniciado à 280 °C, com máximo à 305 °C, atribuído à fusão da β CD. Sucessivamente, observam-se picos endotérmicos e exotérmicos, confirmando que a decomposição ocorre por sucessivas etapas envolvendo reorganização molecular do material sólido. A calcinação é finalizada à \approx 547 °C, quando nem a massa normalizada, $\%m/m_0$, nem a potência térmica variam; gerando um sinal exotérmico com máximo à 540 °C, levando a uma massa residual de apenas 0,11 %.

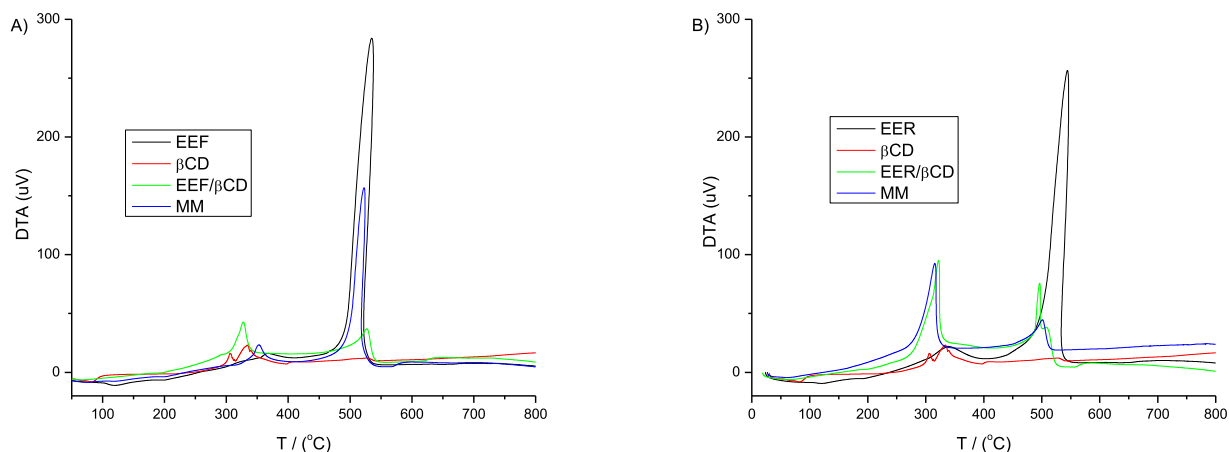
Figura 20 - TGAs dos extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e MMs na faixa de temperatura entre 0 e 700 °C. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD



Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. MM - Mistura mecânica entre o extrato etanólico de *Plinia cauliflora* e a β CD.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Figura 21 - DTAs dos extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e MMs na faixa de temperatura entre 0 e 800 °C. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD



Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. MM – Mistura mecânica entre o extrato etanólico de *Plinia cauliflora* e a β CD.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

As curvas TGA e DTA para ambos os extratos foram muito similares, devido à presença de alguns componentes semelhantes. Nas TGAs observa-se uma perda de massa inicial de aproximadamente 2 % entre 28 à 100 °C, demonstrando elevada estabilidade dos extratos, já que é comum a perda de pequenas moléculas nesta faixa de temperatura, conforme observado por Lanna et al., 2016. A partir de \approx 100 °C, onde ocorreu fusão, inicia-se um acentuado processo de perda de massa em três etapas, sendo a primeira de 100 até 180 °C (\approx 12 %), a segunda de 180 à 490 °C (\approx 58 %) e o último de 490 à 522 °C, quando observou-se um recuo da curva. Este recuo foi atribuído a uma redução de temperatura devido a rápida expansão do material durante a calcinação, uma vez que o material foi totalmente queimado ao final do experimento (LANNA et al., 2016). A calcinação dos extratos ocorreu com máxima liberação entre 530 - 550 °C. Nas DTAs, os dois primeiros eventos são representados por sinais exotérmicos atenuados enquanto que o último é caracterizado por um intenso sinal exotérmico.

Na presença de β CD, a fusão não foi observada até aproximadamente 200 °C. As amostras EEF/ β CD e EER/ β CD sofreram perda de massa de \approx 6 % entre 30 - 90

°C, o qual foi atribuída à perda de moléculas de água referente à desidratação das ciclodextrinas. A decomposição antes observada para os extratos na faixa de 100 - 180 °C não foi observado para os fitocomplexos supramoleculares, sugerindo aumento da estabilidade térmica dos compostos devido às interações com a β CD. A perda de massa de 180 à 270 °C (9 %) foi atribuída ao segundo evento de decomposição observado para os extratos, enquanto que as perdas de massa de 271 à 335 °C (43 %) e de 335 à 542 °C foram atribuídas à decomposição mútua dos componentes do extrato e da β CD.

Na DTA dos fitocomplexos supramoleculares, diferente dos extratos, observa-se apenas um pico exotérmico associado à decomposição dos compostos, na faixa de 271 à 335 °C, devido às novas interações intermoleculares estabelecidas. Esses picos também ocorrem numa faixa de temperatura diferente do observado para as misturas mecânicas. Esses dados confirmam a existência de novas interações, já que nas misturas mecânicas, como não houve contato prévio entre as moléculas na fase líquida, não se espera a formação do mesmo padrão de interações intermoleculares do fitocomplexo supramolecular.

Após ≈ 450 °C, um intenso evento exotérmico nas curvas DTA para os extratos foram observados. No entanto, esses eventos são menos intensos nos fitocomplexos supramoleculares, sugerindo uma alteração no mecanismo de decomposição dos componentes do extrato devido à interação mútua com a β CD. A curva da mistura mecânica mostrou um evento exotérmico significativo, assemelhando-se os extratos, já que nenhum sinal exotérmico foi observado para a β CD pura.

5.4 ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP) DOS NANOPRECIPITADOS HIDROFÓBICOS

Considerando a baixa solubilidade dos componentes do extrato, mesmo na presença da β CD, foi realizada a dispersão dos amostras no meio aquoso, a fim de melhorar a solubilidade dos compostos, através da produção de nanoprecipitados hidrofóbicos (NPHs). Os NPHs se formam a partir da dissolução inicial dos compostos em um solvente menos polar que a água, porém miscível, como acetona ou dimetilsulfóxido (DMSO), seguida da adição dessa solução em água, sob agitação,

promovendo a formação imediata do nanoprecipitado hidrofóbico. As amostras EEF, EER, EEF/ β CD e EER/ β CD foram solubilizados em DMSO.

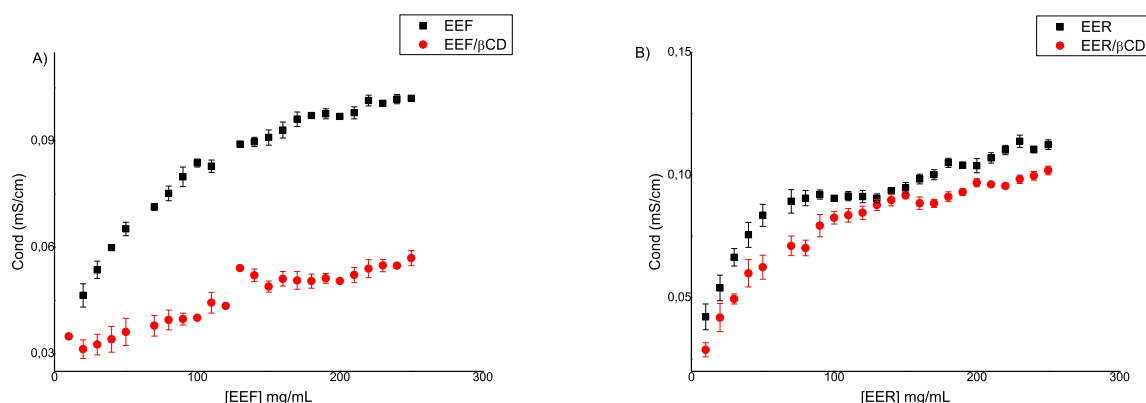
Dessa forma, o efeito da ciclodextrina na formação dos nanoprecipitados foi avaliado por medidas de potencial Zeta e de condutividade elétrica e espalhamento de luz dinâmico (para medida do diâmetro hidrodinâmico).

5.4.1 Condutividade elétrica

A condutividade elétrica é uma propriedade que mede a capacidade de uma determinada molécula conduzir corrente elétrica através da movimentação dos íons em meio líquido (soluções eletrolíticas). Logo, é considerado um parâmetro físico-químico utilizado para identificar a presença de íons em solução, assim como para quantificação desses íons. Esse parâmetro se fundamenta na medida de corrente elétrica de uma solução quando se aplicam uma diferença de potencial alternado entre duas placas condutoras (OHLWEILER, 1981; LANNA et al., 2016).

A figura 22 mostra valores de condutividade elétrica para as soluções de EEF (A) e EER (B) na forma livre e na presença de β CD (EEF/ β CD e EER/ β CD).

Figura 22 - Valores da condutividade dos extratos e fitocomplexos supramoleculares em meio aquoso em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD B) EER e EER/ β CD



Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Em ambos os gráficos é possível analisar que há uma elevação dos valores da condutividade à medida que se aumenta a concentração dos NPHs no meio, tanto para os extratos quanto para os fitocomplexos supramoleculares. Esses dados mostram que os compostos são passíveis de ionização no meio, provavelmente devido às hidroxilas presentes nas estruturas dos fenólicos, flavonoides e taninos, os quais compõem as amostras em análise.

Além disso, as curvas de condutividade mostram que a taxa de variação da condutividade com a concentração, dk/dC , é maior às baixas concentrações, demonstrando que os componentes apresentam maior tendência de ionização nessas condições, o que é característico da presença de eletrólitos fracos, como é o caso dos flavonoides e taninos.

Na presença de β CD, observa-se que os valores de condutividade para os fitocomplexos supramoleculares foram menores em comparação aos respectivos extratos, sugerindo que a complexação dos componentes do extrato com a β CD comprometeu grupos funcionais ionizáveis, possivelmente pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio, reduzindo assim a tendência de ionização.

5.4.2 Potencial Zeta (PZ)

O potencial Zeta (PZ) é o parâmetro chave para revelar a estabilidade de espécies manométricas em suspensão. O PZ indica o grau de forças repulsivas eletrostáticas presentes entre nanopartículas de carga semelhante e adjacentes em uma dispersão coloidal. Enquanto as medidas de condutividade elétrica são sensíveis à presença de íons no meio, as medidas de PZ são sensíveis à presença de íons na superfície dos NPHs.

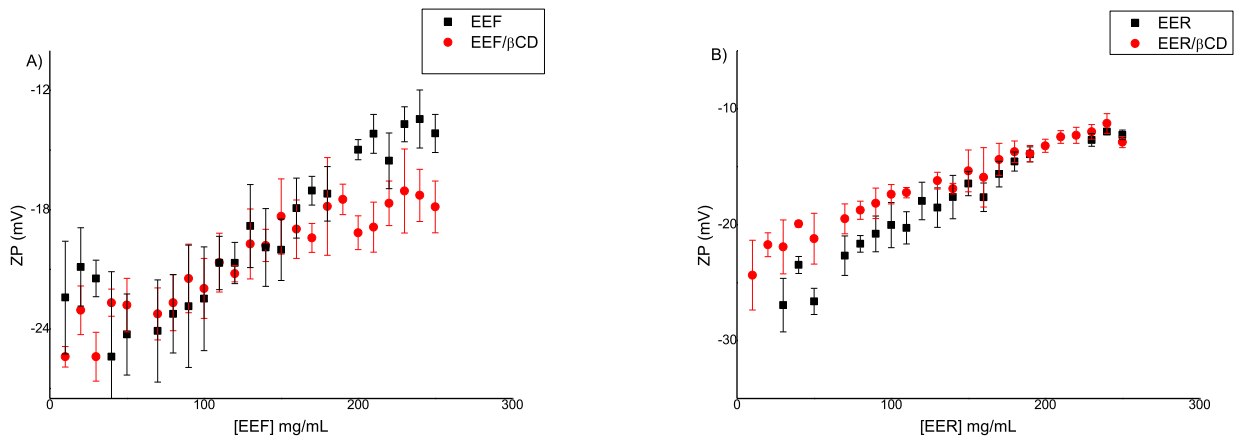
A intensidade do PZ de uma nanopartícula está intimamente relacionada com sua estabilidade coloidal, visto que a repulsão eletrostática ajuda a evitar coalescência das nanopartículas (PLAZA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2014). Para as nanopartículas, o alto valor negativo do PZ confere alta dispersibilidade e estabilidade à longo prazo, com baixa tendência de agregação (NETALA et al., 2016), uma vez que as partículas carregadas se repelem umas das outras e essa força supera as forças atrativas de Van der Waals (INSTRUTECNICA, 2016; MALVERN, 2005). Do ponto de vista prático, tem sido observado que suspensões com valores de PZ superiores a + 30 mV ou inferiores a - 30 mV são estáveis, enquanto que aquelas cujo

valor se situa entre - 30 mV e + 30 mV são mais instáveis e podem flocular (INSTRUTECNICA, 2016; MALVERN, 2005).

A figura 23 representa os valores do PZ em função da concentração. Conforme observado, os valores de PZ dos extratos e fitocomplexos supramoleculares apresentaram-se na faixa de 0 a - 30 mV, ou seja, estão na região de instabilidade, com ligeira tendência de agregação, especialmente a altas concentrações, quando a probabilidade de colisões entre as partículas é maior, favorecendo a agregação.

Para ambos os fitocomplexos supramoleculares, os valores de PZ foram muito próximos dos valores dos extratos puros. Contudo, para o EER, os valores de PZ foram ligeiramente maiores que os valores do seu respectivo fitocomplexo supramolecular, corroborando com os valores de condutividade, pois uma menor concentração de íons no meio é reflexo de um menor grau de ionização.

Figura 23 - Distribuição dos valores de PZ para os extratos e fitocomplexos supramoleculares em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD B) EER e EER/ β CD



Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.4.3 Diâmetro hidrodinâmico por DLS - $\langle D_h \rangle$

A técnica de espalhamento de luz é utilizada para determinar o tamanho médio de nanopartículas em suspensões líquidas. As partículas são submetidas a um feixe

de luz monocromático com intensidade de luz espalhada medida a um ângulo de 90°. Partículas maiores se movimentam mais lentamente do que os menores se a temperatura for a mesma. Entretanto, tal determinação pode não ser tão simples, pois as partículas de uma amostra são na maioria das vezes irregulares ou polidispersas, podendo ainda estar em constante movimento (movimento Browniano) quando imersas em um fluido dispersante (MALVERN, 2005; MURDOCK et al., 2008).

A esfera é a única forma geométrica que, dimensionalmente, pode ser definida apenas por um parâmetro (o diâmetro). Como em sua grande maioria as partículas de uma amostra não possuem essa geometria, ou ainda, é impossível determinar o real formato das quais, questiona-se, então, como definir a dimensão de uma partícula de forma irregular (LANNA et al., 2016).

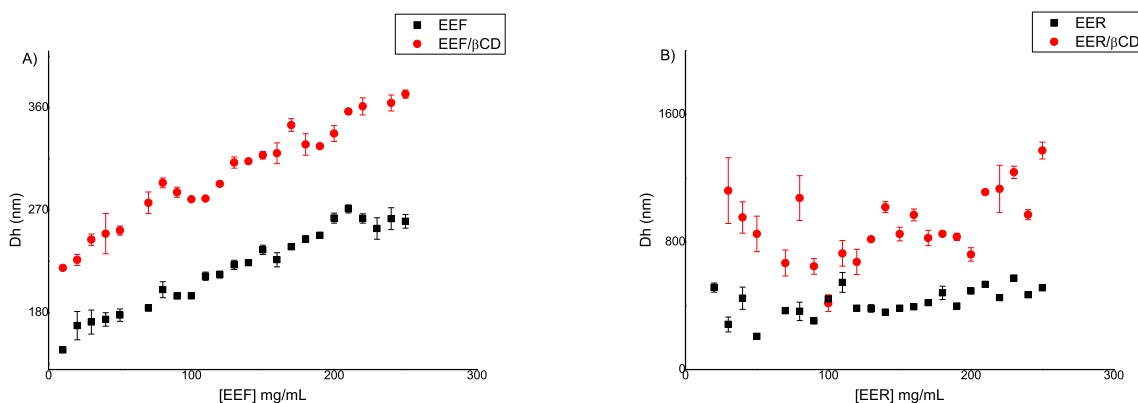
Em sistemas formados apenas por partículas pequenas, a variação da intensidade de luz espalhada é maior, pois se movimentam mais rapidamente e cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo. As flutuações de intensidade resultantes são utilizadas para calcular o D_h das partículas do sistema, independente do seu formato, pois elas possuem hipoteticamente o diâmetro de uma esfera de mesmo coeficiente de difusão D . Portanto, foi utilizada a equação de Stokes-Einstein (DENADAI, 2005; KANTER, 2016):

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta\langle D_h \rangle} \quad \text{Equação 6}$$

Onde, D é o coeficiente de difusão, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, η é a viscosidade dinâmica, $\langle D_h \rangle$ é o diâmetro hidrodinâmico médio.

A figura 24 mostra valores de D_h para os extratos e fitocomplexos supramoleculares, onde pode ser observado que tanto as dispersões obtidas para o extrato puro quanto para os compostos de inclusão apresentaram estruturas nanométricas em meio aquoso.

Figura 24 - Distribuição de tamanho de partículas em suspensão dos extratos e fitocomplexos supramoleculares em função da concentração. A) EEF e EEF/ β CD e B) EER e EER/ β CD



Legenda: EEF – extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER – extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico do ramo de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

No sistema EEF e EEF/ β CD foi possível observar um aumento gradativo do tamanho das partículas à medida que se aumenta a concentração do meio, corroborando a afirmação de que o aumento da concentração também aumenta a probabilidade de contato entre as partículas, logo aumenta a tendência de agregação. Embora para o EER e EER/ β CD o comportamento não seja tão evidente, também tem-se um aumento do tamanho com a concentração. Além disso, para o EER, o tamanho de partículas é bem maior em comparação ao EEF, isso se deve ao teor de moléculas maiores, como os fenóis e taninos, nos ramos e, conseqüentemente, seu fitocomplexo supramolecular (Tabelas 3 e 5). Desta forma taninos são moléculas estruturalmente maiores, de peso molecular alto, podendo formar uma estrutura polimérica (Figuras 4 - 7), enquanto que os flavonoides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular (SIMÕES et al., 1999), os quais compõem em maior quantidade o extrato da folha.

Como as ciclodextrinas complexam com os componentes dos extratos, novas interações intermoleculares são estabelecidas e, portanto, é esperado que os agregados formados tivessem forma e tamanho diferentes. Isso ocorre em virtude da redução gradativa da solubilidade dos compostos quando se aumenta a concentração e pode ser explicado pelos menores valores de PZ e de condutividade do meio.

Além disso, o aumento do tamanho de partículas na presença da β CD pode corroborar a hipótese de que há um comprometimento das ligações de hidrogênio, já que com menores valores de PZ, a coalescência e o crescimento delas são favorecidos.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

No ensaio de DPPH é avaliada a habilidade de sequestrar radicais livres de um composto antioxidante que está intimamente associado com a capacidade dessa substância em doar átomos de hidrogênio (YANG et al., 2008). A molécula DPPH é caracterizada como um radical livre estável devido à conjugação dos elétrons desemparelhados por toda a molécula. Essa deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, capaz de produzir uma banda de absorção com máxima próximo de $\lambda = 520$ nm. Na presença de uma substância doadora de hidrogênio, esse radical é reduzido à difenil-picril-hidrazina (DPPH-H), o qual possui coloração amarelada e menor intensidade de absorção (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; KEDARE & SINGH, 2011).

Sabe-se que, quanto maior for o consumo de DPPH pela amostra, maior é sua atividade antioxidante e menor é o valor da concentração inibitória de 50 % (CI_{50}), que é a quantidade necessária da amostra para inibir metade da ação oxidante do DPPH. Portanto, pode-se inferir que todas as amostras testadas, exceto β CD, mostraram um resultado promissor quanto a essa atividade. A CI_{50} da β CD foi acima de 250 μ g/mL, o que entende-se que não há inibição satisfatória deste composto (Tabela 6). A capacidade antioxidante de EEF, EER, EEF/ β CD e EER/ β CD variaram entre $1,45 \pm 0,02$; $1,43 \pm 0,08$; $1,53 \pm 0,06$ e $1,96 \pm 0,16$ μ g/mL respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si, mostrando que para este ensaio os extratos e fitocomplexos foram equivalente, salvo entre EER e EER/ β CD ($p < 0,05$).

A maioria dos trabalhos sobre atividade antioxidante de jabuticaba concentra-se nos seus frutos. Leite-Legatti et al. em 2012, por exemplo, encontrou a CI_{50} de 45,38 μ g/mL para as cascas de jabuticaba no ensaio de redução do radical DPPH. Einbond et al. (2004), trabalhando com extrato metanólico purificado do fruto da jabuticaba, encontraram um valor para CI_{50} $6,2 \pm 0,7$ μ g/mL no mesmo ensaio.

O que se sabe sobre a capacidade antioxidante das folhas e ramos é que Souza-Moreira et al. (2010) avaliaram diferentes extratos polares das folhas de *P. cauliflora* e observaram inibição acima de 90 % na concentração de 250 µg/mL, corroborando com nossos achados. Já os ramos apresentaram CI_{50} de 17 µg/mL no estudo de Wang W.H. et al. (2014). No entanto, nossos resultados se mostraram promissores e isso pode estar relacionado a vários fatores, tais como a eficiência de extração, a qual possibilitou extrair altos teores de substâncias fenólicas; o período de coleta do material vegetal (sazonalidade); a idade e estágio de desenvolvimento da planta; o armazenamento do extrato; dentre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; PALUDO et al., 2019).

O ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio é um método simples, barato e eficaz para avaliar a capacidade antioxidante total de uma matriz complexa, como é o caso dos extratos obtidos de plantas. Este método possui a vantagem de analisar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO et al., 1999). A solução de fosfomolibdênio preparada apresenta coloração amarela e, torna-se verde, à medida que o fosfato de molibdênio sofre redução. Dessa forma, a presença de determinadas substâncias com potencial antioxidante reduz o complexo fosfomolibdênico (BALESTRIN et al., 2008). Os resultados encontrados neste ensaio confirmam o potencial antioxidante achado no ensaio de DPPH, além de reforçar que os compostos fenólicos dos extratos possuem um papel importante para atividade biológica (MALAFRONTTE et al., 2009).

Os resultados para este ensaio foram expressos em porcentagem relativa (AAR%) de ácido ascórbico, quercetina e rutina, sendo os valores próximos a 100 % considerados os mais promissores, uma vez que aproxima-se da atividade produzida pelos controles positivos.

Desta forma, nota-se que a porcentagem relativa de rutina, quercetina e ácido ascórbico para EEF/ β CD ($100,53 \pm 5,19$; $38,30 \pm 2,15$; $20,66 \pm 1,16$; respectivamente) foi inferior ao encontrado para o EEF ($209,18 \pm 15,2$; $80,44 \pm 5,84$; $44,07 \pm 3,48$, respectivamente), com diferença estatística ($p < 0,05$). Além disso, a porcentagem relativa de rutina, quercetina e ácido ascórbico para EER/ β CD ($105,35 \pm 9,03$; $40,51 \pm 3,47$; $21,86 \pm 1,87$, respectivamente) também mostrou valores inferiores em relação ao EER ($261,74 \pm 33,50$; $97,44 \pm 12,90$; $51,11 \pm 5,74$, respectivamente) ($p < 0,05$) (Tabela 6). Isso se deve, provavelmente, ao curto tempo de reação, onde não foi

possível verificar a liberação dos componentes dos extratos complexados com β CD e, portanto, eles permaneceram protegidos através das ligações de hidrogênio entre as hidroxilas dos compostos fenólicos e os átomos de oxigênio presentes no interior da cavidade da β CD. Logo, essa interação pode estar diminuindo a possibilidade de reação no experimento, uma vez que as hidroxilas fenólicas participam da atividade antioxidante. Além disso, percebe-se que a porcentagem relativa de rutina e quercetina para ambos os extratos foi satisfatória. No entanto, a AAR% para o ácido ascórbico não foi tão eficiente, mostrando que a composição desses extratos possuem similaridade com os compostos fenólicos quercetina e rutina.

Outra análise antioxidante realizada neste estudo foi o método de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico. É um método colorimétrico, desenvolvido em comprimento de onda de 470 nm e baseia-se na descoloração da emulsão preparada com β -caroteno e ácido linoleico. Este fenômeno ocorre em função das estruturas radiculares formadas pela oxidação lipídica do ácido linoleico, que atacam as duplas ligações do β -caroteno, perdendo seu cromóforo, resultando na descoloração do pigmento alaranjado. A presença de compostos antioxidantes no sistema inibe a oxidação do ácido linoleico (peroxidação lipídica), consequentemente, inibindo a formação dos radicais livres durante esse processo e preservando a coloração do β -caroteno (ALVES et al., 2010; MOON et al., 2009; SUCUPIRA et al., 2012).

As porcentagens de inibição dos extratos e fitocomplexos, relativas à concentração que apresentou maior inibição (38,46 μ g/mL), apresentadas na tabela 6, foram superiores ao controle positivo rutina (25,2 \pm 0,90 %) e quercetina (64,43 \pm 2,40 %) ($p < 0,05$), exceto EER/ β CD que mostrou diferença em relação à quercetina ($p < 0,05$). No entanto, nota-se que β CD não teve inibição nesse ensaio uma vez que mostrou resultado negativo (- 3,04 \pm 6,33 %). Além disso, EEF (71,47 \pm 5,64 %) e EER (62,50 \pm 4,18 %) mostraram inibição superior aos respectivos fitocomplexos, EEF/ β CD (51,39 \pm 4,40 %) e EER/ β CD (45,13 \pm 1,11 %) ($p < 0,05$). Tal comportamento dos fitocomplexos corrobora com os resultados encontrados nos ensaios anteriores de atividade antioxidante. A diferença significativa entre os fitocomplexos e seus respectivos extratos puros pode ser explicada pela mesma hipótese relatada no ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio neste estudo.

Embora não tenha muitos relatos na literatura sobre a inibição da peroxidação lipídica para a jabuticaba, Lima et al. (2011) descreveram a inibição de

aproximadamente 70 % na concentração de 1 mg/mL, no mesmo ensaio, para as cascas do fruto da jabuticaba, em decorrência da presença de compostos fenólicos no extrato dessa parte da planta. No entanto, em nosso estudo, o extrato das folhas apresentou inibição acima de 70 % na concentração de 38,46 µg/mL, sendo um resultado superior e muito promissor.

Além disso, também avaliou-se a eficiência antioxidante através dos parâmetros F1 e F2, onde F1 fundamenta-se na capacidade de bloqueio da formação de peróxidos que ocorre no início da reação, entre 15 e 45 min, e F2 a capacidade de inibir outras substâncias geradas durante o processo oxidativo (produtos de decomposição dos peróxidos), entre 75 e 90 min após o início da reação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Segundo Nascimento et al. (2010), para um desempenho antioxidante satisfatório, os valores de F1 e F2 devem ser menores que 1 e mais próximos de 0. Portanto, os valores de F1 dos extratos e fitocomplexos mostraram que ambos são capazes de bloquear a formação de radicais peróxidos na fase de propagação, com diferença significativa em relação à rutina e quercetina ($p < 0,05$). No entanto, apenas EEF e EER/βCD apresentaram capacidade em bloquear as outras espécies radicalares, na fase terminal da peroxidação lipídica (F2), diferenciando estatisticamente dos controles positivos ($p < 0,05$). No entanto, a βCD mostrou que não apresenta boa capacidade para bloquear a produção de espécies radicalares em ambas etapas de formação (valores próximos de 1).

Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante de rutina, quercetina, EEF, EEF/ β CD, EER, EER/ β CD e β CD através dos métodos de inibição do radical DPPH, redução do complexo fosfomolibdênio e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico

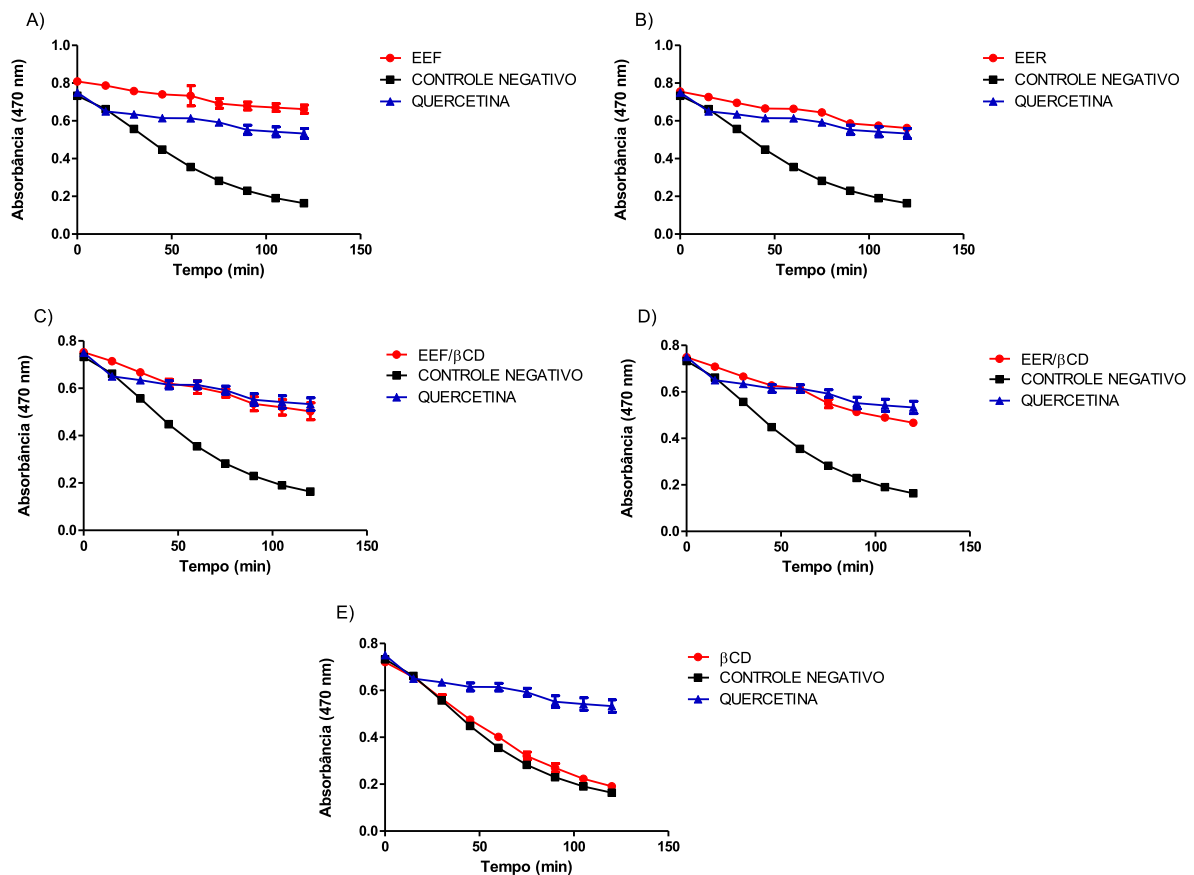
Amostras	DPPH - CI_{50} (μ g/mL)	Complexo fosfomolibdênio			β -caroteno/ácido linoleico (38,46 μ g/mL)		
		% relativa quercetina	% relativa rutina	% relativa ác. ascórbico	Inibição (%)	F1	F2
Rutina	0,54 \pm 0,37	-----	-----	-----	25,2 \pm 0,9	0,59 \pm 0,009	1,63 \pm 0,32
Quercetina	0,33 \pm 0,12	-----	-----	-----	64,43 \pm 2,40	0,57 \pm 0,07	0,70 \pm 0,11
EEF	1,45 \pm 0,02 ^{a,b,c}	80,44 \pm 5,84 ^{c,e}	209,18 \pm 15,20 ^{c,e}	44,07 \pm 3,48 ^{c,e}	71,47 \pm 5,64 ^{a,c,e}	0,21 \pm 0,008 ^{a,b,c,e}	0,26 \pm 0,15 ^{a,b,c}
EEF/ β CD	1,53 \pm 0,06 ^{a,b,c}	38,30 \pm 2,15 ^{c,e}	100,53 \pm 5,19 ^{c,e}	20,66 \pm 1,16 ^{c,e}	51,39 \pm 4,40 ^{a,c,e}	0,42 \pm 0,06 ^{a,b,c,e}	0,59 \pm 0,28 ^a
EER	1,43 \pm 0,08 ^{a,b,c,d}	97,44 \pm 12,90 ^{c,d}	261,74 \pm 33,50 ^{c,d}	51,11 \pm 5,74 ^{c,d}	62,50 \pm 4,18 ^{a,c,d}	0,27 \pm 0,01 ^{a,b,c}	0,66 \pm 0,12 ^a
EER/ β CD	1,96 \pm 0,16 ^{a,b,c,d}	40,51 \pm 3,47 ^{c,d}	105,35 \pm 9,03 ^{c,d}	21,86 \pm 1,87 ^{c,d}	45,13 \pm 1,11 ^{a,b,c,d}	0,36 \pm 0,05 ^{a,b,c}	0,39 \pm 0,08 ^{a,b,c}
β CD	> 250,00 ^{a,b}	10,33 \pm 2,51	27,52 \pm 6,67	5,57 \pm 1,35	- 3,04 \pm 6,33 ^{a,b}	0,82 \pm 0,07 ^{a,b}	0,96 \pm 0,04 ^a

Legenda: EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. a – Diferença estatística em relação ao controle positivo rutina ($p < 0,05$). b – Diferença estatística em relação ao controle positivo quercetina ($p < 0,05$). c – Diferença estatística em relação à β CD ($p < 0,05$). d – Diferença estatística entre as amostras EER e EER/ β CD ($p < 0,05$). e - Diferença estatística entre as amostras EEF e EEF/ β CD ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

O perfil de decaimento da absorvância do β -caroteno para o controle negativo mostrou que houve oxidação do ácido linoleico, uma vez que percebe-se um decaimento contínuo da curva, enquanto que ambos os extratos e fitocomplexos foram capazes de inibir a oxidação ao longo de 120 minutos, e conseqüentemente, preservaram a coloração do β -caroteno, assemelhando-se a curva de oxidação do padrão quercetina (Figura 25). O contrário é observado pelo perfil de decaimento de β CD (E), que apresentou semelhança ao controle negativo (100 % oxidação).

Figura 25 - Gráficos do perfil de decaimento da absorvância do β -caroteno (curva de oxidação), avaliada em 470 nm, mostrando a preservação de sua coloração ao longo de 120 minutos de reação na presença de (A) EEF, (B) EER, (C) EEF/ β CD, (D) EER/ β CD e (E) β CD



Legenda: A) EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. B) EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. C) EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. D) EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. E) β CD - β -ciclodextrina. Atividade antioxidante dos extratos e fitocomplexos por meio da inibição da peroxidação lipídica e preservação da coloração do β -caroteno ao longo de 120 minutos.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

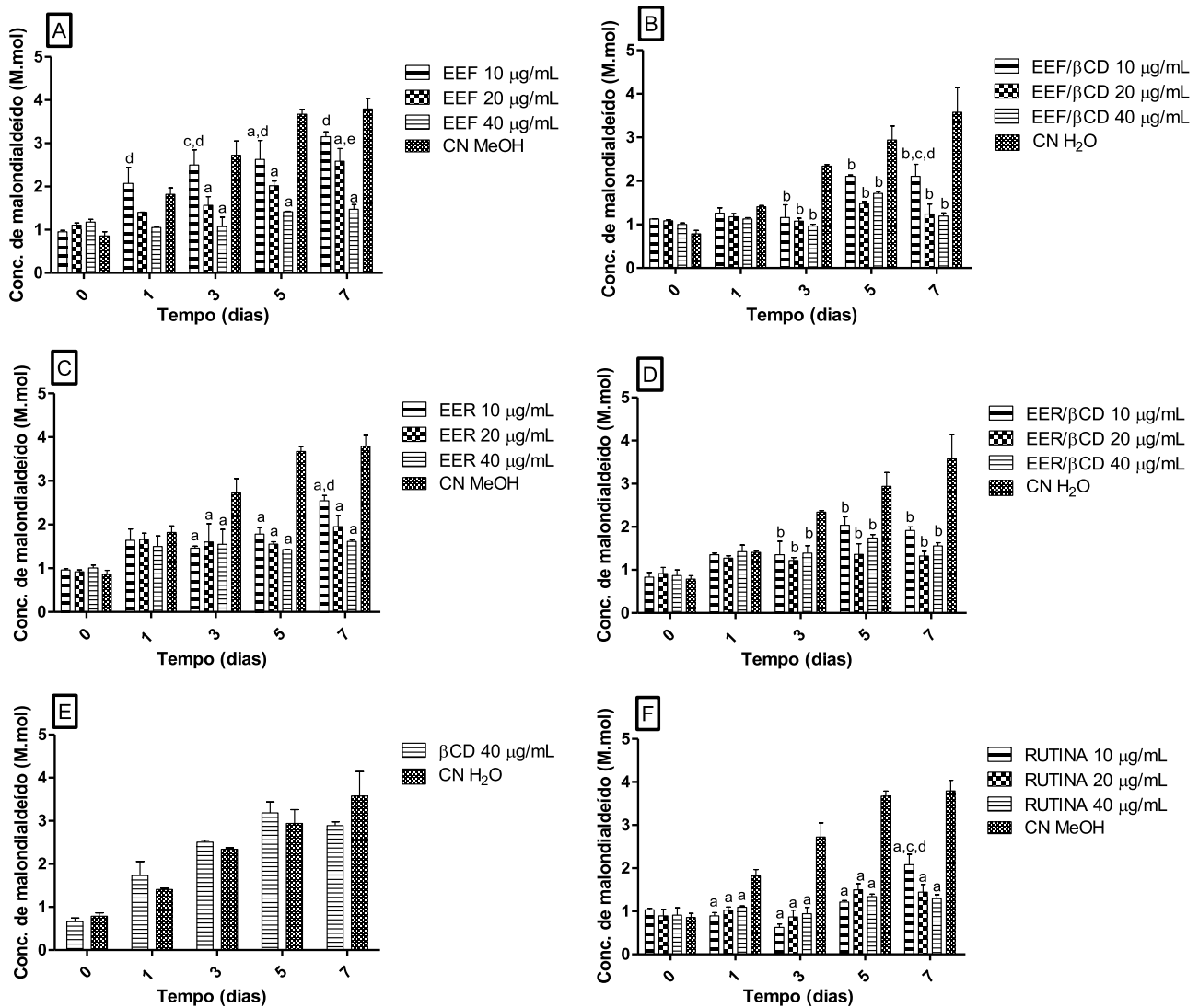
Durante o processo de peroxidação lipídica, os radicais livres produzidos leva a formação de radicais lipídicos, que na presença de oxigênio molecular formarão o radical lipídico peroxil (LOO^\cdot). Tal radical pode interagir com um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo vizinho e formar um segundo radical lipídico, os peróxidos (LOOH). Esses, por sua vez, são passíveis de decomposição e podem favorecer a produção de aldeídos, substâncias reativas capazes de gerar danos celulares (YADAV & RAMANA, 2013). Dentre eles, o malondialdeído (MDA) é uma molécula bastante utilizada como biomarcador da peroxidação lipídica (AYALA, MUÑOZ & ARGÜELLES, 2014). Portanto, a fim de corroborar com o modelo de peroxidação lipídica através do sistema β -caroteno/ácido linoleico, foi realizado o ensaio de doseamento de MDA, por meio da complexação dessa substância com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que produz uma coloração avermelhada.

Neste ensaio, uma amostra com potencial antioxidante significativo precisa inibir a produção de malondialdeído, formada durante a peroxidação lipídica da carne. Conforme observado na figura 26, os extratos e fitocomplexos apresentaram potencial inibição a partir do terceiro dia de tratamento de forma significativa ($p < 0,05$), uma vez que nos dias zero e um não houve diferença estatística entre todas as concentrações das amostras e os controles negativos.

Ao fazer uma comparação entre os extratos e seus respectivos fitocomplexos, observa-se que o EEF/ β CD mostrou melhora na atividade antioxidante diante do EEF, com diferença significativa nas concentrações nominais de extrato de $10 \mu\text{g/mL}$ nos dias 3 ($p < 0,01$) e 7 ($p < 0,05$) e de $20 \mu\text{g/mL}$ no dia 7 ($p < 0,001$). No entanto, EER e EER/ β CD não diferenciaram significativamente.

A presença da β CD pode promover o aumento da estabilidade dos componentes dos extratos uma vez complexados, protegendo-os da oxidação no meio reagente. Conseqüentemente, eles permanecem mais tempo em contato com o meio sem sofrer rápida degradação, melhorando sua atividade biológica. Além disso, essa melhora pode ser associada também com o aumento da solubilidade e biodisponibilidade dos compostos após o encapsulamento, o que favorece a interação dos constituintes antioxidantes no meio biológico. Na literatura é descrito, que as ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com polifenóis, aumentando assim a solubilidade destes compostos (LOFTSSON & DUCHÊNE et al., 2007).

Figura 26 - Gráficos de redução da produção de malondialdeído na presença de (A) EEF, (B) EEF/ β CD, (C) EER (D) EER/ β CD (E) β CD e (F) rutina, nas concentrações nominais de extrato 10; 20 e 40 μ g/mL



Legenda: (A) EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. (B) EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. (C) EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. (D) EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. (E) β CD - β -ciclodextrina. (F) Rutina (controle positivo). CN H₂O – Controle negativo com água. CN MeOH – Controle negativo com metanol. Atividade antioxidante dos extratos e fitocomplexos por meio da inibição da formação de malondialdeído. a – Diferença estatística em relação ao CN MeOH ($p < 0,05$). b – Diferença estatística em relação ao CN H₂O ($p < 0,05$). c - Diferença estatística entre as concentrações 10 e 20 μ g/mL ($p < 0,05$). d - Diferença estatística entre as concentrações 10 e 40 μ g/mL ($p < 0,05$). e - Diferença estatística entre as concentrações 20 e 40 μ g/mL ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

5.6 VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

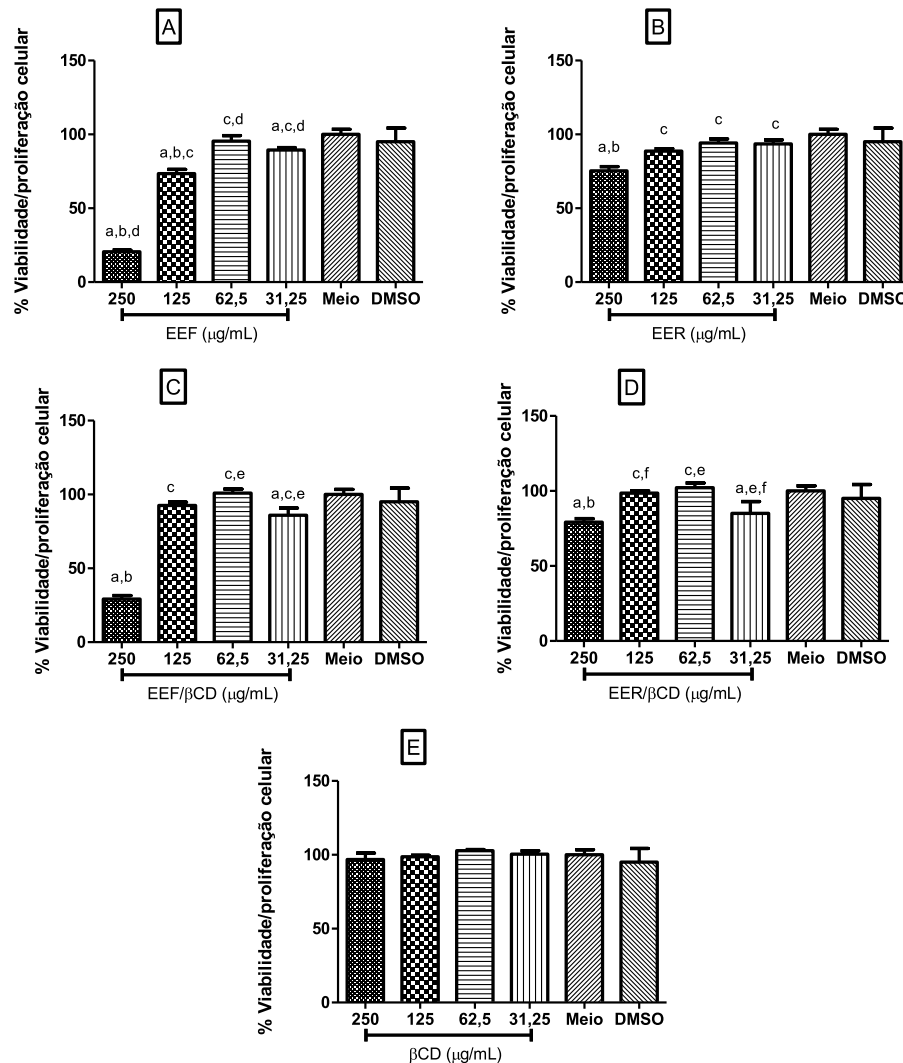
Sabe-se que alguns dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado, como os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) e não-esteroidais (AINEs), podem aumentar o risco de complicações gastrointestinais e cardiovasculares devido a seus efeitos citotóxicos, principalmente durante o seu uso à longo prazo (SOSTRES et al., 2010). Os glicocorticoides, por exemplo, é a principal classe de fármacos utilizada no tratamento de inflamação de pele. Eles são capazes de alcançar facilmente à circulação sistêmica, causando efeitos adversos graves que prejudicam o metabolismo dos lipídeos e carboidratos, podendo afetar os órgãos relacionados ao sistema imunológico, além dos olhos, coração, músculos, ossos e a própria pele (POETKER & REH, 2010; SARNES et al., 2011, RANG et al., 2012).

Diante disso, a descoberta de novas substâncias bioativas que possuem potencial atividade anti-inflamatória, que não apresentam ou tenham baixa toxicidade às células do organismo humano é de grande relevância. Portanto, para investigar essa atividade foi avaliada a viabilidade celular das amostras em células J774.A1, através do ensaio de redução do MTT, que possibilita analisar a sobrevivência e proliferação celular. O MTT é reduzido à formazan por todas as células metabolicamente ativas vivas, mas não por células mortas ou eritrócitos (MOSMANN, 1983). O percentual de viabilidade aceitável é determinado de acordo com o Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization*) (ISO10993-5, 2009), o qual estabelece que na investigação de citotoxicidade de substâncias *in vitro* a viabilidade celular não deve ser reduzida para valores inferiores à 70 %.

As concentrações das amostras utilizadas a partir deste teste em diante foram escolhidas de acordo com as concentrações utilizadas nos testes antioxidantes, a fim de verificar se tais concentrações produzem resultados promissores tão quanto das análises anteriores.

Na figura 27, observa-se que a viabilidade celular foi satisfatória para todas as amostras nas concentrações de 125; 62,5 e 31,25 µg/mL, uma vez que apresentaram valores acima de 70 %. No entanto, EEF (A) e EEF/βCD (C) reduziram significativamente a viabilidade celular na maior concentração ($p < 0,05$), mostrando uma proliferação celular de 20 e 29 %, respectivamente.

Figura 27 - Avaliação do perfil de viabilidade celular de (A) EEF, (B) EER, (C) EEF/ β CD, (D) EER/ β CD e (E) β CD em macrófagos da linhagem J774A.1, nas concentrações nominais de extrato 250; 125; 62,5 e 31,25 μ g/mL



Legenda: (A) EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. (B) EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. (C) EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. (D) EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. (E) β CD - β -ciclodextrina. Células cultivadas apenas com meio de cultura DMEM e sem tratamento. Células cultivadas com meio de cultura DMEM tratadas com DMSO à 0,5 %. Células tratadas com diferentes concentrações dos extratos de *Plinia cauliflora*, seus respectivos fitocomplexos e β CD. a - Diferença estatística em relação aos controles tratados com o meio ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação aos controles tratados com DMSO à 0,5 % ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação a concentração de 250 μ g/mL ($p < 0,05$). d - Diferença estatística em relação a concentração de 125 μ g/mL ($p < 0,05$). e - Diferença estatística entre as concentrações de 62,5 e 31,25 μ g/mL ($p < 0,05$). f - Diferença estatística entre as concentrações de 125 e 31,25 μ g/mL ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Uma análise comparativa entre os extratos e seus respectivos fitocomplexos revelou que nas concentrações de 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ o EEF/ βCD diferenciou significativamente em relação ao EEF ($p < 0,05$), nas mesmas concentrações, comprovando que houve melhora significativa na viabilidade quando o extrato está complexado em ciclodextrina, contribuindo para a diminuição do potencial toxicológico do extrato.

De acordo com a ISO10993-5 (2009), o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e somente após comprovada sua não toxicidade é que os estudos biológicos com o material pode ser continuado, assim como os ensaios com animais de laboratório. Logo, podemos inferir que as concentrações testadas nesse ensaio são seguras, pois não apresentaram citotoxicidade para as células, exceto a maior concentração para EEF e EEF/ βCD .

No estudo de Souza-Moreira et al. (2011) o extrato das folhas apresentou maior citotoxicidade quando comparado ao extrato dos frutos de *P. cauliflora*, argumentando que esse efeito se deve aos maiores teores dos ácidos gálico e elágico e derivados de flavonoides nas folhas do que nos frutos, os quais são relatados por apresentar efeitos citotóxicos (ISHIHARA & SAKAGAMI, 2003; PLOCHMANN et al. 2007).

Nas últimas décadas, o impacto de produtos naturais no processo de desenvolvimento de novos compostos (fármaco, aditivo alimentar, ou inseticida) é inquestionável, devido à diversidade de seus constituintes, a possibilidade de empregá-los como fitofármacos e por proporcionarem grandes chances de se obterem moléculas protótipos (CUENDET & PEZZUTO, 2008). Dessa forma, os fitocomplexos supramoleculares apresentam grande potencial diante das atividades biológicas, pois de acordo com os resultados *in vitro*, eles são seguros para serem testados em ensaios *in vivo*, podendo melhorar a biodisponibilidade dos componentes dos extratos e, conseqüentemente, sua atividade biológica.

A produção de radicais livres está estreitamente relacionada ao processo inflamatório, visto que são produzidas por células do sistema imune que possuem participação ativa no surgimento da inflamação. Essas espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pelas células do sistema imunológico são mediadores cruciais da inflamação, podendo causar lesões celulares e agravamento do processo que se iniciou (CONNER & GRISHAM, 1996).

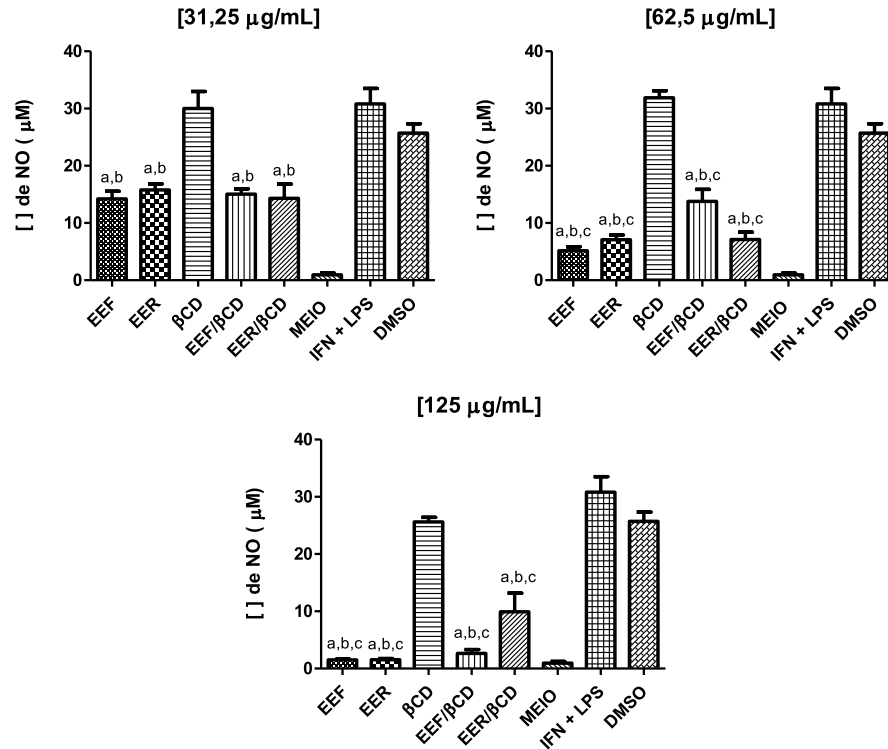
Sabe-se que o óxido nítrico (NO) é uma molécula importante no processo inflamatório. Este radical é capaz de ativar as enzimas ciclo-oxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), que aumentam os níveis de prostaglandinas, agravando ainda mais o processo inflamatório. Os macrófagos M1 (classicamente ativado) adquirem esse perfil em resposta a moléculas pró-inflamatórias presentes no organismo e após polarização, tornam-se células com grande capacidade de produção e liberação de citocinas inflamatórias, EROs e NO (FANG et al., 2015).

Simultaneamente ao ensaio de viabilidade celular, foi avaliada a atividade anti-inflamatória *in vitro* pela dosagem indireta de NO em sobrenadante de macrófagos J774A.1, os quais foram previamente tratados com as amostras (EEF, EER, EEF/ β CD, EER/ β CD e β CD) nas mesmas concentrações do teste de viabilidade celular, exceto a concentração de 250 μ g/mL, que foi descartada, pois apresentou proliferação celular abaixo de 70 % para o extrato e fitocomplexo das folhas (Figura 28).

Todas as amostras, exceto β CD, foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a concentração de NO nas três concentrações avaliadas. No entanto, EEF/ β CD apresentou menor inibição da produção de NO, uma vez que a concentração de NO foi maior em relação ao EEF na concentração de 62,5 μ g/mL, enquanto que EER/ β CD foi inferior ao EER na concentração de 125 μ g/mL ($p < 0,05$). Pouco se sabe sobre esse comportamento dos fitocomplexos, para isso mais análises seriam necessárias. A β CD não foi capaz de inibir NO, assemelhando-se ao controle negativo (células não tratadas).

Em geral, esses resultados mostram que as amostras possuem constituintes capazes de reduzir a produção de mediadores inflamatórios, como o NO, corroborando com a atividade antioxidante realizada neste estudo, visto que se trata de uma espécie reativa.

Figura 28 - Atividade anti-inflamatória *in vitro* por meio da redução da produção de óxido de nítrico (NO) na presença de EEF, EER, EEF/ β CD, EER/ β CD e β CD, nas concentrações nominais de extrato 125; 62,5 e 31,25 μ g/mL



Legenda: EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. Células cultivadas apenas com meio de cultura DMEM e sem tratamento. Células não tratadas e estimuladas com LPS e IFN- γ . Células estimuladas e tratadas apenas com DMSO à 0,5 %. Células tratadas com diferentes concentrações dos extratos de *Plinia cauliflora*, seus respectivos fitocomplexos e β CD. a - Diferença estatística em relação as células não tratadas e estimuladas com IFN- γ + LPS ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação a β CD ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação as células não estimuladas e tratadas com DMSO à 0,5 % ($p < 0,05$). ANOVA seguindo teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

O estudo da atividade anti-inflamatória *in vivo* de formulações nanoencapsuladas de extratos vegetais é tão necessário para a descoberta de novos fármacos quanto fundamental para comprovação da eficácia de produtos naturais bioativos, pois sabe-se que o uso tradicional não é suficiente para validar eticamente nenhuma planta medicinal como um medicamento seguro e eficaz e, portanto, lançamos mão das

vantagens promovidas pela complexação do extrato vegetal com sistemas supramoleculares (QUINTANS et al., 2013; LANNA et al., 2016).

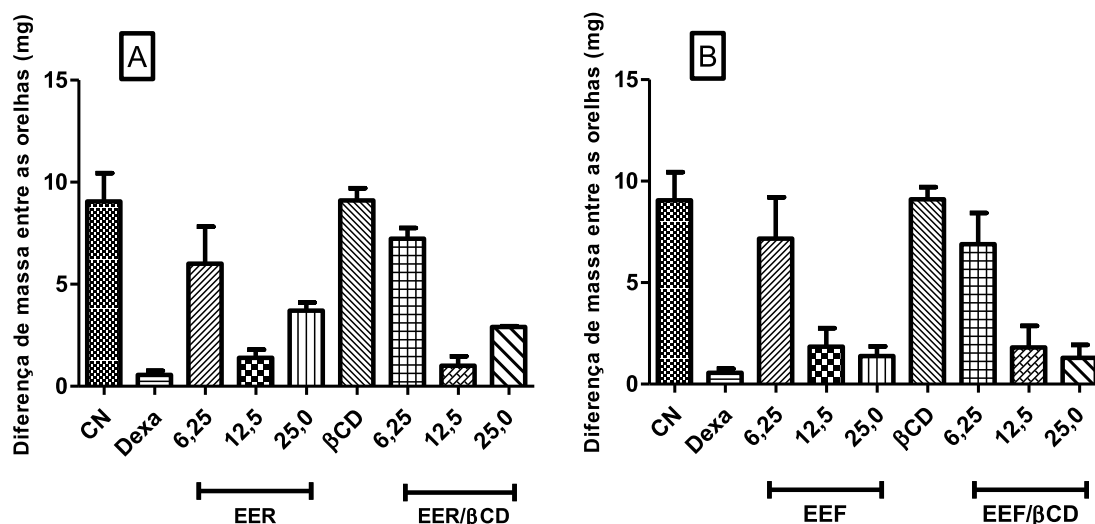
O modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton ou por outros agentes flogísticos permite avaliar a atividade anti-inflamatória em nível de pele, de extratos vegetais ou substâncias isoladas, quando administrados topicamente ou mesmo de maneira sistêmica. Embora já existam vários modelos de inflamação desenvolvidos, o edema de orelha apresenta algumas vantagens interessantes, por ser um método rápido, simples, que requer pouca quantidade de amostra, além de fornecer resultados bastante reprodutíveis, com baixa probabilidade de erros (GÁBOR, 2003; PINTO et al., 2012).

O óleo de cróton, utilizado nesse estudo, contém o 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e outros ésteres de forbol, responsáveis por seu efeito irritante. O TPA é ativador da proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, ativa proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e enzima fosfolipase A₂ (PLA₂), a qual favorece a liberação do fator de ativação plaquetária (PAF) e do ácido araquidônico (AA). Esses mecanismos induzem o aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação, migração leucocitária, liberação de histamina e serotonina, e produção de eicosanoides sintetizados pelas enzimas ciclo-oxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LPOX) (SARAIVA et al., 2011; PINTO et al., 2012).

Com o intuito de comparar a eficiência de encapsulação e a melhora na absorção dos componentes presentes nos extratos quando complexados com ciclodextrina, foram realizados dois tratamentos idênticos, porém em período de tempo distintos, um de 4 horas e outro de 6 horas. As concentrações nominais de extrato, 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL, foram escolhidas de acordo com o protocolo utilizado no laboratório, após levantamento de dados na literatura.

Analisando os gráficos de diferença de massa entre as orelhas no tratamento de 6 horas (Figura 29) percebe-se que a aplicação tópica do óleo de cróton na orelha dos camundongos sem tratamento (controle negativo) promoveu um aumento significativo da massa da orelha e, quando tratadas com dexametasona (controle positivo), extratos e fitocomplexos, observou-se diferentes reduções da massa da orelha para cada concentração testada. O edema formado na presença de β CD pura reproduziu o resultado encontrado para o CN.

Figura 29 - Atividade anti-inflamatória *in vivo* após 6 horas de tratamento. Diferença de massa entre as orelhas tratadas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e dexametasona, nas concentrações nominais de extrato 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL



Legenda: (A) EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. (B) EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina 25,0 mg/mL. CN – Controle negativo (veículo). Dexa – dexametasona (controle positivo) 5 mg/mL. Diferença de massa entre as orelhas edematosas, induzidas por óleo de cróton, após tratamento das amostras nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

O efeito anti-inflamatório dos extratos e fitocomplexos supramoleculares foram semelhantes após a sexta hora do desafio com o mesmo agente flogístico, sendo que a concentração de 12,5 mg/mL apresentou maior inibição do edema para os ramos, enquanto que para as folhas a concentração de 25,0 mg/mL foi superior, com mesma eficiência da dexametasona ($p < 0,05$) (Tabela 7).

O edema foi significativamente reduzido pela aplicação tópica de todas as amostras nas três concentrações analisadas. O EER nas concentrações 6,25 e 25,0 mg/mL e EEF 6,25 mg/mL diferenciaram estatisticamente da dexametasona ($p < 0,05$). No entanto, para EER/ β CD e EEF/ β CD, apenas a concentração 6,25 mg/mL teve diferença significativa em relação à dexametasona. Isso mostra que na presença de β CD houve uma melhora na atividade do EER na concentração 25,0 mg/mL, uma vez que não mostrou diferença significativa em relação à dexametasona.

Tabela 7 - Porcentagem de inibição do edema após tratamento de 6 horas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares e dexametasona. Os valores da massa do edema (mg) correspondem à média \pm desvio padrão. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de ANOVA seguida do teste Bonferroni ($p < 0,05$)

Grupo	Concentração nominal de extrato (mg/mL)	Massa do edema (mg)	% Inibição do edema
CN	-	9,05 \pm 2,77	0
Dexametasona	5,00	0,55 \pm 0,42	93,9
EER	6,25	5,81 \pm 2,84	35,7 ^a
	12,5	1,40 \pm 0,78	84,5 ^{b,c}
	25,0	3,70 \pm 0,81	59,1 ^{a,c}
EER β CD	6,25	7,23 \pm 0,89	20,1 ^a
	12,5	1,00 \pm 0,81	89,0 ^{b,c}
	25,0	2,90 \pm 0,08	68,0 ^c
EEF	6,25	6,71 \pm 2,95	25,8 ^a
	12,5	1,85 \pm 1,80	79,5 ^{d,e}
	25,0	1,37 \pm 0,97	84,8 ^{d,e}
EEF β CD	6,25	6,78 \pm 2,50	25,0 ^a
	12,5	1,80 \pm 1,85	80,1 ^{d,e}
	25,0	1,30 \pm 1,26	85,6 ^{d,e}

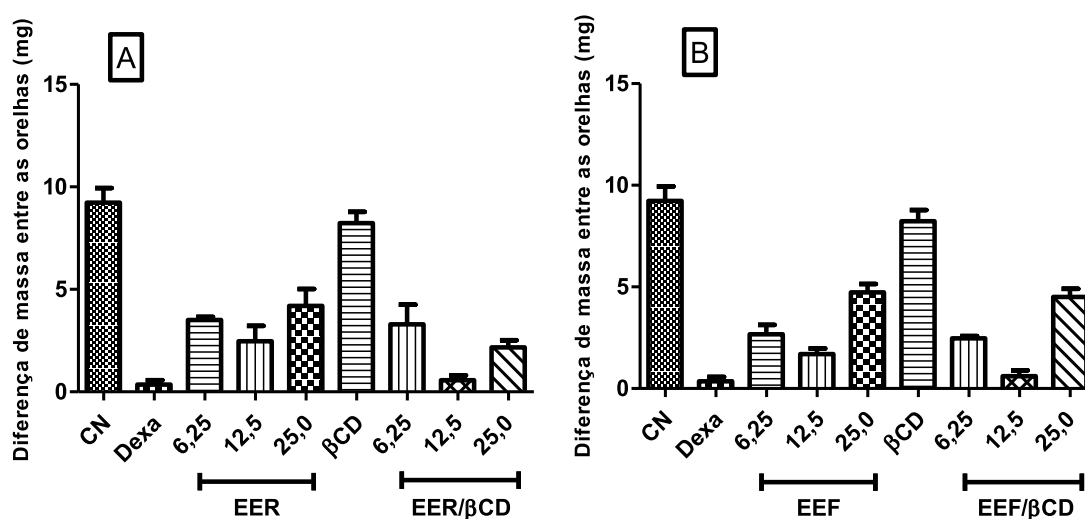
Legenda: EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. CN - orelha tratada somente com acetona (controle negativo). Efeito dos extratos e fitocomplexos supramoleculares sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton após 6 horas de tratamento. a - Diferença estatística em relação à dexametasona ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação à EER 6,25 mg/mL ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação à EER/ β CD 6,25 mg/mL ($p < 0,05$). d - Diferença estatística em relação à EEF 6,25 mg/mL ($p < 0,05$). e - Diferença estatística em relação à EEF/ β CD 6,25 mg/mL ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Os experimentos foram feitos considerando também 4 horas de tratamento. Neste caso, foi possível verificar a ocorrência do processo edematoso nas orelhas dos camundongos, utilizando o mesmo agente flogístico do desafio anterior. No gráfico da figura 30, percebeu-se que a β CD apresentou resposta ao edema equivalente ao CN, mostrando que não houve atividade anti-inflamatória. Em contrapartida, os extratos e fitocomplexos reproduziram uma atividade biológica significativa.

A capacidade de redução do edema foi maior para os fitocomplexos do que para os extratos livres, nas concentrações 12,5 e 25,0 mg/mL, uma vez que os valores das médias foram nitidamente menores nos gráficos da figura 30.

Figura 30 - Atividade anti-inflamatória *in vivo* após 4 horas de tratamento. Diferença de massa entre as orelhas tratadas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares, β CD e dexametasona, nas concentrações nominais de extrato 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL



Legenda: (A) EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/βCD – fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β-ciclodextrina. (B) EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/βCD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β-ciclodextrina. βCD - β-ciclodextrina 25,0 mg/mL. CN – Controle negativo (veículo). Dexa – dexametasona (controle positivo) 5 mg/mL. Diferença de massa entre as orelhas edematosas, induzidas por óleo de cróton, após tratamento das amostras nas concentrações de 6,25; 12,5 e 25,0 mg/mL.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Novamente, o efeito anti-inflamatório dos extratos e fitocomplexos foi melhor para a concentração de 12,5 mg/mL, não havendo diferença estatística significativa entre o controle positivo ($p < 0,05$) (Tabela 8), enquanto que a concentração de 25 mg/mL foi menos efetiva, diferenciando estatisticamente da dexametasona. Tal comportamento pode estar relacionado com a tendência de agregação dos compostos químicos à medida que se aumenta a concentração, como percebido nas figuras 23 e 24, dificultando a interação no meio biológico e resultando um baixo efeito anti-inflamatório.

Tabela 8 - Porcentagem de inibição do edema após tratamento de 4 horas com os extratos, fitocomplexos supramoleculares e dexametasona. Os valores da massa do edema (mg) correspondem à média \pm desvio padrão. As medidas diferem em relação ao controle negativo (acetona) após análise de ANOVA seguida do teste Bonferroni ($p < 0,05$)

Grupo	Concentração nominal de extrato (mg/mL)	Massa do edema (mg)	% Inibição do edema
CN	-	9,225 \pm 1,43	0
Dexametasona	5,00	0,45 \pm 0,48	95,1
EER	6,25	3,50 \pm 0,32	62,1 ^{a,b}
	12,5	2,47 \pm 1,30	73,3
	25,0	4,20 \pm 1,42	54,5 ^{a,b}
EER β CD	6,25	3,30 \pm 1,65	64,2 ^a
	12,5	0,57 \pm 0,40	93,9
	25,0	2,17 \pm 0,60	76,5
EEF	6,25	2,67 \pm 0,81	71,1 ^{a,c,d,e}
	12,5	1,70 \pm 0,46	81,6 ^{c,e}
	25,0	4,73 \pm 0,71	48,7 ^{a,d}
EEF β CD	6,25	2,47 \pm 0,21	73,3 ^{a,c,d,e}
	12,5	0,60 \pm 0,50	93,5 ^{c,e}
	25,0	4,50 \pm 0,70	51,2 ^{a,d}

Legenda: EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. CN - orelha tratada somente com acetona (controle negativo). Efeito dos extratos e fitocomplexos supramoleculares sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton após 4 horas de tratamento. a - Diferença estatística em relação à dexametasona ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação à EER/ β CD 12,5 mg/mL ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação à EEF 25,0 mg/mL ($p < 0,05$). d - Diferença estatística em relação à EEF/ β CD 12,5 mg/mL ($p < 0,05$). e - Diferença estatística em relação à EEF/ β CD 25,0 mg/mL ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2019).

Uma análise comparativa entre os tratamentos de 4 e 6 horas mostrou que os fitocomplexos apresentaram uma melhora na atividade anti-inflamatória diante dos extratos livres no desafio de 4 horas, reproduzindo uma resposta mais rápida, visto que a porcentagem de inibição do edema para os extratos na concentração de 12,5 mg/mL, foi de 73,3 % (EER) e 81,6 % (EEF), enquanto que os fitocomplexos EER/ β CD e EEF/ β CD inibiram 93,9 e 93,5 % respectivamente, na mesma concentração (Tabela

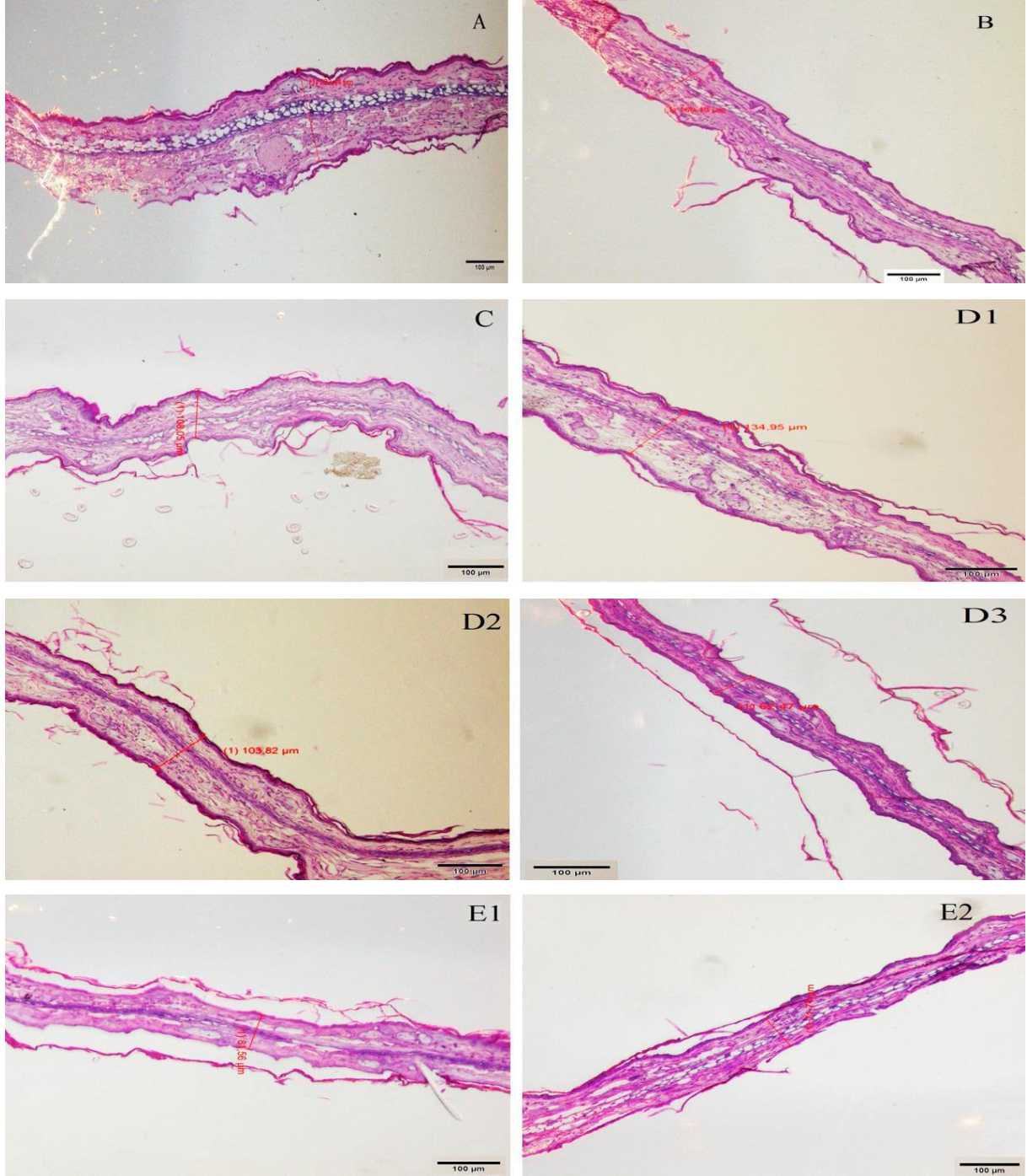
8). Acredita-se que, na presença de β CD houve uma melhora da taxa de permeação dos componentes dos extratos na pele dentro deste intervalo de tempo e, conseqüentemente, o aumento da absorção em relação aos extratos livres, que precisam de mais tempo em contato com a pele para produzir uma resposta equivalente ao fitocomplexo. Acredita-se ainda que, para 6 horas, as diferenças entre os fitocomplexos e extratos puros não sejam tão expressivas, pois foi dado tempo suficiente para que os componentes sofressem permeação até o tecido atingido.

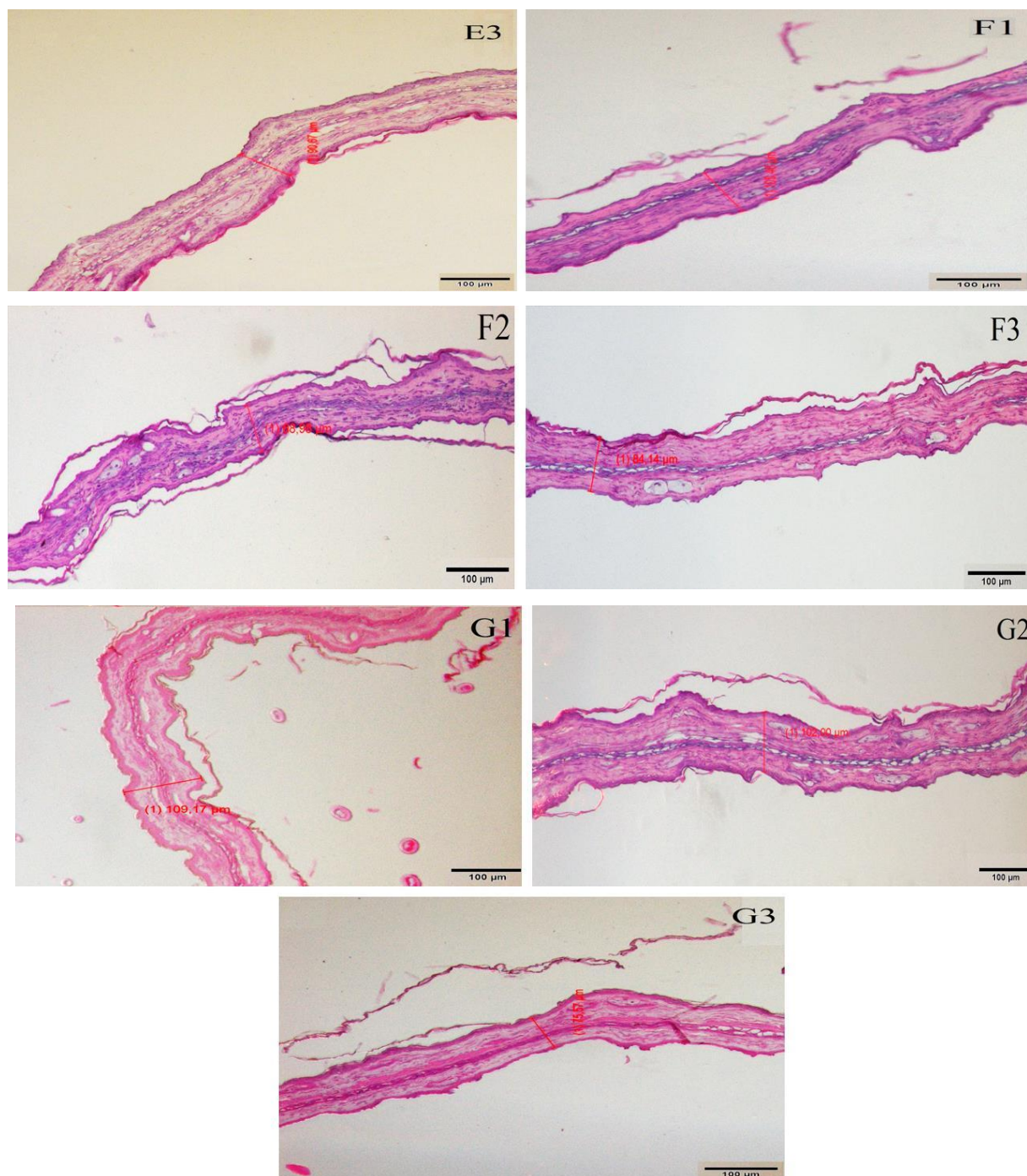
5.8 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Ainda com a finalidade de confirmar e compreender melhor o efeito anti-inflamatório dos extratos e fitocomplexos através do modelo de edema de orelha induzido pela aplicação do óleo de cróton no desafio de 6 horas, foram realizadas as análises histológicas de parâmetros morfológicos da inflamação. As lâminas histológicas foram coradas com hematoxilina-eosina para avaliação geral da área edematosa, bem como da presença da vasodilatação e de infiltração leucocitária. Além disso, foi realizado a medida da espessura das orelhas por microscópio de três regiões distintas do corte, base, centro e ponta, no aumento de 10x com escala de 100 μ m.

O processo inflamatório no grupo veículo (CN) (Figura 31 (A)) foi consideravelmente mais acentuado, com intenso edema em relação as outras amostras, sendo que β CD (Figura 31 (B)) apresentou um comportamento equivalente. A aplicação do óleo de cróton produziu um aumento acentuado da espessura da orelha, visivelmente no fragmento do CN (Figura 31 (A)), acompanhado pela ruptura do tecido conjuntivo, com desorganização das fibras da matriz extracelular, sendo também relatado por Pinto et al. (2012) e Lanna et al. (2016).

Figura 31 - Fotomicrografia de seções transversais de tecido da orelha de camundongos submetidos à aplicação de óleo de cróton e tratamento tópico por 6 horas com EEF, EEF/ β CD, EER, EER/ β CD, β CD e dexametasona





Legenda: Cortes histológicos de orelhas de camundongos corados com hematoxilina-eosina (aumento de 10x, escala de 100 μm) região central. (A) Controle veículo (acetona); (B) β -ciclodextrina; (C) Dexametasona 5,0 mg/mL; (D1) EEF/ β CD 6,25 mg/mL; (D2) EEF/ β CD 12,5 mg/mL; (D3) EEF/ β CD 25,0 mg/mL; (E1) EER/ β CD 6,25 mg/mL; (E2) EER/ β CD 12,5 mg/mL; (E3) EER/ β CD 25,0 mg/mL; (F1) EEF 6,25 mg/mL; (F2) EEF 12,5 mg/mL; (F3) EEF 25,0 mg/mL; (G1) EER 6,25 mg/mL; (G2) EER 12,5 mg/mL; (G3) EER 25,0 mg/mL.

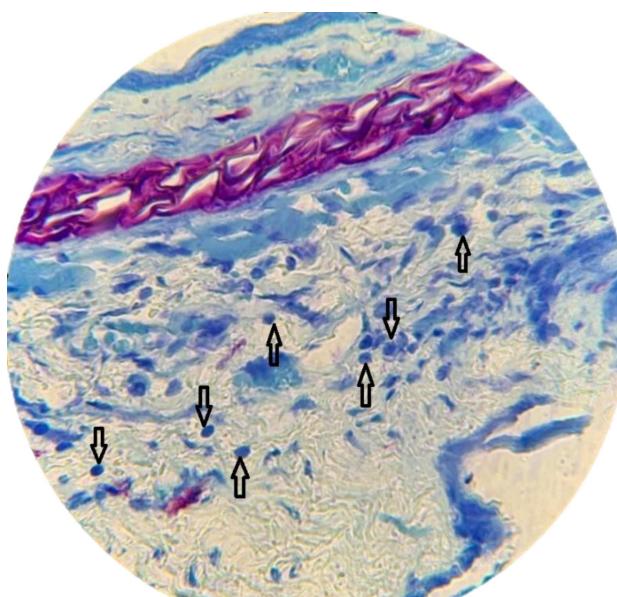
Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Analisando ainda a intensidade do edema, bem como a integridade das orelhas nas imagens acima, observa-se que no tratamento tópico com a maior concentração

(25,0 mg/mL), tanto para os extratos livres quanto para os extratos encapsulados, os fragmentos estão mais íntegros e com menor espessura em comparação à menor concentração de cada amostra, embora apenas EEF e EEF/ β CD apresentaram maior inibição nesta concentração, conforme tabela 7.

Ao comparar a espessura do edema em cada região do fragmento das orelhas (base, centro e ponta) é possível perceber que o edema é mais intenso na região central e menos na base e ponta. Isso se deve a maior vascularização da região e, portanto, maior extravasamento de líquido e infiltração leucocitária (Figura 32). Além disso, provavelmente, foi a região que teve maior exposição ao agente flogístico, uma vez que a aplicação é feita no meio da orelha do animal, e por se tratar de uma solução líquida, espalha-se ao redor da área aplicada.

Figura 32 - Região central do corte histológico de orelha de camundongo corados com azul de toluidina, aumento de 100x, com evidência de infiltração leucocitária

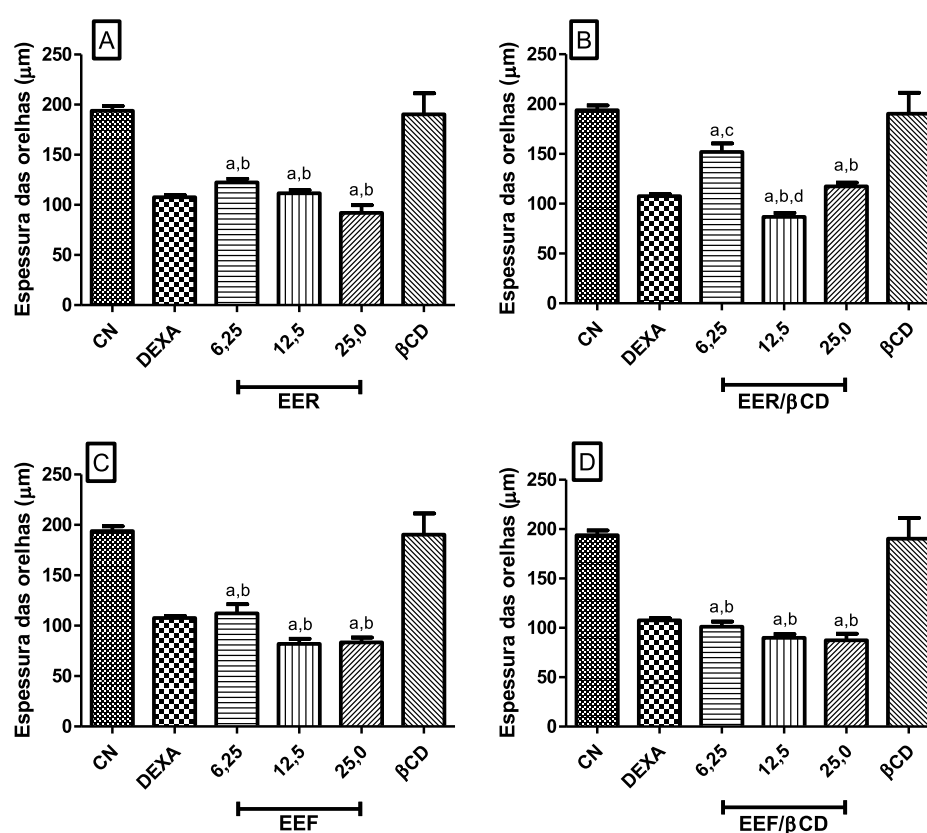


Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Em relação à aplicação das amostras no tratamento de 6 horas, podemos notar que os extratos e fitocomplexos, em todas as concentrações, mostraram diferença significativa em relação ao CN e β CD ($p < 0,05$) em todas regiões, exceto na concentração de 6,25 mg/mL para EER/ β CD na região da base (Figura 33). Além disso, na região da base nota-se que as concentrações de 12,5 e 25,0 mg/mL para EEF e EEF/ β CD tiveram semelhança entre si nas medidas das espessuras das orelhas e foram visivelmente menores em relação à concentração de 6,25 mg/mL,

exibindo correlação com os resultados encontrados na diferença de massa entre as orelhas (Figura 29). No entanto, a concentração de 12,5 mg/mL para EER/ β CD mostrou menor espessura em relação às concentrações de 6,25 mg/mL ($p < 0,05$) e 25,0 mg/mL, enquanto que para EER não houve diferença significativa entre as concentrações.

Figura 33 - Espessura da região da base das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)



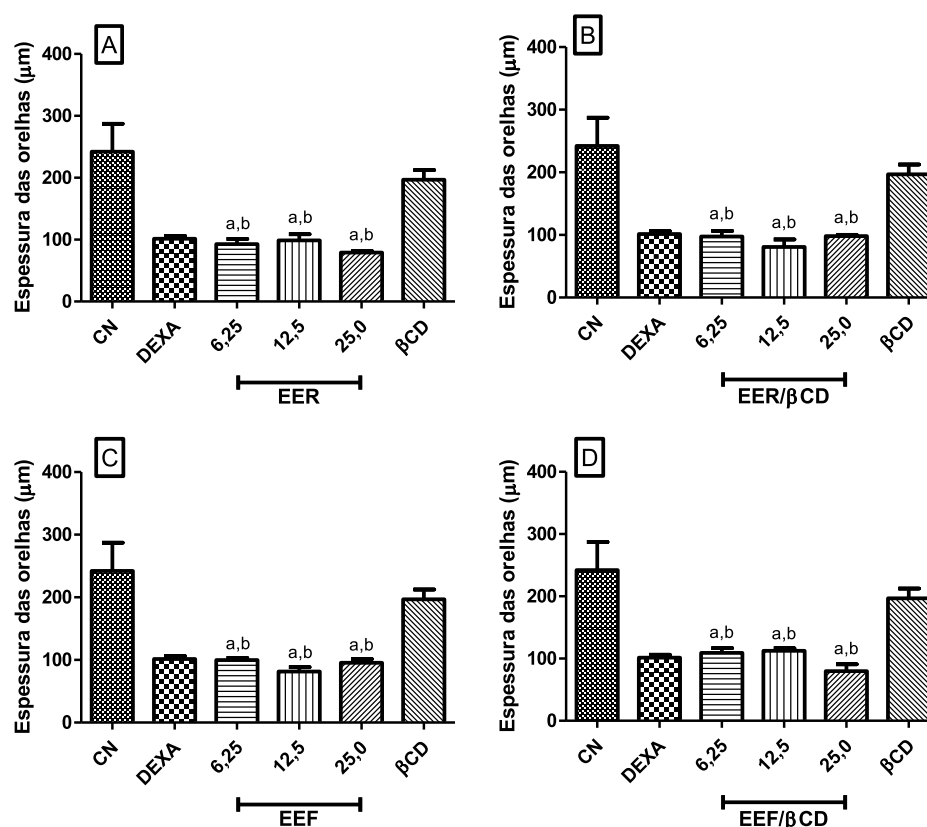
Legenda: EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. CN - orelha tratada somente com veículo (acetona). DEXA - dexametasona. a - Diferença estatística em relação ao CN ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação à β CD ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação à dexametasona ($p < 0,05$). d - Diferença estatística em relação à EER/ β CD 6,25 mg/mL ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na região central do corte histológico (Figura 34), também observa-se que todas as concentrações dos extratos e fitocomplexos apresentaram diferença estatística em

relação ao CN e β CD ($p < 0,05$). A espessura do edema para o grupo do CN foi maior nesta região e, portanto, a inibição do edema pelas amostras testadas foi mais evidente, mostrando que todas as concentrações foram eficazes e equivalentes à dexametasona ($p < 0,05$). Além disso, os extratos e fitocomplexos não diferenciaram significativamente entre si, quando comparados nas mesmas concentrações nominal de extrato, sendo que até a menor concentração foi efetiva.

Figura 34 - Espessura da região central das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)

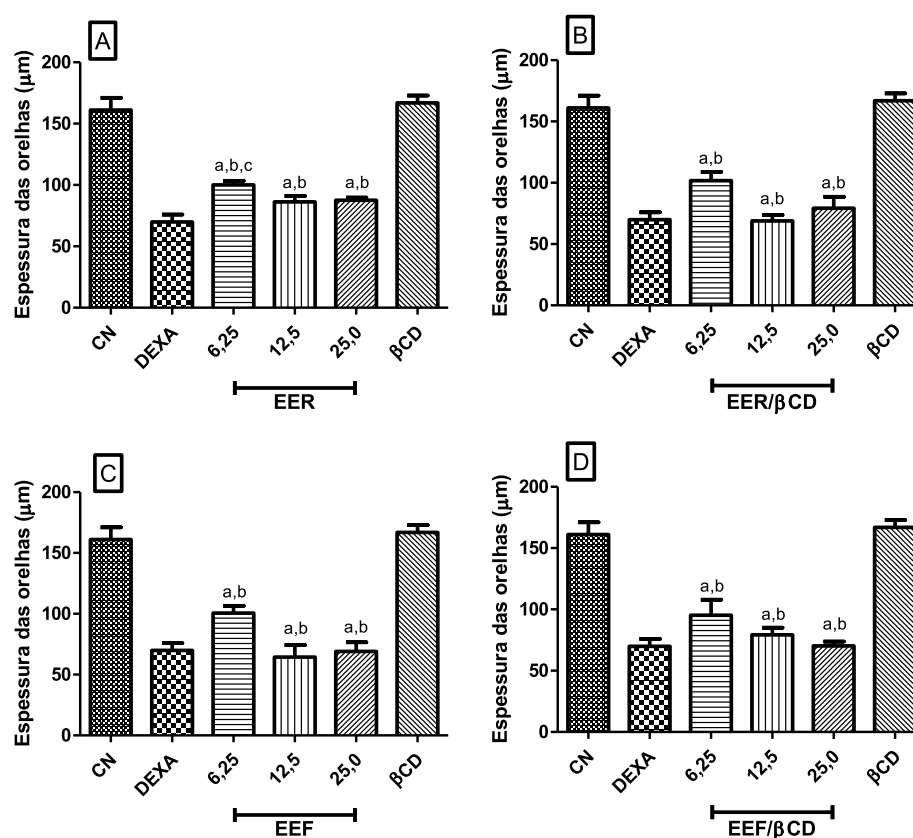


Legenda: EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. CN - orelha tratada somente com veículo (acetona). DEXA - dexametasona. a - Diferença estatística em relação ao CN ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação à β CD ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação à dexametasona ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Na região da ponta (Figura 35) também nota-se a intensidade do edema através da espessura da orelha com aplicação do agente flogístico e da β CD pura. Além disso, percebe-se a atividade anti-edematogênica produzida pelos extratos e fitocomplexos em todas as concentrações. Embora não seja evidente a diferença de espessura entre as concentrações correspondentes das amostras, EER 6,25 mg/mL foi diferente estatisticamente de dexametasona, enquanto que EER/ β CD 6,25 mg/mL não mostrou diferença, ressaltando mais uma vez que o encapsulamento foi favorável.

Figura 35 - Espessura da região da ponta das orelhas submetidas à aplicação de óleo de cróton e tratadas com as amostras (A) EER, (B) EER/ β CD, (C) EEF, (D) EEF/ β CD, β CD, dexametasona e veículo (CN)



Legenda: EER - extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora*. EER/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico dos ramos de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. EEF - extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora*. EEF/ β CD - fitocomplexo supramolecular do extrato etanólico das folhas de *Plinia cauliflora* com β -ciclodextrina. β CD - β -ciclodextrina. CN - orelha tratada somente com veículo (acetona). DEXA - dexametasona. a - Diferença estatística em relação ao CN ($p < 0,05$). b - Diferença estatística em relação à β CD ($p < 0,05$). c - Diferença estatística em relação à dexametasona ($p < 0,05$). ANOVA seguido de teste de Bonferroni.

Fonte: Elaborado pelo autor (2020).

Em uma análise geral, os resultados da atividade anti-inflamatória a partir do modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton mostraram que, na resposta inflamatória aguda, ambos extratos e fitocomplexos supramoleculares foram capazes de inibir o edema, no entanto, ainda não é possível sugerir um mecanismo de ação para tal inibição. Logo, trabalhos futuros visam dar continuidade a este estudo.

Uma vez que a aplicação tópica do óleo de cróton, que possui em sua composição o TPA, em camundongos induz um estresse oxidativo e/ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e, posteriormente, é observado a hiperplasia epidermal (RAHMAN et al., 2008), não foi possível verificar todos os parâmetros morfológicos que evidenciam a presença de um processo inflamatório agudo, como a vasodilatação, aumento da espessura da derme, desorganização das fibras da matriz extracelular e infiltração leucocitária. Para isso, seria necessário coletar fotomicrografia dos cortes de todas as amostras em maior aumento (40; 100 e 200 x), verificar o diâmetro dos vasos, medir o aumento da espessura da derme e fazer a contagem de leucócitos polimorfonucleares. Logo, maiores conclusões serão feitas em trabalhos posteriormente.

Apesar da eficácia dos glicocorticoides na terapia da inflamação, como a própria dexametasona, uma série de efeitos adversos associados à esses fármacos são muito comuns e bem documentados, sobretudo no uso prolongado. Alternativas para contornar tais efeitos estão sendo intensivamente pesquisados pelos cientistas, dentre eles o uso de produtos naturais bioativos tem ganhado importância, devido à grande diversidade estrutural e alta eficácia terapêutica (CUENDET & PEZZUTO, 2008). Além disso, o encapsulamento molecular tem sido vantajoso em formulações atuais com intuito de melhorar da farmacocinética, proporcionar a vetorização das moléculas nos tecidos específicos e diminuir os efeitos adversos (KREUTER, 1994; MOYA-ORTEGA et al., 2012).

Considerando que o extrato, na sua grande maioria, possui um valor comercial bem inferior ao de um medicamento alopático (SANTOS et al., 2011; SHARMA et al., 2018), uma redução do edema acima de 80 %, com significância estatística, representa uma grande vantagem diante dos anti-inflamatórios convencionais disponíveis. Além disso, trata-se de uma pré-formulação de extratos vegetais incorporados em ciclodextrina que melhora a biodisponibilidade das substâncias na pele e, portanto, possui alto potencial terapêutico no tratamento da inflamação de pele.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho nos conduziu as seguintes conclusões:

- ✓ Através do doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos, foi possível verificar que o EEF apresentou maior teor de flavonoides, enquanto que o EER mostrou maior teor de taninos. Tal achado foi confirmado pela identificação dessas substâncias por meio da técnica de HPLC-MS-Q-TOF, sendo a telimagrandina I, castalagina e dilactona do ácido valoneico relatadas pela primeira vez nas folhas e ramos de *P. cauliflora* por nosso grupo de pesquisa.
- ✓ Por meio das alterações nos espectros de IV, foi possível detectar a formação de complexos supramoleculares entre os componentes dos extratos e a β CD, em destaque aos compostos fenólicos.
- ✓ A estabilidade térmica dos fitocomplexos aumentou em comparação aos extratos puros, indicando que a formação do complexo supramolecular é satisfatória, mostrando mais uma vez a existência de interações intermoleculares.
- ✓ A presença de β CD reduziu os valores de condutividade para os fitocomplexos em relação aos respectivos extratos puros, e por isso apresentaram-se na faixa de instabilidade do PZ, com ligeira tendência de agregação.
- ✓ Ambos extratos e fitocomplexos apresentaram atividade antioxidante promissora, destacando o EEF/ β CD que mostrou melhora significativa ($p < 0,05$) na inibição do MDA diante do extrato puro.
- ✓ Todas as amostras, exceto β CD, foram capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a concentração de NO, no ensaio da atividade anti-inflamatória *in vitro*.
- ✓ Os fitocomplexos produziram uma resposta mais rápida que os extratos puros, inibindo mais de 90 % o edema de orelha, induzido por óleo de cróton, em apenas 4 horas de tratamento, comprovando que o encapsulamento molecular é uma importante estratégia a ser considerada para o desenvolvimento de formulações para uso tópico.

Os resultados apresentados neste estudo geraram um depósito de patente intitulado: Processo de obtenção de formulações fitoterápicas nanoestruturadas à base de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (jabuticaba) com ciclodextrinas, composições e usos (ANEXO 3). Com isso, nosso grupo de pesquisa visa dar continuidade nos estudos e aprimorar a tecnologia já depositada através da melhoria da formulação.

REFERÊNCIAS

- AALTONEN, J.; GORDON, K.C.; STRACHAN, C.J.; RADES, T. Perspectives in the use of spectroscopy to characterise pharmaceutical solids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 159-169, 2008.
- ABBAS, S.; KARANGWA, E.; BASHARI, M.; HAYAT, K.; HONG, X.; SHARIF, H. R.; ZHANG, X. Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 23, p. 81 – 92, 2015.
- ABE, L.T.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal Science Food Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679-1687, 2012.
- AGRA, M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 472-508, 2008.
- AKTER, M.S; OH, S.; EUN, J.B.; AHMED, M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1728-1732, 2011.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, C.T.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARROS, L.; SILVA, S.; AZEREDO, J.; HENRIQUES, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 139–146, 2014.
- AMBRIZ-PÉREZ, D.L.; LEYVA-LÓPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E.P.; HEREDIA, J.B. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, p. 1-14, 2016.

ANON, CAVAMAX. Cyclodextrins: Forming and Analysing Drug Inclusion Complexes. **ISP Pharmaceuticals**, 2006.

ANVISA, AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira** – Monografias Plantas Mediciniais. 6ª Ed. Brasília, v. 2, PM017-00, 2019.

APEL, M.A.; SOBRAL, M.; ZUANAZZI, J.A.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, p. 565-567, 2006.

ARAÚJO, C.R.; ESTEVES, E.A.; DESSIMONI-PINTO, N.A.; BATISTA, A.G. *Myrciaria cauliflora* peel flour had a hypolipidemic effect in rats fed a moderately high-fat diet. **Journal Medicine Food**, v. 17, n. 2, p. 262-267, 2014.

ARRAIS, M.A.S. **Obtenção e caracterização físico-química do complexo de inclusão dapsona: β CD e dapsona: sbe β CD para incremento de solubilidade em forma farmacêutica**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Piauí, Teresina – PI, 2012.

AYALA, A.; MUÑOZ, M.F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-31, 2014.

BAILÃO, E.; DEVILLA, I.; DA CONCEIÇÃO, E.; BORGES, L. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 23760-23783, 2015.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL' STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230-235, 2008.

BARBOSA, L.C.A. **Espectroscopia no Infravermelho na Caracterização de Compostos Orgânicos**. 1. ed. Viçosa: Editora UFV, 2011.

BAYKAL, A.; BOZKURT, A.; JEREMY, R.; ASIRI, S.M.M.; LIMA-TENÓRIO, M.K.; KAEWSANEHA, C.; ELAISSARI, A. Multistimuli-responsive magnetic assemblies. **Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers For Drug Delivery Applications**, p. 155-193, 2019.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

BITTENCOURT, V.C.E. **Complexos de inclusão de inseticidas em ciclodextrinas: obtenção, caracterização físico-química, atividade inseticida frente a larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e avaliação toxicológica**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Governador Valadares - MG, 2016.

BLOKZIJL, W.; ENGBERTS, J.B.F.N. Hydrophobic Effects - Opinions and Facts. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 32, n. 11, p. 1545-1579, 1993.

BORGES, L.L.; CONCEIÇÃO, C.E.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BREWSTER, M.E.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. **Advanced drug delivery reviews**, v. 59, p. 645–666, 2007.

CAL, K.; CENTKOWSKA, K. Use of cyclodextrins in topical formulations: Practical aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, p. 467–478, 2008.

CANNAVÀ, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -

cyclodextrins inclusion complexes by UV–vis and IR-ATR spectroscopies. **Vibrational Spectroscopy**, v. 48, p. 172-178, 2008.

CARLOTTI, M.E.; SAPINO, S.; UGAZIO, E.; CARON, G. On the complexation of quercetin with methyl- β -cyclodextrin: Photostability and antioxidant studies. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 70, p. 81–90, 2010.

CHALLA, R; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. **AAPS PharmSciTech**, v. 6, n. 2, p. E329–E357, 2005.

CHAVASCO, J.M.; PRADO E FELIPHE, B.H.M.; CERDEIRA, C.D.; LEANDRO, F.D.; COELHO, L.F.L.; SILVA, J.J.; CHAVASCO, J.K.; DIAS, A.L.T. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern minas gerais cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 13-20, 2014.

CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **LWT - Food Science and Technology**, vol. 39, p. 756- 761, 2006.

CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, Free Radicals, and Antioxidants. **Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 274-277, 1996.

CORTI, G.; CAPASSO, G.; MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; MURA, P. Physical-chemical characterization of binary systems of metformin hydrochloride with triacetyl- β -cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, n. 3, p. 480-486, 2007.

CRINI, G. Review: A History of Cyclodextrins. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 10940–10975, 2014.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. **Columbia University Press**, p. 248-250, 1981.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORD, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009.

CUENDET, M.; PEZZUTO, J.M. Antitumor alkaloids in clinical use or in clinical trials. In: FATTORUSSO, E.; TAGLIATELLA-SCAFATI, O. **Modern alkaloids: structure, isolation, synthesis and biology**. Weinheim: Wiley-VHC Verlag GmbH & Co., 2008.

CUNHA-FILHO, M.S.S.; MARINHO, B.D.; LABANDEIRA, J.J.T.; PACHECO, R.M.; LANDÍN, M. Characterization of β -Lapachone and Methylated β -Cyclodextrin Solid-state Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 3, p. E1-E10, 2007.

DAI, J.; MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313–7352, 2010.

DASTMALCHI, K.; FLORES, G.; WU, S. B.; MA, C.; DABO, A. J.; WHALEN, K.; REYNERTSON, K. A.; FORONJY, R. F.; D'ARMIENTO, J. M.; KENNELLY, E.J.E. *Myrciaria vexator* fruits: Bioactive phenolics for potential COPD therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4549–4555, 2012.

DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 921-929, 2003.

DENADAI, Â.M.L. **Caracterização estrutural e termodinâmica de complexos supramoleculares formados por β -ciclodextrina e fármacos**. Tese (Doutorado em química). Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

DENADAI, A.M.L.; SANTORO, M.M.; SILVA, L.H. da; VIANA, A.T.; SANTOS, R.A.s.; SINISTERRA, R.D. Self-assembly Characterization of the β -Cyclodextrin and Hydrochlorothiazide System: nmr, phase solubility, itc and qels. **Journal Of Inclusion Phenomena And Macrocyclic Chemistry**, v. 55, n. 1-2, p. 41-49, 2006a.

DENADAI, Â.M.L., SANTORO, M.M.; LOPES, M.M; LOPES, T.P; CHENNA, A.; DE SOUSA, F.B.; GOMES, M.T.R.; GUZMÁN, F.P. A Supramolecular Complex between

Proteinases and β -Cyclodextrin that Preserves Enzymatic Activity. **BioDrugs**, v. 20, n. 5, p. 283-291, 2006b.

DENADAI, A.M.L.; TEIXEIRA, K.I.; SANTORO, M.M.; PIMENTA, A.M.C.; CORTÉS, M.E.; SINESTERRA, R.D. Supramolecular self-assembly of β -cyclodextrin: an effective carrier of the antimicrobial agent chlorhexidine. **Carbohydrate Research**, v. 342, p. 2286-2296, 2007.

DE PAULA, W.X.; DENADAI, A.M.L.; SANTORO, M.M.; BRAGA, A.N.G.; SANTOS, R.A.S.; SINISTERRA, R.D. Supramolecular interactions between losartan and hydroxypropyl- β -CD:ESI mass-spectrometry, NMR techniques, phase solubility, isothermal titrationcalorimetry and anti-hypertensive studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, p. 116–123, 2011.

DE SOUZA, C.G.; DE ANDRADE, D.; JORDÃO, J.; DE ÁVILA, R.I.; BORGES, L.L.; VAZ, B.G.; ROCHA, M.L. Radical Scavenger Capacity of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) and Its Biological Effects in Hypertensive Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

DOWD, L.E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184-1187, 1959.

DRAGANO, N.R.; MARQUES, A.Y.; CINTRA, D.E.; SOLON, C.; MORARI, J.; LEITE-LEGATTI, A.V.; VELLOSO, L.A.; MARÓSTICA-JÚNIOR, M.R. Freeze-dried jaboticaba peel powder improves insulin sensitivity in high-fat-fed mice. **British Journal of Nutrition**, v. 110, n. 3, p. 447-55, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EGYED, O. Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vibrational Spectroscopy**, v. 1, n. 2, p. 225–227, 1990.

EINBOND, L.S; REYNERTSON, K.A; LUO, X.; BASILE, M.J; KENNELLY, E.J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. **Food Chemistry**, v. 84, p. 23-28, 2004.

FANG, L.; CHANG, H.M.; CHENG, J.C.; LEUNG, P.C.K.; SUN, Y.P. Nitric Oxide and cGMP Induce COX-2 Expression and PGE2 Production in Human Granulosa Cells Through CREB Signaling Pathway. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 2, p. 262-269, 2015.

FERNÁNDEZ, M.A.; DE ROSSI, R.H. Changing Mechanisms in the β -Cyclodextrin-Mediated Hydrolysis of Phenyl Esters of Perfluoroalkanoic Acids. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 6887-6893, 2003.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J.P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FIDELISA, M.; SANTOSA, J.S.; ESCHERA, G.B.; ROCHAB, R.S.; CRUZB, A.G.; CRUZC, T.M.; et al. Polyphenols of jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O.Berg] seeds incorporated in a yogurt model exert antioxidant activity and modulate gut microbiota of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. **Food Chemistry**, v. 334, n. 127565, p. 1-7, 2020.

FOLCH-CANO, C.; GUERRERO, J.; SPEISKY, H.; JULLIAN, C.; OLEA-AZAR, C. NMR and molecular fluorescence spectroscopic study of the structure and thermodynamic parameters of EGCG/ β -cyclodextrin inclusion complexes with potential antioxidant activity. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 78, p. 287-298, 2013.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627, 1927.

FORTES, G.A.; NAVES, S.S.; GODOI, F.F.; DUARTE, A.R.; FERRI, P.H.; SANTOS, S.C. Assessment of a maturity index in jaboticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. **American Journal of Food Technology**, v. 6, n. 11, p. 974-984, 2011.

FRACASSETTI, D.; COSTA, C.; MOULAY, L.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Ellagic acid derivatives, ellagitannins, proanthocyanidins and other phenolics, vitamin c and antioxidant capacity of two powder products from camu-camu fruit (*Myrciaria dubia*). **Food Chemistry**, v. 139, p. 578– 588, 2013.

FRANCO, C.; SCHWINGEL, L.; LULA, I.; SINISTERRA R.D.; KOESTER, L.S.; BASSANI, V.L. Studies on coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex Characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 5-11, 2009.

GÁBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYAR, P.G.; WILLOUGH, D.A **Inflammation protocols**, New Jersey: Human Press, p. 129-131, 2003.

GARCIA, N.O.S.; FERNANDES, C.P.; CONCEIÇÃO, E.C. Is it possible to obtain nanodispersions with jaboricaba peels extract using low energy methods and absence of any high cost equipment? **Food Chemistry**, v. 276, p. 475–484, 2019.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GU, M.; DHANALAKSHMI, S.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Dietary feeding of silibinin prevents early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 14, p. 1344 – 1349, 2005.

GU, M.; DHANALAKSHMI, S.; SINGH, R.P.; AGARWAL, C.; AGARWAL, R. Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. **Cancer Research**, v. 64, p. 6349–6356, 2004.

GUEVARA, I.; IWANEJKO, J.; DEMBINSKA-KIEC, A.; PANKIEWICZ, J.; WANAT, A.; ANNA, P.; GOL-BEK, I.; BARTU, S.; MALCZEWSKA-MALEC, M.; SZCZUDLIK, A. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. **Clinica Chimica Acta**, v. 274, n. 2, p. 177-188, 1998.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C.R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559-2569, 2017.

HĂDĂRUGĂ, N.G.; BANDUR, G.N.; DAVID, I., HĂDĂRUGĂ, D.I. A review on thermal analyses of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. **Environmental Chemistry Letters**, 2019.

HASLAM, E. Vegetable tannins – Lessons of a phytochemical lifetime. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2713-2721, 2007.

HE, Z.; CHEN, X.; ZHONG, D.; ZHAO, C.; LIU, X.; ZHANG, R. Study on the bioavailability of nateglinide-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin complex capsule in rabbits by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography Bmc**, n. 18, p. 532-537, 2004.

HEDGES, A.R.; SHIEH, W.J.; SIKORSKI, C.T. Use of cyclodextrins for encapsulation in the use and treatment of food products. In: Risch SJ, Reineccius GA, editors. Encapsulation and controlled release of food ingredients. **American Chemical Society**, p. 60–71, 1995.

HENECZKOWSKI, M.; KOPACZ, M.; NOWAK, D.; KUŹNIAR, A. Infrared spectrum analysis of some flavonoids. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 58, n. 6, p. 415-20, 2001.

HOLST, B.; WILLIAMSON, G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 73-82, 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

IDEMIR, C.; MOESES, A.D.; SIMONE, A.Z.S. Jabuticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2 p. 343-656, 2010.

INADA, K.O.P.; NUNES, S.; MARTÍNEZ-BLÁZQUEZ, J.A.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; PERRONE, D.; MONTEIRO, M. Effect of high hydrostatic pressure and drying

methods on phenolic compounds profile of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel and seed. **Food Chemistry**, 2019.

INSTRUTECNICA (2011). **Potencial Zeta e estabilidade coloidal**. Disponível em: <<http://www.instrutecnica.com/represen/bic/teoriazeta.html>> Acesso: 26 SET 2018.

IRIE, T.; UEKAMA K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, n. 2, 1997.

ISHIHARA, M.; SAKAGAMI, H. Application of semiempirical method to estimate the cytotoxic activity of gallic acid and its related compounds. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2549–2552, 2003.

ISO, E.N. 10993-5. **Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for *In Vitro* Cytotoxicity**. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, 2009.

ISRAELACHVILI, J. **Intermolecular & Surface Forces**. 2nd ed.; Academic Press: London, 1991.

JAMBHEKAR, S.S; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 356-362, 2016.

JOLY A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. Companhia Editora Nacional, 1966.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. & DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: um enfoque filogenético**. 3^a ed. Artmed, p. 632, 2009.

KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S.; MOURTZINOS, I.; TROULLIDOU, E.; CHIOU, A.; KARATHANOS, V.T. Encapsulation of complex extracts in β -cyclodextrin: an application to propolis ethanolic extract. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, p. 603–613, 2009.

KANTER, M.; MEYER-KIRSCHNER, J.; VIELL, J.; MITSOS, M.; KATHER, M.; PICH, A.; JANZEND, C. Enabling the measurement of particle sizes in stirred colloidal

suspensions by embedding dynamic light scattering into an automated probe head. **Measurement**, v. 80, p. 92-98, 2016.

KATIYAR, S.K.; KORMAN, N.J.; MUKHTAR, H.; AGARWAL, R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, p. 556–566, 1997.

KEDARE, S.B.; SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KFOURY, M.; AUEZOVA, L.; GREIGE-GERGES, H. FOURMENTIN, S. Cyclodextrins for Essential Oils Applications. In: Fourmentin S., Crini G., Lichtfouse E. (eds) Cyclodextrin Applications in Medicine, Food, Environment and Liquid Crystals. **Environmental Chemistry for a Sustainable World**, v. 17, 2018. Springer, Cham.

KOHATA, S.; KOUKI, J.; AKIRSA, O. Thermal decomposition of cyclodextrins (α -, β -, γ - and modified β -CyD) and of metal-(β -CyD) complexes in the solid phase. **Termochimica Acta**, v. 217, p. 187-198, 1993.

KORA, A.J.; SASHIDHAR, R.B.; ARUNACHALAM, J. Aqueous extract of gum olibanum (*Boswellia serrata*): A reductant and stabilizer for the biosynthesis of antibacterial silver nanoparticles. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1516-1520, 2012.

KREUTER, J. Colloidal drug delivery systems. Ed. Marcel Dekker, New York, 1994.

KURKOV, S.V.; LOFTSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics**, 2012.

LANNA, E.G.; BITTENCOURT, V.C.E.; MOREIRA, A.S.; DA SILVA, J.G.; SOUSA, O.V.; DENADAI, A.M.L. Physicochemical characterization and biological activities of the ethanol extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken incorporated in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 85, n. 247, 2016.

LARROSA, G-C.; ESPÍN, T-B. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, p. 513-539, 2010.

LEHN, J.M. **Supramolecular Chemistry, Scope and Perspectives**; Ed. VCH, Weinheim, 1995.

LEHN, J.M. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 27, p. 89-112, 1988.

LEITE-LEGATTI, A.V; BATISTA, A.G; DRAGANO, N.R.V; MARQUES, A.C; MALTA, L.G. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LENQUISTE, S.A.; MARINELI, R.D.S.; MORAES, É.A.; DIONÍSIO, A.P.; BRITO, E.S.D.; MAROSTICA, M.R. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, p. 162–170, 2015.

LIMA, A.J.B. **Caracterização e Atividade Antioxidante da Jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]**, Lavras-MG 2009, Originalmente apresentada como Tese, Universidade Federal de Lavras, 2009.

LIMA, A.D.J.B.; CORRÊA, A.D.; SACZK, A.A.; MARTINS, M.P.; CASTILHO, R.O. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jaboticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877-887, 2011.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e radicais livres. **Ciências Naturais e Tecnológicas, Santa Maria**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.

LINK, A.; BALAGUER, F.; GOEL, A. Cancer chemoprevention by dietary polyphenols: Promising role for epigenetics. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1771–1792, 2010.

LIU, L.; GUO, Q.X. The driving forces in the inclusion complexation of cyclodextrins. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 42, p. 1–14, 2002.

LI, X.; LI, H.; LIU, M.; LI, G.; LI, L.; SUN, D. From guest to ligand – A study on the competing interactions of antitumor drug resveratrol with β -cyclodextrin and bovine serum albumin. **Thermochimica Acta**, v. 521, p. 74–79, 2011.

LOBO DE ANDRADE, D.M.; REIS, C.F.; CASTRO, P.F.; BORGES, L.L.; AMARAL, N.O.; TORRES, I.M.; REZENDE, S.G.; GIL, E.S.; CONCEIÇÃO, E.C.; PEDRINO, G.R.; ROCHA, M.L. Vasorelaxant and Hypotensive Effects of Jaboticaba Fruit (*Myrciaria cauliflora*) Extract in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 329, p. 1–11, 2007.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURDSSON, H.H.; MAGNÚSSON, P.; GOFFIC, F. Cyclodextrins as coenhancers in dermal and transdermal drug delivery. **Pharmazie, Berlin**, v. 53, p. 137-139, 1998.

LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MASSON, M.; JAERVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 2, n. 2, p. 335-351, 2005.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins I: drug solubilization and stabilization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 1017-1025, 1996.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Brazilian fruits & cultivated exotics (for consumption in natura). **Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda.**, São Paulo, 2006.

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. The systematic identification of flavonoids. **Springer-Verlag**, v. 354, p. 51-52, 1970.

MALAFRONTI, N.; PESCA, M.S.; BISIO, A.; ESCOBAR, L.M.; DE TOMMASI, N. "New flavonoid glycosides from *Vernonia ferruginea*," **Natural Product Communications**, v. 4, n. 12, p. 1639–1642, 2009.

MALVERN INSTRUMENTS (2005). **Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations**. Disponível em: <<http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1234>>.

MARCUM, Z.A.; HANLON, J.T. Recognizing the Risks of Chronic Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in Older Adults. **Ann Longterm Care**, v. 18, n. 9, p. 24–27, 2010.

MAROON, J.C.; BOST, J.W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surgical Neurology International**, v. 1, n. 80, 2010.

MARTINS, M.R.F.M; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 1, 2002.

MATHEW, A.G.; PARPIA, H.A.B. Food browning as a polyphenol reaction. **Advances in Food Research**, v. 19, n. 1, p. 75–145, 1971.

MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, n. 1, p. 81-99, 1999.

MEISEL, T. In what extension thermal analysis is an analytical method. **Journal Thermal Analysis**, v. 29, p. 1379-1392, 1984.

MEJIA-ARIZA, R.; GRAÑA-SUÁREZ, L; VERBOOM, W.; HUSKENS, J. Cyclodextrin-based supramolecular nanoparticles for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 36-52, 2017.

MELO, M.S.O.M.; MANCINI FILHO, J. Antioxidantes naturais do fruto do dendazeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 25, n. 2, p.147-157, 1989.

MIGUEL, M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. **A review. Flavour Frag. J.**, v. 25, p. 291–312, 2010.

MILLER, L.A.; CARRIER, R.L.; AHMED, I. Practical Considerations in Development of Solid Dosage Forms that Contain Cyclodextrin. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 96. p. 1691-1707, 2007.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN-BEER, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2014). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>> Acesso em 16/12/2018.

MIRANDA, J.C.; MARTINS, T.E.A.; VEIGA, F.; FERRAZ, H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 4, 2011.

MITTAL, A.; ELMETS, C.A.; KATIYAR, S.K. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: Relationship to decreased fat and lipid peroxidation. **Carcinogenesis**, v. 24, p. 1379–1388, 2003.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 1655-1666, 2009.

MORALES, P.; BARROS, L.; DIAS, M. I.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R.; RAMIREZ ASQUIERI, E.; BERRIOS, J.D.J. Non-fermented and fermented jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* mart) pomaces as valuable sources of functional ingredients. **Food Chemistry**, v. 208, p. 220–227, 2016.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOYA-ORTEGA, M.D.; ALVAREZ-LORENZO, C.; CONCHEIRO, A.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin-based nanogels for pharmaceutical and biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 428, p. 152-163, 2012.

MURDOCK, R.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A.M.; SCHLAGER, J.J.; HUSSAIN, S.M. Characterization of Nanomaterial Dispersion in Solution Prior to *in vitro* Exposure Using Dynamic Light Scattering Technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.

NASCIMENTO, J.L. **Complexo de inclusão do extrato hexânico de *Platonia insignis* Mart e β -ciclodextrina: caracterização e avaliação das atividades gastroprotetora e antioxidante *in vitro***. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, 2013.

NASCIMENTO, L.O.; GOULART, P.P.; CORREA, J.L.; ABRISHAMKAR, A.; SILVA, J.G.; MANGRICH, A.S.; FRANÇA, A.A.; DENADAI, A.M.L. Molecular and supramolecular characterization of Ni(II)/Losartan Hydrophobic Nanoprecipitate. **Journal of Molecular Structure**, v. 1074, p. 224-230, 2014.

NASCIMENTO, R.J.; ARAÚJO, C.R.; MELO, E.A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 209-16, 2010.

NEGRI, M.L.S.; POSSAMAI, J.C.; NAKASHIMA, T. Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 553-556, 2009.

NETALA, V.R.; BUKKE, S.; DOMDI, L.; SONEYA, S.; G REDDY, S., BETHU, M.S.; KOTAKDI V.S.; SARITHA K.V.; TARTTE, V. Biogenesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Indigofera hirsuta* L. and their potential biomedical applications (3-in-1 system). **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, v. 6, p. 1–11, 2016.

NEVES, M.A.; HASHEMI, J.; PRENTICE, C. Development of novel bioactives delivery systems by micro/nanotechnology. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 7-12, 2015.

NEVES, N.D.A.; STRINGHETA, P.C., GÓMEZ-ALONSO, S., HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Flavonols and ellagic acid derivatives in peels of different species of jaboticaba (*Plinia* spp.) identified by HPLCAD-ESI/MS, **Food Chemistry**, 2018.

NICHOLS, J.A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v. 302, n. 2, p. 71–83, 2009.

OHLWEILER, O.A. **Fundamentos de Análise Instrumental**, 1^a ed., Livros Técnicos e Científicos, 1981.

OLIVEIRA, D.M.; BASTOS, D.H.M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Quím. Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, V.E.; ALMEIDA, E.W.C.; CASTRO, H.V.; EDWARDS, H.G.M.; DOS SANTOS, H.F.L.; DE OLIVEIRA, F.C. Carotenoids and β -Cyclodextrin Inclusion Complexes: Raman Spectroscopy and Theoretical Investigation. **Journal of Physical Chemistry A**, v. 115, p. 8511-8519, 2011.

OSAWA, C.C; FELÍCIO, P.E.; GONÇALVES, L.A.G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655-663, 2005.

PALUDO, M.C.; COLOMBO, R.C.; TEIXEIRA FILHO, J.; HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.; BALLUS, C.A.; GODOY, H.T. Optimizing the Extraction of Anthocyanins from the Skin and Phenolic Compounds from the Seed of Jabuticaba Fruits (*Myrciaria jabuticaba* (Vell.) O. Berg) with Ternary Mixture Experimental Designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 7, p. 1506-1515, 2019.

PANCHE, A.N.; DIWAN, A.D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, p. 1- 5, 2016.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D.B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11–26, 2015.

PINTO, N.C.C. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas das folhas de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae)**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora – MG, 2012.

PLAGEMANN, I.; KRINGS, I.; BERGER, R.G; MARÓSTICA JÚNIOR, M.R. Volatile constituents of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg) fruits. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 1, p. 45-51, 2012.

PLAZA, M.; BATISTA, A.G.; CAZARIN, C.B.B.; SANDAHL, M.; TURNER, C.; ÖSTMAN, E.; JÚNIOR, M.R.M. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185–197, 2016.

PLAZA, R.C.; VICENTE, J.; GÓMEZ-LOPERA, S.; DELGADO, A.V. Stability of dispersions of colloidal nickel ferrite spheres. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 242, p. 306-313, 2001.

PLOCHMANN, K.; KORTE, G.; KOUTSILIERI, E.; RICHLING, E.; RIEDERER, P.; RETHWILM, A.; SCHREIER, P.; SCHELLER, C. Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 460, n. 1, p. 1-9, 2007.

POETKER, D.M.; REH, D.D.A. Comprehensive review of the adverse effects of systemic corticosteroids. **Otolaryngologic Clinics of North America**, v. 43, n. 4, p. 753-768, 2010.

PRALHAD, T.; RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, p. 333-339, 2004.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QUINTANS, J.S.S; MENEZES, P.P.; SANTOS, M.R.V.; BONJARDIM, L.R.; ALMEIDA, J.R.G.S.; GELAIN, D.P.; ARAUJO, A.A.S.; QUINTANS JUNIOR, L.J. Improvement of p-cymene antinociceptive and anti-inflammatory effects by inclusion in β -cyclodextrin. **Phytomedicine**, v. 20, n. 5, p. 436-440, 2013.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A.Q.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevent massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico-biological Interactions**, v. 172, n. 3, p. 195-205, 2008.

RAKMAI, J.; CHEIRSILP, B.; CID, A.; TORRADO-AGRASAR, A.; MEJUTO, J.C.; SIMAL-GANDARA, J. Encapsulation of Essential Oils by Cyclodextrins: Characterization and Evaluation, **Cyclodextrin - A Versatile Ingredient**, 2018. Poonam Arora and Neelima Dhingra, IntechOpen.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. **Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAO, J.P.; GECKELER, K.E. Cyclodextrin Supramacromolecules: Unexpected Formation in Aqueous Phase under Ambient Conditions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 32, n. 5, p. 426-430, 2011.

REYNERTSON, K.A.; YANG, H.; JIANG, B.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. **Food Chemistry**, vol. 109, n. 4, p. 883–890, 2008.

REYNERTSON, K.A.; WALLACE, A.M.; ADACHI, S.; GIL, R.R.; YANG, H.; BASILE, M.J. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1228-1230, 2006.

RISS, T.L.; RICHARD, A.M.; ANDREW, L.N.; SARAH, D.; HÉLÈNE, A.B.; TRACY, J.W.; LISA, M. Cell Viability Assays. **Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences**, 2013.

ROCKS, N., BEKAERT, S., COIA, I., PAULISSEN, G., GUEDERS, M., EVRARD, B. Curcumin-cyclodextrin complexes potentiate gemcitabine effects in an ortho-topic mouse model of lung cancer. **British Journal of Cancer**, v. 107, p. 1083–1092, 2012.

RODINELLI, B.O.; LIMA, E.M. Avaliação do perfil de liberação do enalapril em comprimidos revestidos com HPMC. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 37-40, 2005.

ROUGIER, N.; CRUICKSHANK, D.; VICO, R.V; BOURNE, S.; CAIRA, M.; BUJÁN, E.I.; DE ROSSI, R.H. Effect of cyclodextrins on the reactivity of fenitrothion, **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 322–327, 2011.

RURAL PECUÁRIA (2016). Disponível em: <<http://ruralpecuaria.com.br/tecnologia-e-manejo/fruticultura/respostas-de-especialistas-sobre-o-cultivo-de-jabuticaba.html>> Acessado em 14/11/2018.

SÁ BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S. Ciclodextrina: Importante Excipiente Farmacêutico Funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, p. 629-636, 2008.

SAENGER, W. Cyclodextrin Inclusion-Compounds in Research and Industry. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v. 19, n. 5, p. 344-362, 1980.

SALDANHA, L.L.; VILEGAS, W.; DOKKEDAL, A.L. Characterization of Flavonoids and Phenolic Acids in *Myrcia bella* Cambess. Using FIA-ESI-IT-MS and HPLC-PAD-ESI-IT-MS Combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402-8416, 2013.

SAMPAIO, D.A. **Caracterização anatômica e físicoquímica do tegumento da semente de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze**. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2016.

SANTOS, R.L.; GUIMARAES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.A.; OLIVEIRA, R.C.; MENEZES, K.D.P.; LEITE, G.O.; KERNTOPF, M.R.; COSTA, J.G.M.; ROCHA, J.B.T.; TOMÉ, A.R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R.A. Topical anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum*

Wittm. (Caryocaraceae) fruit fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 504-510, 2011.

SARNES, E.; CROFFORD, L.; WATSON, M.; DENNIS, G.; KAN, H.; BASS D. Incidence and US costs of corticosteroid-associated adverse events: a systematic literature review. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 10, p. 1413-1432, 2011.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed Pharmacotherapy**, v. 56, p. 276–282, 2002.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Anti-inflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxican. **Arzneimittel Forschung/Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

SHARMA, P.; SRIVASTAVA, S.; KUMAR, R.; SINGH, V.B. Phytotherapy: An Alternative Low Cost Therapeutic Management of Endometritis in Dairy Animals: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, p. 4581-4591, 2018.

SILVA, A.T.; MAZINE, F.F. A família Myrtaceae na Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 67, n. 1, p. 203-224, 2016.

SIMÕES, M.O. (ORG). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFSC. Florianópolis, 1999 1TM ed.

SINGH, R.; BHARTI, N.; MADAN, J.; HIREMATH, S. N. Characterization of Cyclodextrin Inclusion Complexes – A Review. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 2, n. 3, p. 171-183, 2010.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; SHARMA, K.R.; KUMAR, B. Profiling of Gallic and Ellagic Acid Derivatives in Different Plant Parts of Terminalia arjuna by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 2, p. 239-244, 2016.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper

gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 121-132, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C. Histochemical, phytochemical and biological screening of *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel, Myrtaceae, leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 48–53, 2010.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SEVERI, J.A.; LEE, K.; PREECHASUTH, K.; SANTOS, E.; GOW, N.A.; MUNRO, C.A.; VILEGAS, W.; PIETRO, R.C.L.R. Anti-*Candida* targets and cytotoxicity of casuarinin isolated from *Plinia cauliflora* leaves in a bioactivity-guided study. **Molecules**, v. 18, n. 7, p. 8095–8108, 2013.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SEVERI, J.A.; RODRIGUES, E.R.; PAULA, M.I.D.; FREITAS, J.A.; VILEGAS, W.; PIETRO, R.C.L.R. Flavonoids from *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Myrtaceae) with antifungal activity. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2018.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SEVERI, J.A.; SANTOS, E.; SILVA, V.Y.A.; VILEGAS, W.; SALGADO, H.R.N. Chemical and antidiarrheal studies of *Plinia cauliflora*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 1590–1596, 2011.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. 2013. **Botânica Sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das Famílias de Fanerógamas Nativas e Exóticas do Brasil**, Baseado em APG III. 3ª ed. Editora Plantarum, Nova Odessa, p. 768, 2013.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, p. 263-269, 2012.

SU, Y.L.; LEUNG, L.K.; HUANG, Y.; CHEN, Z. Stability of tea theaflavins and catechins. **Food Chemistry**, v. 83, p. 189–195, 2003.

SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. **Chemistry Review**, v. 98, p. 1743–1753, 1998.

SZENTE, L.; SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 137–142, 2004.

THAKUR, L.; GHODASRA, U.; PATEL, N.; DABHI, M. Novel approaches for stability improvement in natural medicines. **Pharmacognosy Review**, v. 5, n. 9, p. 48-54, 2011.

THOMPSON, D.O. Cyclodextrins - Enabling excipients: Their present and future use in pharmaceuticals. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 14, n. 1, p. 101-104, 1997.

TOMA, S.H. **Química Supramolecular e Aplicações Nanotecnológicas de Compostos Polipiridínicos de Rutênio**. Tese de doutorado em Química, 2007. Disponível em: <http://pct.capes.gov.br/teses/2007/968792_5.PDF> Acessado em: 06/11/2018.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ANDRÉS-LACUEVA, C. Polyphenols and health: current state and progress. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8773-8775, 2012.

TOMIOTTO-POLLISSIER, F.; MIRANDA-SAPLA, M.M.; MACHADO, L.F.; BORTOLETI, B.T.S.; SAHD, C.S.; CHAGAS, A.F.; ASSOLINI, J.P.; OLIVEIRA, F.J.A.; PAVANELLI, W.R.; CONCHON-COSTA, I.; COSTA, I.N.; MELANDA, F.N. Nanotechnology as a potential therapeutic alternative for schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 174, p. 64-71, 2017.

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**, v. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

UEKAMA, K. Design and Evaluation of Cyclodextrin-Based Drug Formulation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, p. 900-15, 2004.

UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chem. Rev.**, v. 98, n. 5, p. 2045–2076, 1998.

VALLE AL. Current methodologies in assessing the toxicity of natural products. **International Journal Phytocosmetics and Natural Ingredients**, v. 5, n. 3, 2018.

VALLI, M.; RUSSO, H.M.; BOLZANI, V.S. The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, p. 763-778, 2018.

VEGGI, P.C.; SANTOS, D.T.; MEIRELES, A.A. Anthocyanin extraction from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins by different techniques: economic evaluation. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1725-1731, 2011.

VILLIERS, A. Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, v. 112, p. 536–538, 1891.

XU, J.; ZHANG, Y.; LI, X.; ZHENG, Y. Inclusion complex of nateglinide with sulfobutyl ether β -cyclodextrin: Preparation, characterization and water solubility. **Journal of Molecular Structure**, v. 1141, p. 328-34, 2017.

WANG, W.H.; TYAN, Y.C.; CHEN, Z.S.; LIN, C.G.; YANG, M.H.; YUAN, S.S.; TSAI, W.C. Evaluation of the antioxidant activity and antiproliferative effect of the jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) seed extracts in oral carcinoma cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–7, 2014.

WANG, Y.J., ZHANG, S.; DENG, H.; LIN, H.Q. Research progress of methods to improve the stability of procyanidins. **Journal of Guangdong Pharmaceutical University**, v. 30, p. 246-248, 2014.

WU, S.B.; WU, J.; YIN, Z.; ZHANG, J.; LONG, C.; KENNELLY, E.J. Bioactive and marker compounds from two edible dark-colored *Myrciaria* fruits and the synthesis of jaboticabin. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 61, p. 4035–4043, 2013.

WU, S.B.; LONG, C.; KENNELLY, E.J. Phytochemistry and health benefits of jaboticaba, an emerging fruit crop from Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 148–159, 2013.

WU, S.B.; DASTMALCHI, K.; LONG, C.L.; KENNELLY, E.J. Metabolite profiling of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and other dark-colored fruit juices. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 60, p. 7513–7525, 2012.

WUNDERLICH, B. In **Encyclopedia of Materials: Science and Technology**, ed. by BUSCHOW, K.H.J.; R.W. CAHN, M.C. FLEMINGS, B. ILSCHNER, E.J. KRAMER, S. MAHAJAN, P. VEYSSIÈRE (Elsevier, Oxford), p. 9134–9141, 2001.

YADAV, U.C.S.; RAMANA, K.V. Regulation of NF- κ B-Induced Inflammatory Signaling by Lipid Peroxidation-Derived Aldehydes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1-11, 2013.

YANG, J.; GUO, J.; YUAN, J. In vitro antioxidant properties of rutin. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 6, p. 1060-1066, 2008.

ZHAO, D.K.; SHI, Y.N.; PETROVA, V.; YUE, G.G.L.; NEGRIN, A.; WU, S.B.; D'ARMIENTO, J.M.; LAU, C.B.S.; KENNELLY, E.J. Jaboticabin and Related Polyphenols from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) with Anti-inflammatory Activity for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019.

ZHAO, M.; WANG, H.; YANG, B.; TAO, H. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1138–1142, 2010.

ZHOU, Q.; WEI, X.; DOU, W.; CHOU, G.; WANG, Z. Preparation and characterization of inclusion complexes formed between baicalein and cyclodextrins. **Carbohydrate polymers**, v. 95, p. 733–739, 2013.

ZHU, Z.Y.; LUO, Y.; LIU, Y.; WANG, X.T.; LIU, F.; GUO, M.Z.; ZHANG, Y.M. Inclusion of chrysin in β -cyclodextrin and its biological activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 176-186, 2016.

ZOCOLER, A.M.D.; SANCHES, A.C.C.; ALBRECHT, I.; MELLO, J.C.P. Antioxidant capacity of extracts and isolated compounds from *Stryphnodendron obovatum* Benth. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45 n. 3, p. 551-562, 2009.

ANEXO 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/04/2019, analisou o protocolo nº. 006/2019 intitulado “Estudo da atividade anti-inflamatória tópica dos extratos livres X, Y e Z, e nanoencapsulados FX, FY e FZ”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Rodrigo Luiz Fabri, e colaboração de Priscila de Lima Paula, Ari Sérgio de Oliveira Lemos e Lara Melo Campos, a ser realizado no período de 01/08/2019 a 31/07/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 126 camundongos heterogênicos Swiss machos com 30 dias, projeto a ser realizado na sala de experimentação animal do Laboratório do Departamento de Bioquímica no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n. 006/2019 - CEUA about “Estudo da atividade anti-inflamatória tópica dos extratos livres X,Y e Z, e nanoencapsulados FX, FY e FZ”, under responsibility of Rodrigo Luiz Fabri and collaboration of Priscila de Lima Paula, Ari Sérgio de Oliveira Lemos and Lara Melo Campos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/02/2019 . For the development of this research 126 males of Swiss mice with 30 days old, will be delivered as requested in the period of 08/01/2019 to 07/31/2021. The project will be performed at Biochemistry Department located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora 17 de abril de 2019.



 Coordenadora
 CEUA



 Vice-Coordenadora
 CEUA

ANEXO 2



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA**

CERTIFICADO

A COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 02/04/2019, analisou o protocolo nº. 007/2019 intitulado “Estudo da atividade anti-inflamatória dos extratos livres X e Y, e nanoencapsulados com ciclodextrina FX e FY”, projeto de pesquisa sob a responsabilidade de Rodrigo Luiz Fabri, e colaboração de Priscila de Lima Paula, Ari Sérgio de Oliveira Lemos e Lara Melo Campos, a ser realizado no período de 01/08/2019 a 31/07/2021. Por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela CEUA. Serão utilizados 90 camundongos heterogênicos Swiss machos com 30 dias, projeto a ser realizado sala de experimentação animal do Laboratório do Departamento de Bioquímica no Campus da Universidade Federal de Juiz de Fora. O prazo de validade desse certificado é equivalente a vigência do projeto prorrogável por mais um ano, desde que seja enviada justificativa a CEUA durante a vigência do projeto de acordo com orientação técnica do CONCEA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n. 007/2019 - CEUA about “Estudo da atividade anti-inflamatória dos extratos livres X e Y, e nanoencapsulados com ciclodextrina FX e FY”, under responsibility of Rodrigo Luiz Fabri and collaboration of Priscila de Lima Paula, Ari Sérgio de Oliveira Lemos and Lara Melo Campos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (Concea) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 04/02/2019. For the development of this research 90 males of Swiss mice with 30 days old, will be delivered as requested in the period of 08/01/2019 to 07/31/2021. The project will be performed at Biochemistry Department located at Federal University of Juiz de Fora. The term of validity of this certificate might be extended for one more year by means of justification during the period of validity.

Juiz de Fora 17 de abril de 2019.

Coordenadora
CEUA

Vice-Coordenadora
CEUA

ANEXO 3



08/09/2020 870200113928
20:15
29409161918056535

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 018324 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA - UFJF

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 21195755000169

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: José Lourenço Kelmer, s/n, Martelos

Cidade: Juiz de Fora

Estado: MG

CEP: 38038900

País: Brasil

Telefone: (032)21023435

Fax: (032)2102-3435

Email: pc.critt@ufff.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES FITOTERÁPICAS NANOESTRUTURADAS À BASE DE PLINIA CAULIFLORA (DC.) KAUSEL (JABUTICABA) COM CICLODEXTRINAS, COMPOSIÇÕES E USOS

Resumo: Trata-se a presente invenção do processo de obtenção dos fitocomplexos supramoleculares à partir dos extratos etanólico das folhas e ramos de Plinia cauliflora (DC.) Kausel (Jaboticaba) com ciclodextrinas e suas composições e usos. Tanto as soluções dos extratos como suas formulações nanoestruturadas com ciclodextrinas podem ser utilizadas como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. A presença de ciclodextrinas nos fitocomplexos supramoleculares induzem um mecanismo de liberação controlada dos componentes ativos dos extratos de modo a aumentar a solubilidade aquosa, melhorar a biodisponibilidade, aumentar a estabilidade térmica dos componentes, potencializar e vetorizar o efeito antioxidante e anti-inflamatório tóxico.

Figura a publicar: 0

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 08/09/2020 às 20:15, Petição 870200113928