



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

Thayná Gomes Ferreira

**Avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato metanólico
das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* e de seu fitocomplexo
supramolecular com β -ciclodextrina**

Juiz de Fora
2022

Thayná Gomes Ferreira

Avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* e de seu fitocomplexo supramolecular 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 e Sintéticos Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo Marcio Leite Denadai

Co-orientador: Prof. Dr. Rodrigo Luiz Fabri

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Thayná Gomes.

Avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* e de seu fitocomplexo supramolecular com β -ciclodextrina / Thayná Gomes Ferreira. -- 2022.

79 p. : il.

Orientador: Ângelo Marcio de Leite Denadai

Coorientador: Rodrigo Luiz Fabri

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. *Mitracarpus frigidus*. 2. ciclodextrina. 3. atividade antioxidante. 4. atividade anti-inflamatória. I. Denadai, Ângelo Marcio de Leite, orient. II. Fabri, Rodrigo Luiz, coorient. III. Título.

Thayná Gomes Ferreira

Avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus Frigidus* e de seu fitocomplexo supramolecular com β -Ciclodextrina.

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós
Graduação em
Ciências
Farmacêuticas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestra em
Ciências
Farmacêuticas. Área
de concentração:
Produtos Naturais e
Sintéticos Ativos.

Aprovada em 20/01/2022.

BANCA EXAMINADORA

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

Dr. Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo
Universidade Federal de São João Del Rei

Dra. Fernanda Maria Pinto Vilela
Universidade Federal de Juiz de Fora



Documento assinado eletronicamente por **Angelo Marcio Leite Denadai, Diretor (a)**, em 04/02/2022, às 17:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Maria Pinto Vilela, Professor(a)**, em 07/02/2022, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Gonzaga de Freitas Araújo, Usuário Externo**, em 08/02/2022, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0655484** e o código CRC **41BCDE0C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço antes de tudo a Deus, pela oportunidade de aprimorar meus conhecimentos, pela sabedoria e por me fortalecer a cada obstáculo.

A minha família que me deu suporte emocional e comemorou comigo cada conquista.

Ao meu orientador Ângelo Denadai, que deu todo o suporte para a realização deste trabalho, e acreditou em mim, mesmo não tendo a oportunidade de nos conhecer pessoalmente.

Ao meu co-orientador Rodrigo Fabri, que me acolheu e esteve presente me dando todo o apoio necessário, além de incentivar meu crescimento acadêmico, permitiu que essa pequena jornada fosse mais prazerosa, pela ótima convivência que tivemos.

Aos laboratórios parceiros, que foram fundamentais para a execução de um trabalho de qualidade, com a realização de experimentos essenciais.

Aos meus colegas do laboratório de bioensaios, que me apoiaram e foram solícitos e prestativos sempre que eu precisei, além da amizade que me proporcionaram tanto em momentos de descontração quanto em momentos de dificuldades.

Ao meu namorado e a sua família que me incentivaram e torceram por mim, comemorando as minhas conquistas e me dando suporte nas dificuldades.

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

RESUMO

Mitracarpus frigidus é uma espécie vegetal nativa na América do Sul, que tem demonstrado potencial para diversas atividades biológicas, como anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, leishmanicida e antitumoral. Essas atividades têm sido correlacionadas a seus metabólitos secundários, tais como alcalóides, terpenos e compostos fenólicos. No entanto, a instabilidade e baixa solubilidade de compostos naturais reduzem sua biodisponibilidade, interferindo na eficácia da terapia. Com o intuito de melhorar a estabilidade e biodisponibilidade dos componentes ativos do extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* (MFM), foi desenvolvido um fitocomplexo supramolecular com β -ciclodextrina (β CD), pelo método de coprecipitação. Através de docking molecular, foi possível prever uma maior afinidade dos compostos de interesse com a β CD. As caracterizações do extrato e fitocomplexo por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho (IV), espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial zeta (PZ), condutividade e análises térmicas (análise térmica diferencial DTA e análise termogravimétrica TGA), demonstraram a efetividade da complexação e sugeriram maior estabilidade do fitocomplexo em relação ao extrato puro. A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de redução do radical DPPH, inibição do sistema β caroteno/ácido linoleico, e formação de MDA, em que o fitocomplexo apresentou maior potencial antioxidante, comparado ao extrato puro. A atividade anti-inflamatória *In vitro* foi avaliada por meio da redução da produção de óxido nítrico (NO) e por redução de atividade das metaloproteinases MMP2 e MMP9, em linhagem celular J774A.1, neste caso, o fitocomplexo obteve novamente, melhores resultados que o extrato puro, sugerindo potencial emprego para formulações anti-inflamatórias. Ambas as amostras não apresentaram toxicidade para a linhagem celular testada (J774A.1).

Palavras-chave: *Mitracarpus Frigidus*. Atividade antioxidante. Atividade anti-inflamatória. Ciclodextrina.

ABSTRACT

Mitracarpus Frigidus is a plant species native to South America, which has shown potential for several biological activities, such as anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, leishmanicidal and antitumor. These activities have been correlated to its secondary metabolites, such as alkaloids, terpenes, and phenolic compounds. However, the instability and low solubility of natural compounds reduce their bioavailability, interfering with the efficacy of therapy. In order to improve the stability and bioavailability of the active components of the methanolic extract of *Mitracarpus frigidus* (MFM), a supramolecular phytocomplex with β -cyclodextrin (β CD) was developed by the co-precipitation method. Through molecular docking, it was possible to predict a higher affinity of the compounds of interest with β CD. The characterizations of the extract and phytocomplex by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR), dynamic light scattering (DLS), zeta potential (ZP), conductivity and thermal analysis (differential thermal analysis DTA and thermogravimetric analysis TGA), demonstrated the effectiveness of the complexation and suggested greater stability of the phytocomplex compared to the pure extract. The antioxidant activity was evaluated by DPPH radical reduction assays, inhibition of the β -carotene/linoleic acid system, and MDA formation, in which the phytocomplex showed greater antioxidant potential compared to the pure extract. In vitro anti-inflammatory activity was evaluated by reducing nitric oxide (NO) production and by reducing metalloproteinases MMP2 and MMP9 activity, in J774A.1 cell line, in this case, the phytocomplex showed better results than the pure extract again, proposing a potential use for anti-inflammatory formulations. Both samples showed no toxicity to the tested cell line (J774A.1).

Key words: *Mitracarpus Frigidus*. Antioxidant activity. Anti-inflammatory activity. Cyclodextrin

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Energia de afinidade (kcal/mol) e possíveis interações entre β CD e compostos identificados de MFM.	42
Tabela 2. Atividade antioxidante pelos ensaios de inibição do radical DPPH e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico para as amostras MFM, MFM/ β CD e rutina.	58
Tabela 3. Atividade antioxidante pela redução da produção de malondialdeído na presença de MFM, MFM/ β CD e rutina.	61
Tabela 4. Atividade anti-inflamatória de MFM, MFM/ β CD e β CD pelos métodos de redução do óxido nítrico e medição de metaloproteinase.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Mitracarpus Frigidus</i> (Willd. ex Schult Reem.) K. Schum. (<i>Rubiaceae</i>) partes aéreas e fruto.	19
Figura 2. Estrutura química da ciclodextrina.....	25
Figura 3. Estrutura tronco-cônica da ciclodextrina.....	26
Figura 4. Esquema de equilíbrio dinâmico de moléculas de ciclodextrina e moléculas hóspedes em ambiente aquoso.	28
Figura 5. <i>Docking</i> molecular entre β CD e compostos identificados de MFM.	40
Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 500x e 3000x. (A e B) - β CD (C e D) - MF (E e F) - MFM/ β CD	44
Figura 7. Espectros no infravermelho por transformada de <i>fourier</i> das amostras MFM, MFM/ β CD, MF e β CD.....	45
Figura 8. A) TGA e B) DTA. Curvas das amostras MFM, MFM/ β CD, β CD e MF.	47
Figura 9. PZ de MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.....	50
Figura 10. Condutividade elétrica de MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.	51
Figura 11. Titulação DLS das amostras MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.	53
Figura 12. Varredura espectrofotométrica em UV-vis das soluções aquosas filtradas de MFM e dos fitocomplexos supramoleculares nas proporções de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM.....	54
Figura 13. Teor de terpenos das soluções aquosas filtradas do extrato e fitocomplexos supramoleculares nas concentrações de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM.....	55
Figura 14. Teor de fenóis das soluções aquosas filtradas do extrato e fitocomplexos supramoleculares nas concentrações de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM.	55
Figura 15. Curva de oxidação na presença de veículo (controle), rutina, β CD, MFM e MFM/ β CD.....	59
Figura 16. Concentração de malondialdeído (MDA) por meio do ensaio de peroxidação lipídica, tratadas com extrato, MFM/ β CD, β CD (controle negativo) e rutina (controle positivo), em função do tempo, durante os dias 0, 2, 4, 6 e 8.	62

Figura 17. Avaliação do perfil de viabilidade celular pela clivagem do MTT para MFM, MFM/ β CD e β CD.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Lista de Abreviaturas e Siglas/

Abs – Absorbância

AAR – Atividade antioxidante relativa

AINEs – Anti-inflamatórios não-esteroidal

AlCl₃ – Cloreto de alumínio

ATR - Acessório de refletância total atenuada

CDs - Ciclodextrinas

CI₅₀ – Concentração inibitória 50%

CIT - Calorimetria Isotérmica de Titulação

CO₂ – Dióxido de carbono

COX – Ciclooxigenase

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

DCM – Diclorometano

D_h – diâmetro hidrodinâmico médio

DLS – Fotometria de espalhamento de luz dinâmico

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

DTA – Análise térmica diferencial

EUA - National Science Foundation

FDA - Food and Drug Administration

FTIR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier

g - grama

h - hora

H₂O_{dest.} – Água destilada

H₃PO₄ – Ácido fosfórico

IL -1 – Interleucina-1

IV - Infravermelho

J774A.1 – Linhagem de macrófagos murinos

LPS - Lipopolissacarídeo

MDA - Malondialdeído

MeOH – Metanol
MFM – extrato metanólico de *Mitracarpus Frigidus*
MEV - Microscopia eletrônica de varredura
MFM/ β CD – Fitocomplexo supramolecular entre a fração metanólica de *Mitracarpus Frigidus* e β -ciclodextrina
MMP - metaloproteinase(s)
MMP2 - metaloproteinase 2
MMP9 - metaloproteinase 9
mg – miligrama(s)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MF – Mistura física
MTT - 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
m/z – relação massa/carga
NaNO₂ – Nitrito de sódio
NAD(P) - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NEED - N-1-naphtilethilenodiamina
nm – nanômetro(s)
NO – Óxido nítrico
NOXs- H-oxidases
NPH - Nanoprecipitados hidrofóbicos
PAF – fator de ativação plaquetária
PZ - potencial zeta
q.s.p. – Quantidade suficiente para
RNS – espécies reativas de nitrogênio
ROS – espécies reativas de oxigênio
SFB – Soro fetal bovino
SOD - Enzima superóxido dismutase
TBA - Ácido tiobarbitúrico
TGA – termogravimetria
TNF α – Fator de necrose tumoral
UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora
UV - Ultravioleta

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

UV - vis - Ultravioleta visível

α CD – Alfa-ciclodextrina

μ g – micrograma(s)

μ L – microlitro(s)

μ M - micromolar

β -caroteno – Beta-caroteno

β CD – Beta-ciclodextrina

γ CD - Gama-ciclodextrina

V – volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	TAXONOMIA	18
2.1.1	<i>Mitracarpus spp</i>	18
2.1.2	<i>Mitracarpus frigidus</i>	19
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.3	INFLAMAÇÃO	22
2.4	NANOTECNOLOGIA	23
2.5	CICLODEXTRINAS	25
3	OBJETIVOS	29
3.1	OBJETIVO GERAL	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	30
4.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO (MFM)	30
4.3	PREPARAÇÃO DO FITOCOMPLEXO	30
4.4	DOCKING MOLECULAR	31
4.5	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS	31
4.5.1	Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)	31
4.5.2	Análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TGA)	32
4.5.3	Microscopia eletrônica de varredura	32
4.6	ENSAIO DE SOLUBILIDADE	33
4.7	ANÁLISE POR CONDUTIVIDADE ELÉTRICA, FOTOMETRIA DE ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) E POTENCIAL ZETA (ZP)	33
4.7.1	Diâmetro hidrodinâmico do fitocomplexo por DLS	33
4.7.2	Potencial zeta e condutividade elétrica do fitocomplexo	34
4.8	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
4.8.1	Ensaio de redução do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)	34
4.8.2	Sistema β-caroteno/ácido linoleico	35
4.8.3	Inibição da formação de malondialdeído	36

4.9	VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA IN VITRO	37
4.9.1	Linha celular RAW 264.7	37
4.9.2	Viabilidade celular	38
4.9.3	Produção de óxido nítrico.....	38
4.9.4	Zimograma	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	DOCKING MOLECULAR.....	40
5.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FITOCOMPLEXO	43
5.2.1	Microscopia eletrônica de varredura	43
5.2.2	Caracterização espectroscópica de inclusão do fitocomplexo por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	45
5.2.3	Experimentos por análises térmicas (TGA e DTA)	47
5.3	CARACTERIZAÇÃO COLOIDAL DE MFM E MFM/BCD	49
5.3.1	Potencial Zeta	49
5.3.2	Condutividade elétrica	50
5.3.3	Diâmetro hidrodinâmico por DLS – D_h	51
5.4	ENSAIO DE SOLUBILIDADE.....	53
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FITOCOMPLEXO	56
5.5.1	Avaliação da atividade antioxidante	56
5.5.2	Avaliação da viabilidade celular em RAW 264.7	63
5.5.3	Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	64
	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO 1	79

1 INTRODUÇÃO

Mais de 50% dos medicamentos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) entre 1981 e 2014, são provenientes de produtos naturais ou de seus derivados sintéticos (WANG; DONG; SHENG, 2019). Devido a extensa diversidade molecular e funcionalidade biológica, os metabólitos provenientes de organismos vivos tem sido frequentemente isolados e incorporados em formulações medicinais, ou ainda utilizados como inspiração para a síntese de derivados sintéticos e desenvolvimento de novos fármacos (MOREIRA et al., 2016; GUO, 2017).

Quando se trata de extratos naturais, o sinergismo proporcionado pela ação conjunta de diversas substâncias pode conferir-lhes características multifuncionais, podendo levar a vantagens como redução da resistência medicamentosa a doenças de maior complexidade, em virtude da interação simultânea em mais de um alvo terapêutico (URICH-MERZENICH et al., 2007; RODRIGUES et al., 2016; WANG, DONG, SHENG, 2019).

Na atualidade, a biodiversidade disponível na natureza ainda é pouco explorada e apenas uma pequena fração dos organismos do planeta, incluindo plantas, microrganismos e organismos marinhos, tem suas atividades biológicas bem estabelecidas (BOLZANI, 2016).

Quanto à biodiversidade vegetal, a maior parte da flora mundial pertence ao Brasil, com cerca de 46 mil espécies vegetais conhecidas, totalizando mais de 20% da diversidade do planeta (MMA, 2014).

No Brasil, considerando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, além da tendência mundial de desenvolvimento de medicamentos mais seguros e eficazes, bem como o interesse cada vez maior da sociedade por terapias de baixo custo e menos agressivas, existe uma crescente necessidade de maiores investimentos em pesquisas voltadas para a descoberta de novos produtos naturais com propriedades farmacológicas (HASENCLEVER et al., 2017).

Mitracarpus frigidus (Willd. exReemSchult.) K. Schum. pertence à família Rubiaceae, é abrangente em regiões tropicais, sendo amplamente distribuída nas antilhas e América tropical. No Brasil, é expressamente encontrada de norte a sul do

país (PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA, 2006). Apesar de não possuir uso popular, o extrato e frações da planta tem revelado, ao longo dos estudos, um potencial farmacoterapêutico promissor (FABRI et al., 2009).

O extrato das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* é constituído por metabólitos de importância biológica, tais como, alcalóides, triterpenos e compostos fenólicos, e a presença destes fitoconstituintes tem sido correlacionada ao potencial antioxidante, antitumoral, antiinflamatório, antimicrobiano e leishmanicida da espécie (FABRI et al., 2009).

Apesar da baixa toxicidade e alto potencial terapêutico, a maioria dos produtos naturais, principalmente os de ação antioxidante, são instáveis e podem ser degradados pela ação de fatores externos, o que interfere diretamente na eficácia destes produtos. Além disso, a biodisponibilidade de compostos bioativos naturais é frequentemente prejudicada pela baixa solubilidade aquosa. Neste sentido, é preciso desenvolver métodos que proporcione uma maior hidrossolubilidade e ainda protejam estes compostos contra agentes que favorecem a sua degradação, a fim de preservar a sua estabilidade e biodisponibilidade (KRINGEL et al, 2017).

A partir da necessidade de aprimorar as propriedades físico-químicas dos produtos naturais e torná-los mais estáveis e disponíveis, inúmeros métodos passaram a ser empregados. Dentre eles, o uso de nanocarreadores tem sido frequentemente abordado em indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos. Por meio do encapsulamento a nível molecular, esta estratégia tem a finalidade de promover melhora da estabilidade química, da permeabilidade de membrana e biodisponibilidade de moléculas de baixa solubilidade, além de mascarar características organolépticas indesejadas de determinados alimentos, bem como protegê-los contra degradação e evaporação (WADHWA et al., 2017; KE et al., 2019).

Ciclodextrinas (CDs) são oligômeros de glicose cíclicos com seis, sete ou oito unidades de glicose unidas por ligações 1,4-glicosídicas, denominadas α , β e γ ciclodextrina, respectivamente. Estas moléculas têm sido utilizadas como material encapsulante por serem estáveis, não tóxicas e por apresentarem propriedade anfífilas, sendo capazes de complexar moléculas hidrofóbicas em sua cavidade interna (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

Estes oligossacarídeos formam complexos supramoleculares através de interações não covalentes com moléculas de baixa solubilidade, de forma que as

propriedades físico-químicas do composto hópede sejam melhoradas. Com isso, são capazes de aumentar a estabilidade, solubilidade, taxa de dissolução e biodisponibilidade do composto ativo no meio biológico, além de reduzir possíveis efeitos adversos (LIMA et al., 2019).

O uso da ciclodextrina na indústria farmacêutica já é bem disseminado, e está presente em algumas formulações como, nimesulida com β CD, omeprazol com β CD, dexametasona com β CD e miconazol com α CD. Além disso, seu uso em formulações a partir de produtos naturais é promissor, sendo possível citar alguns estudos que abordam a formação de complexos de inclusão entre compostos naturais ou extratos vegetais com ciclodextrina, como a inclusão de compostos fenólicos e terpenicos (LIMA et al., 2016; SIMSEK et al., 2019; LIMA et al., 2019), o extrato das folhas de *Bryophyllumpinnatum* com β CD (LANNA et al., 2016) e o extrato de *Plinia cauliflora* com β CD (Paula et al., 2020).

Apesar do potencial farmacológico de *Mitracarpus frigidus* já ter sido relatado, ainda há necessidade de novos estudos, a fim de consolidar as atividades já descritas para a espécie. Além disso, não há descrições na literatura que abordem as atividades antioxidante e anti-inflamatória de formulações contendo extrato de *Mitracarpus frigidus* com ciclodextrina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TAXONOMIA

2.1.1 *Mitracarpus spp*

Mitracarpus spp pertence à família *Rubiaceae*, a qual faz parte do grupo das angiospermas. O gênero é nativo no Brasil, e é comumente encontrado em regiões tropicais e subtropicais (PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA, 2006).

O gênero contém pelo menos 50 espécies, das quais já foram isolados uma variedade de compostos de importância biológica (PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA, 2006; MARTINS; NUNES, 2015; EKALU, 2021). Dessas espécies, algumas possuem relatos de uso etnofarmacológico, como *Mitracarpus scaber*, que faz parte da medicina tradicional da África ocidental, usada para dor de cabeça, dor de dente, amenorreia, dispepsia, doenças hepáticas, ulcerativas e leprosas. Seu uso tópico é ativo para dermatites infecciosas, eczema e sarna, além disso estudos revelaram seu potencial como antimicrobiano (DALZIEL et al., 1937; KERHARO; ADAM et al., 1974; SANOGO et al., 1996).

Alguns compostos foram identificados e isolados de *M. scaber* como, rutina, caempferol, caempferol-3-O-rutinosídeo, ácido gálico, ácido 3,4,5-trimetoxi benzoico, 4-metoxiacetofenona, 3,4,5-trimetoxiacetofenona, harounosídeo e o psoraleno, potencialmente ativo contra infecções da pele e utilizado para o tratamento de vitiligo, psoríase e micose (BISIGNANO et al., 2000; GBAGUIDI et al., 2005).

Estudos fitoquímicos com a espécie *Mitracarpus villosus* (Sw) DC. também revelaram potencial terapêutico (antimicrobiano e sedativo), que foi atribuído aos taninos, terpenos, flavonoides, fenóis e resinas presentes no extrato (IROB; DARAMOLA et al., 1993; JOHN-AFRICA et al., 2014). Dos compostos presentes nesta espécie, já foram identificados estigmasterol, 24-metil colest-5-em-3 β -ol e ácido ursólico (EPKENDU, ADESOMOJU e OKOGUN, 2001).

Mitracarpus hirtus também apresentou propriedades farmacológicas para tratamento de doenças e infecções da pele, atividades antioxidantes, antidiabéticas, antiacetilcolinesterase e anti tirosinases. Estudos identificaram a presença de compostos fenólicos, alcalóides pirrolizidínicos e triterpenóides, sendo o ácido rosmarínico o composto mais abundante. (BISIGNANO et al., 2000; ETIENNE et al., 2021)

Mitracarpus frigidus (Willd. ex Roem. & Schult.) K. Schum, é a espécie de interesse deste estudo. Apesar de não possuir relatos de uso popular, estudos anteriores relataram a presença de fitoconstituintes de importância clínica e potencial promissor para diversas atividades biológicas (FABRI et al., 2009).

2.1.2 *Mitracarpus frigidus*

Esta espécie tem a seguinte classificação botânica:

Reino: *Plantae*;

Divisão: *Magnoliophyta*;

Classe: *Magnoliopsida*;

Ordem: *Gentianales*;

Família: *Rubiaceae*;

Gênero: *Mitracarpus* spp.

Mitracarpus frigidus (Willd. ex Reem Schult.) K. Schum. (figura 1) é abrangente em regiões tropicais, sendo amplamente distribuída nas Antilhas e América Tropical. No Brasil, é expressamente encontrada de norte a sul do país (PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA et al., 2006).

Figura 1. *Mitracarpus Frigidus* (Willd. ex Schult Reem.) K. Schum.
(*Rubiaceae*) partes aéreas e fruto.



Fonte: PEREIRA; CARVALHO-OKANO; GARCIA, 2006.

Análises fitoquímicas das partes aéreas da espécie *M. frigidus* identificaram a presença de alcalóides, triterpenos, esteróis, saponinas, cumarinas, fenóis, taninos, flavonóides, antraquinonas, leucocianidinas, catequinas e flavonas como principais classes de fitoconstituintes da planta. A importância biológica destes compostos já é bem descrita, e sua presença no extrato e frações foi associada ao potencial farmacológico da espécie (FABRI et al., 2009).

Por meio do perfil cromatográfico das partes aéreas de *M. frigidus*, realizado por UFLC QTOF- MS, foi possível identificar alguns compostos pertencentes a estas classes de constituintes como, ácido clorogênico, clarinosídeo e 2-azaantraquinona (Fabri et al.,2021). Além disso, análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), do extrato metanólico de *M. frigidus*, revelaram a presença dos triterpenos ácido ursólico e ursolato de metila, dos flavonóides, rutina e campferol-3-O-rutinosídeo, e da psicorubrina, uma naftoquinona relatada até hoje apenas na família *Rubiacea*. (LEMOS et al., 2020; FABRI et al., 2012a,2014b).

Ensaio biológicos realizados a partir do extrato e frações de *M. frigidus*, evidenciaram potencial farmacológico para diversas atividades testadas, tais como, antimicrobiana, com importante ação contra algumas cepas bacterianas (*S. aureus*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobactercloacae*, *Shigellasonnei* e *Bacillus cereus*) e fúngicas (*Cryptococcusneoformanse C. albicans*). As partes aéreas da planta também apresentaram atividade antiparasitária significativa, com redução da carga parasitária do *S. mansoni*, e potencial leishmanicida frente ao *Leishmania* spp, na forma amastigota das espécies *L. braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* (FABRI et al., 2009, 2012a, 2012b, 2014b).

A planta também apresentou potencial antitumoral, atividade laxativa, com aumento do peristaltismo intestinal, fator de proteção contra radiações UVA e UVB, ação antioxidante por meio de doação de prótons e bloqueio da peroxidação lipídica, e atividade anti-inflamatória, por reduzir a expressão de cicloxigenases e a migração de mediadores inflamatórios (FABRI et al., 2009, 2012c; FERREIRA et al., 2021).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO

Os organismos aeróbios geram, a partir de reações enzimáticas provenientes da respiração celular, átomos e moléculas instáveis formadas pelo desemparelhamento de elétrons, os radicais livres (POPRAC, 2017). Mas apesar de

se originarem principalmente nas mitocôndrias, estas espécies são também produzidas por células fagocitárias durante o mecanismo de defesa do organismo, ou decorrentes da atividade de algumas enzimas, tais como, H-oxidases (NOXs), xantina-oxidoreductase, citocromo P450, lipoxigenases e cicloxigenases, estando diretamente relacionadas com processos inflamatórios e outras alterações metabólicas. Estes radicais podem interagir com outras moléculas formando peróxidos, que irão atuar na sinalização celular e também na proteção contra agentes patogênicos. (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; CONRAD et al., 2018).

Porém, quando há uma produção excessiva de radicais livres, e a incapacidade coexistente dos mecanismos antioxidantes biológicos em neutralizá-los, o organismo se depara com um estresse oxidativo (POPRAC, 2017). Tal condição pode causar a oxidação de enzimas, inativando-as, a degradação de proteínas, ou ainda a modificação e inativação de biomoléculas, tais como, piruvato, α -cetogluturato, DNA e lipídeos, levando a diversas situações patológicas, bem como ao envelhecimento (DUH et al., 1997; BARBOZA et al., 2018). Dentre as doenças relacionadas a esta condição estão: alguns tipos de câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas, diabetes mellitus, cardiopatias, dentre outras (PHANIENDRA; JESTADI; PERIYASAMY, 2015).

O uso de antioxidantes exógenos, presentes principalmente em vegetais, têm a capacidade de proteger o organismo contra o estresse oxidativo, quando a produção de espécies reativas é exacerbada. Devido a sua estrutura química e seu potencial redutor, os compostos fenólicos são capazes de capturar radicais livres e de doar elétrons ou prótons, neutralizando as espécies oxidativas, além de quelar íons metálicos pró oxidantes e inibir a peroxidação lipídica e alipoxigenase (PODSEDEK, 2007; KYUNGMI et al., 2008; SEDDIKI; DA SILVA; DA SILVA, 2017).

Estudos anteriores com o extrato e frações das partes aéreas de *M.frigidus* demonstraram que, as frações acetato de etila, butanólica, e diclorometânica, o óleo essencial, a fração metanólica e suas partições, apresentaram capacidade de neutralizar radicais livres por meio de doação de hidrogênio. Segundo os autores, os fenóis e flavonoides, presentes nessas amostras, foram responsáveis pela atividade redox. Além disso, o extrato metanólico e suas partições também foram eficientes em inibir a peroxidação lipídica, principalmente pelo fato de retardar reações em cadeia responsáveis pela formação de peróxidos (FABRI et al., 2009, 2012b; FERREIRA et al., 2021)

2.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa fisiológico inicial do organismo contra um agente agressor, e tem como objetivo, eliminar o estímulo nódico e recuperar a região afetada a partir de uma cascata de reações envolvendo células de defesa (neutrófilos, macrófagos e linfócitos), mediadores químicos (interleucina-1 e o fator de necrose tumoral), mediadores lipídicos, como prostaglandinas, leucotrienos e fator de ativação plaquetária (PAF), e também substâncias vasoativas, das quais fazem parte a histamina, serotonina e óxido nítrico, sendo que este último provoca dano oxidativo (RANG, 2012; VIJAY et al., 2018).

Apesar da inflamação ser um processo inicialmente benéfico ao organismo, promovendo a eliminação de agentes irritantes e a recuperação de tecidos lesados, quando essa resposta é exacerbada há uma crescente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, secretadas por células inflamatórias ativas, que levam a destruição tissular e danos ao DNA. Neste sentido, se faz necessário o uso de antiinflamatórios exógenos, a fim de regular a resposta imunológica e controlar os possíveis danos causados pela inflamação (RANG, 2012; WALLACE, 2005; BARBOZA et al., 2018).

Dentre os anti-inflamatórios naturais, alguns flavonoides e seus derivados exibem importante efeito na inibição das vias ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, inibindo desta forma, a exsudação de proteínas e a migração de leucócitos para o local da inflamação (MALEKI, 2019). Além disso, os triterpenos também têm importante ação anti-inflamatória por meio do bloqueio da ativação das células T (CHECKER et al., 2012). Triterpenos isolados de *M. frigidus* foram eficientes em promover a inibição da quimiotaxia e da expressão de mediadores inflamatórios liberados na primeira e segunda fase da inflamação, como histamina, serotonina, prostaglandinas e bradicinina (FABRI et al., 2014c).

O extrato metanólico foi ativo tanto na fase aguda quanto na fase crônica da inflamação. Por meio de estudos *in vivo* foi possível concluir que MFM atua na expressão das cicloxigenases, inibindo seletivamente a ciclooxigenase-2 (COX-2), além disso o potencial anti-inflamatório do extrato também está relacionado com o processo de migração celular mediado pela inflamação, bem como a redução de processos oxidativos (FABRI et al, 2014b). Os triterpenos isolados do extrato

hexânico, ursolato de metila e ácido ursólico, também apresentaram atividade antiinflamatória significativa, além de reduzir o estresse oxidativo proveniente do processo inflamatório (FABRI et al., 2014c)

2.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar da ciência que tem sofrido grandes avanços e despertado interesse econômico nos últimos anos. Nos Estados Unidos, a *National Science Foundation* define esta ciência como uma abordagem ao desenvolvimento de pesquisa e tecnologia em escala atômica, molecular ou micromolecular, numa faixa que varia entre 1 e 100 nm, porém há controvérsias quanto às dimensões da nanoescala, já que esta padronização não abrange todos os nanomateriais, sobretudo quando se trata de biotecnologia e saúde que são justamente as áreas em que há maiores interesses em nanotecnologia (Fatal et al., 2010; BAYDA et al, 2020). Seu princípio se baseia na mudança das propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais da molécula quando esta se apresenta em escala nanométrica (KHAN, SAEED, KHAN, 2019).

A nanotecnologia empregada na área da saúde é definida pela *European Medicines Agency* como o estudo de nanoestruturas com tamanho menor que 1.000 nanômetros, que apresentam propriedades específicas, recebendo também a terminologia *nanomedicina*. Esta tem fundamental importância em diagnósticos, prevenção e tratamento de doenças. Além disso, é utilizada como ferramenta para o entendimento de processos fisiopatológicos, através da utilização de nanomateriais que tem a capacidade de interagir com células humanas estimulando mecanismos de reparação, permitindo o estudo de novas formas de diagnóstico e terapêutica (WU et al., 2018; NOBILE, NOBILE, 2020)

O uso da nanotecnologia em medicamentos surgiu na década de 1960. Inicialmente com o desenvolvimento de técnicas de microencapsulação, que permitiu o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada. Logo depois esta técnica foi aprimorada a partir da substituição de micro por nanopartículas, dando origem aos nanomedicamentos. Nesta mesma década foram descobertos os lipossomos (vesículas aquosas formadas por bicamadas concêntricas de fosfolípidios), que por sua vez possibilitaram maior variedade de métodos de emprego da nanotecnologia aplicada a medicamentos. (AMSELEM, 1990; BAYDA et al, 2020).

Uma das principais vantagens da nanoencapsulação de fármacos é a redução de tamanho das partículas, melhorando de forma significativa a interação de moléculas ativas com o alvo farmacoterapêutico. Ao reduzir o tamanho das partículas, a área superficial torna-se maior, ocasionando um aumento da exposição de átomos e moléculas. Por estarem na superfície, tais átomos e moléculas sofrem mudanças comportamentais, já que as probabilidades de interações intermoleculares com o ambiente são aumentadas (SCHMALTZ et al., 2005). Além disso, estes sistemas atuam como nanocarreadores, uma vez que o fármaco nanoencapsulado é direcionado para o alvo terapêutico e liberado de forma controlada. As principais vantagens desse sistema é a maior biodisponibilidade do princípio ativo no meio biológico e a redução de efeitos adversos, especialmente toxicidade. (MIRZA; SIDDIQUI, 2014; WACKER, 2019).

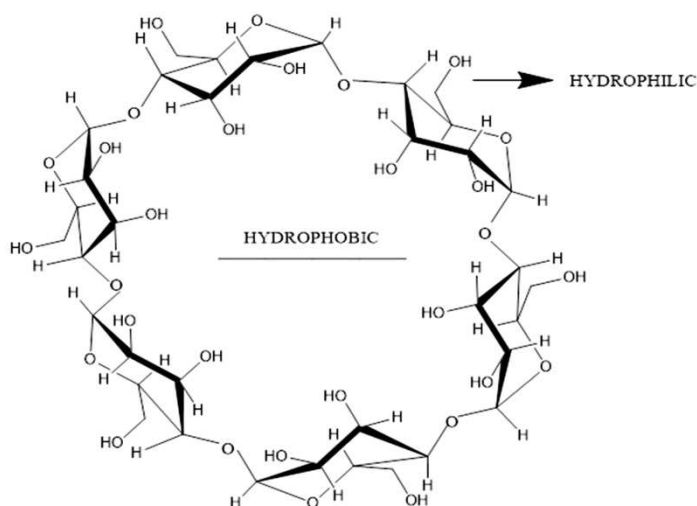
Os produtos naturais costumam apresentar instabilidade química. Estas espécies podem ser facilmente degradadas pela ação de fatores externos, afetando a sua estabilidade durante o armazenamento e processamento, bem como no meio biológico. Além disso, a biodisponibilidade de compostos bioativos naturais é frequentemente prejudicada pela baixa solubilidade aquosa (HOLST, WILLIAMSON, 2008). A complexação a nível molecular protege estes compostos da degradação, tornando-os estáveis quando em contato com o meio. A nanocomplexação também é capaz de alterar características físico químicas dos compostos complexados, conferindo maior hidrossolubilidade, e com isso promovendo um aumento da biodisponibilidade deste no organismo, contribuindo de forma significativa para a melhora da eficácia terapêutica (LANNA et al., 2016).

Um importante nanocarreador utilizado atualmente é a ciclodextrina. (BREWSTER; LOFTSSON, 2007). As Propriedades Intrínsecas das ciclodextrinas possibilitam interações do tipo hóspede-hospedeiro com moléculas de baixa hidrofobicidade. A partir de interações supramoleculares que envolvem ligações não covalentes e interações entrópicas, formam complexos capazes de alterar as propriedades físico-químicas do composto hóspede, conferindo maior estabilidade química, aumento da solubilidade e biodisponibilidade, bem como vetorização e liberação controlada no meio biológico (ABBAS et al., 2015; NEVES et al., 2015; KIM et al., 2019).

2.5 CICLODEXTRINAS

Ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos, formados a partir da degradação do amido, pela ação da enzima ciclodextrina–glicosiltransferase (figura 2). Esta enzima é sintetizada por microrganismos, e por isso algumas variações de CDs são encontradas na natureza, como a α -ciclodextrina, a β -ciclodextrina e a γ -ciclodextrina, que se diferenciam pelo tamanho da estrutura cíclica, sendo constituídas por 6, 7 e 8 unidades de α -D-glicospiranose, unidas por ligações 1,4' glicosídicas, respectivamente (TIAN; LIU, 2020).

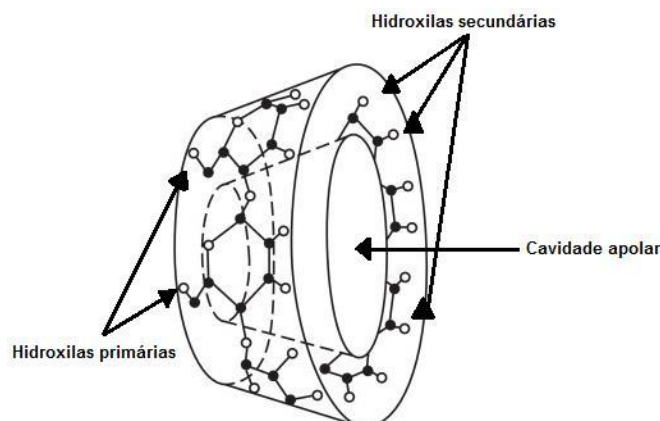
Figura 2. Estrutura química da ciclodextrina



Fonte: BARBOSA et al., 2019

As ciclodextrinas apresentam forma cônica truncada (troncoidal) (figura 3). Essa conformação deve-se à inexistência de livre rotação de suas ligações e por causa da conformação do carbono C1 presente nas unidades de α -D-glicospiranoses. (LOFTSSON et al., 2005). A cavidade interna das CDs é constituída por um esqueleto de carbono e por ligações ésteres resultante dos resíduos de glicose, gerando densidade eletrônica. Devido a essa conformação, as CDs apresentam hidrofílicidade e ao mesmo tempo a capacidade de complexar moléculas pouco hidrossolúveis em sua cavidade, permitindo a formação de complexos de inclusão a partir de ligações não covalentes com compostos específicos (JANSOOK et al., 2018).

Figura 3. Estrutura tronco-cônica da ciclodextrina.



Fonte: LOFTSSON, 1996.

Ao longo dos estudos, notou-se que estes oligossacarídeos são biodegradáveis e não apresentam toxicidade para o organismo humano, e isso despertou interesse na aplicação tanto em produtos nutricionais como medicinais. Com isso, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou seu uso, expandindo a incorporação da CD nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. Atualmente o uso dessa substância tornou-se efetivo na produção de medicamentos, e agências reguladoras da Europa, Estados Unidos e Japão já aprovaram inúmeras formulações com ciclodextrina, tais como Nitropen® (Japão), Omebeta® (Europa), Cardiotec® (EUA), Brexin® (Europa e Brasil), Clorocil® (Europa) e Aerodiol® (Europa) (LOFTSSON; DUCHÊNE, 2007).

A inclusão de compostos bioativos na ciclodextrina pode ser uma estratégia plausível para minimizar problemas como instabilidade e baixa solubilidade, muito frequentes em formulações contendo extratos e compostos vegetais. Os polifenóis, por exemplo, sofrem degradação pela ação de fatores externos, como luz, temperatura, PH e presença de oxigênio, e por causa disso, tem sua eficácia prejudicada. Outro exemplo são os terpenos, que tem sua biodisponibilidade limitada devido à alta hidrofobicidade. Estudos anteriores revelaram que a complexação com CDs promoveram melhora da estabilidade, bem como da solubilidade, potencializando a atividade biológica destes compostos (LANNA et al., 2016; SHUKLA et al., 2020; ESCOBAR-AVELLO et al., 2021)

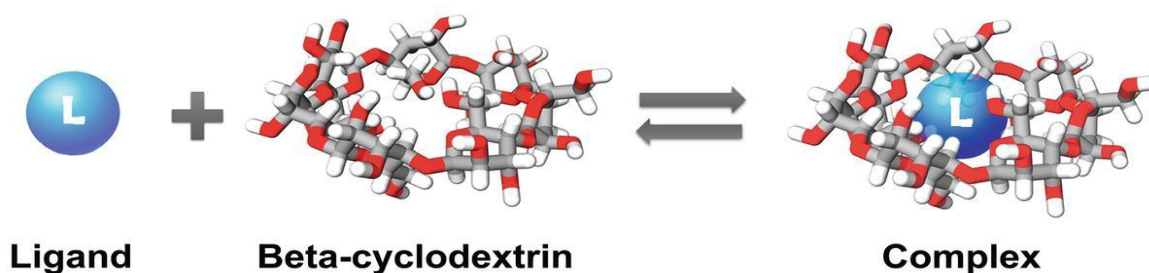
O ajuste espacial das CDs exerce papel fundamental na especificidade do composto hóspede, pois as ciclodextrinas tendem a complexar-se com moléculas

que tenham dimensões similares à sua cavidade interna (SZEJTLI, 1998). Sendo assim, moléculas pequenas que apresentam baixo peso molecular ou que tenham uma cadeia lateral alifática, têm maior facilidade em complexar-se com as α CDs, por serem geometricamente compatíveis. As γ CDs tem maior afinidade com moléculas maiores, como macrociclos e esteroides. Já as β CDs tendem a formar complexos com substratos que tenham cadeias aromáticas e heterocíclicas (RAO et al., 2011). Devido a essa compatibilidade geométrica, foi possível concluir que a CD mais adequada para a complexação com o extrato etanólico de *Mitracarpus frigidus* é a β CD, já que os compostos de interesse para as atividades testadas são os polifenóis e os triterpenoides presentes no extrato.

A complexação com a CD ocorre de forma espontânea, por meio da interação da fração lipofílica do composto a ser complexado, com a cavidade interna da estrutura troncoidal (figura 4). O processo se dá a partir de uma força motriz exercida pela liberação de moléculas de água da cavidade interna da ciclodextrina a favor da reação, mas também existem outras forças não covalentes que participam desse processo, como: ligações de hidrogênio, de van der Waals, interações eletrostáticas, liberação de deformação conformacional ou ainda interações de transferência de carga. Dessa forma, moléculas menos hidrofílicas que a água são atraídas para a cavidade interna da CD formando um complexo de inclusão (BREWSTER; LOFTSSON, 2007).

A partir dessa interação são iniciadas etapas energéticas que favorecem a complexação. Inicialmente as moléculas de água são deslocadas da cavidade interna apolar da CD. As moléculas de água ressovatam o complexo, aumentando o número de ligações de hidrogênio. Com isso a força repulsiva entre a fase apolar e a fase aquosa é reduzida e as interações hidrofóbicas são potencializadas conforme a molécula hóspede se adere à cavidade interna da CD (JAMBHEKAR; BREEN, 2016).

Figura 4. Esquema de equilíbrio dinâmico de moléculas de ciclodextrina e moléculas hóspedes em ambiente aquoso.



Fonte: MARAULO et al., 2021

Apesar da administração de medicamentos contendo ciclodextrina, por via oral, ser aprovada por órgãos de diversos países, é importante ressaltar que a CD não é absorvida pelo trato gastrointestinal, neste sentido, apenas o composto hóspede é absorvido após ser liberado da cavidade interna da CD. Porém, durante esse processo, o fármaco pode sofrer uma ação local e não ser absorvido para a circulação sistêmica, quando isso ocorre pode causar efeitos indesejados (LIMA et al., 2016).

Além de formulações orais, o uso de CDs em formulações de absorção através da mucosa também já é bem consolidado e menos passível de efeitos colaterais. Diversos estudos demonstraram que o uso de CDs reduziu barreiras metabólicas e melhorou a liberação e/ou permeação do fármaco, sendo amplamente utilizada em formulações nasais, oculares e dérmicas (IRIE & UEKAMA, 1997). Algumas formulações já conhecidas com o uso de ciclodextrinas são: (Voltaren Ophta® (Novartis); budesonida solubilizada com SBE β CD; β CD com betametasona (LOFTSSON, 1996; MARTINS; VEIGA, 2002; JUG, 2020).

Com a complexação do fármaco a CD é possível aumentar a hidrossolubilidade sem modificar sua estrutura molecular, facilitando a absorção através de barreiras biológicas aquosas e mantendo, ao mesmo tempo, a capacidade de permeação das membranas lipídicas, dessa forma, o fármaco que apresenta características lipossolúveis permeará pela membrana, e a ciclodextrina, por ser hidrofílica, não sofrerá absorção (LOFTSSON, 1998; JANSOOK et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Promover a caracterização físico-química e avaliar as atividades antioxidante e anti-inflamatória do fitocomplexo formado com o extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (MFM) e β -ciclodextrina (β CD), a fim de melhorar a estabilidade, solubilidade e a biodisponibilidade dos componentes ativos do extrato.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Promover a incorporação do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* em β -ciclodextrina;
- Verificar a ocorrência da formação de complexo supramolecular entre os constituintes do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e β -ciclodextrina por meio de docking molecular, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV).
- Verificar o aumento da estabilidade térmica do fitocomplexo em relação ao extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* através da análise térmica diferencial (DTA) e termogravimetria (TGA).
- Verificar o aumento de solubilidade do fitocomplexo em relação ao extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* através do teste de solubilidade.
- Caracterizar a formação de nanoprecipitados por fotometria de espalhamento de luz dinâmico (DLS), determinação da condutividade elétrica e do Potencial Zeta (PZ);
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e de seu fitocomplexo;
- Avaliar a viabilidade celular do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e de seu fitocomplexo;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vitro* do extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* e de seu fitocomplexo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* foram coletadas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, nas coordenadas geográficas -43.38223, -21.78073, em maio de 2011. A planta foi identificada pelo Dr. Vinícius Antônio de Oliveira Dittrich, do Departamento de Botânica/UFJF. Um exemplar de comprovante (CESJ 46076) foi depositado no herbário Leopoldo Krieger, na Universidade Federal de Juiz de Fora (A032F41-23 SISGEN/BRASIL).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO (MFM)

As partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C e pulverizadas, para obtenção do material vegetal seco, e obteve-se uma massa de 1000 gramas. O material foi extraído por maceração estática com metanol (MeOH) à temperatura ambiente (5 x 1000 mL). O extrato foi concentrado à pressão reduzida utilizando rotaevaporador. O solvente foi evaporado resultando em um extrato com rendimento de 10%. Por meio dessa extração obteve-se o extrato metanólico das partes aéreas de *M. frigidus* (MFM). O extrato já é padronizado por HPLC (FABRI et al., 2012).

4.3 PREPARAÇÃO DO FITOCOMPLEXO

O fitocomplexo supramolecular de MFM e β CD (MFM/ β CD) foi preparado pelo método de coprecipitação combinado com liofilização (OZDEMIR; ERKIN, 2012; LANNA et al., 2016). Para a preparação do fitocomplexo foram pesados 1,0 g de MFM e 1,0 g de β CD. β CD foi solubilizada em 50 mL de água destilada e MFM em 50 mL de etanol. Posteriormente, verteu-se o extrato, já solubilizado, na solução de β CD em agitação. A solução formada permaneceu em agitação por 24 h em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Após esse tempo, a solução formada passou por um evaporador rotatório de marca BUCHI Labortechnik AG (V-700) à 50 °C. Depois o fitocomplexo foi submetido a

congelamento a 80 °C, liofilizado e armazenado em frasco de vidro limpo, seco e tampado, sob proteção da luz.

Para a realização dos testes biológicos foi utilizado o dobro da quantidade do fitocomplexo supramolecular em relação ao extrato puro, para possibilitar a comparação equivalente de substâncias bioativas presentes entre eles. Sendo assim, 2 mg do fitocomplexo supramolecular equivale a 1 mg de extrato puro e 1 mg de β CD, obtendo a proporção de 1:1.

4.4 DOCKING MOLECULAR

β -Ciclodextrina (β CD) foi extraída do arquivo PDB 3CGT (TOM et al., 2020), do Banco de Dados de Proteínas RCSB e teve suas energias minimizadas, sua estrutura parametrizada no *software* Avogadro v.1.1 e preparada no AutoDock, ferramentas onde os hidrogênios da molécula foram adicionados e o arquivo pdbqt foi gerado. A partir de uma revisão bibliográfica, foram selecionados todos os compostos já isolados e/ou identificados por UPLC/MS, das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*, tais compostos são, ácido clorogênico, clarinosídeo e 2-azaantraquinona (FABRI et al., 2021); ácido ursólico, ursolato de metila, rutina, campferol-3-O-rutinosídeo, e psicorrubrina (LEMOS et al., 2020; FABRI et al., 2012a, 2014b). A caixa de grade usada foi: caixa central com dimensões de 20 × 20 × 20, coordenadas de X = 0,065, Y = 77,23 e Z = 173,031, e espaçamento de 0,375 Å. O *docking* molecular foi realizado com AutoDock Vina. O programa forneceu vários modelos acoplados viáveis (9 poses) que foram avaliados no *software* Pymol 2.4.1®. Foi selecionada a estrutura mais plausível com base nos parâmetros energéticos e nas interações formadas entre o β CD e os ligantes.

4.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FITOCOMPLEXOS

4.5.1 Espectroscopia Vibracional na Região do Infravermelho (IV)

Para identificar os principais constituintes de MFM e a interação entre esses constituintes e a β CD, realizou-se espectroscopia vibracional na região do infravermelho (IV) no estado sólido. Os espectros de infravermelho das amostras (MFM, MFM/ β CD e MF) foram obtidos no modo de transmissão usando o espectrômetro Perkin-Elmer, modelo Spectrum Two™, com transformada de

Fourier. As misturas mecânicas das amostras foram preparadas em proporção 1:1 e homogeneizadas em um gral. Após esta etapa, foram acondicionadas em tubos de *ependor*[®] e armazenadas em geladeira.

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 de 4000 a 400 cm^{-1} . Para a aquisição dos espectros foi utilizado o programa Perkin Elmer Spectrum ES (versão do aplicativo: 10.03.08.0133). Os dados foram então exportados para o MicrocalOrigin 8.0[®].

4.5.2 **Análise térmica diferencial (DTA) e análise termogravimétrica (TGA)**

A análise (TGA) foi realizada utilizando o módulo STAGA-DTA STA7200RV da HITACHI, acoplado a um sistema de fotovisualização. Os dados foram registrados para MFM, β CD, MFM/ β CD e sua mistura física (MF) na razão de peso de 1:1. Os experimentos foram realizados utilizando uma atmosfera dinâmica de ar de 50 mL/min, uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ e sensibilidade de $1,0\text{ }^\circ\text{C}$. Para cada experimento, foram utilizados aproximadamente 2 mg de amostra, que foi colocada em ambiente aberto (DENADAI et al., 2006; LANNA et al., 2016).

4.5.3 **Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia das amostras (β CD, MFM/ β CD e mistura física (MF)) foi analisada através de fotomicrografias eletrônicas, obtidas por microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6390LV, Tóquio, Japão). Para isso, as amostras foram pulverizadas em fitas de dupla face de carbono sobre *stubs* metálicos, e metalizadas com ouro sob vácuo (Leica EM SCD 050), posteriormente foram analisadas em aumentos de 500x e 3000x. As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução do Instituto de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.6 ENSAIO DE SOLUBILIDADE

A solubilidade dos compostos presentes nas amostras foi mensurada pelo método proposto por Higuchi e Connors (1965), com modificações. Inicialmente pesou-se cinco *eppendorfs* contendo 1 mg de MFM, cada, três *eppendorfs* contendo 1 mg de β CD, um *eppendorf* contendo 2mg de β CD e um *eppendorf* contendo 3 mg de β CD, a fim de obter cinco concentrações de MFM/ β CD, em diferentes razões mássicas. A β CD foi diluída em água, e obteve-se as concentrações de 0,025; 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 mg/mL, respectivamente. As soluções de β CD foram colocadas em agitação e em seguida verteu-se 1 mg de MFM em cada solução de β CD, obtendo-se as razões mássicas de 0,25: 1; 0,5: 1; 1: 1; 2: 1 e 3: 1. As soluções finais foram deixadas em agitação por 24 h em temperatura ambiente e sob proteção da luz. Após esse tempo, as soluções foram filtradas em membranas PTFE com espessura de 0,45 μ m. A varredura dos filtrados foi realizada em cubeta de quartzo em espectrofotômetro UV-vis (ThermoScientificSkantl® Multiskan GO, software 3,2), na faixa de comprimento de onda entre 200-400 μ m. Após, foram realizados os doseamentos de terpenos pelo método descrito por Pedrosa et al (2020), e de fenóis pelo método de *Folin Ciocalteu* (DOWD et al., 1959; FOLIN, CIOCALTEAU 1927). Os experimentos foram realizados em triplicata.

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

4.7.1 Diâmetro hidrodinâmico do fitocomplexo por DLS

Para realizar estes experimentos, as amostras sólidas foram dissolvidas inicialmente em etanol, mantendo a concentração de 0,0033 g/mL para o extrato e 0,0067 g/mL para o fitocomplexo (com mesma concentração nominal de extrato). A partir dessa solução pipetou-se 50 μ L na cubeta de polietileno e 2 mL de água deionizada, obtendo uma suspensão final de nanoprecipitados de extrato etanólico a $8,04 \times 10^{-5}$ g/mL e fitocomplexo a $1,63 \times 10^{-4}$ g/mL ($8,04 \times 10^{-5}$ g/mL de extrato + $8,04 \times 10^{-5}$ g/mL de β CD).

Um analisador de partículas Malvern Zetasizer Nano ZS usando células quadradas de polietileno foi usado para medir o diâmetro hidrodinâmico médio (D_h) dos nanoprecipitados hidrofóbicos de MFM e MFM/ β CD, por meio de experimentos

de dispersão dinâmica da luz (DLS). Em uma cubeta de polietileno de 1 cm de caminho óptico, padrão Malven, as soluções foram submetidas a uma luz monocromática (laser de 4 mW He – Ne, comprimento de onda 633 nm) e a intensidade da luz dispersa foi medida em um ângulo de 90 °. Os valores de D_h foram determinados por titulação de um MFM 30 g/L ou MFM/ β CD 1:1 p/p 60 g/L em 1,5 mL de água milli-Q pura, com 42 incrementos de 5 μ L, a 25 °C. Cada ponto foi a média de cinco medidas independentes, cada uma delas obtida como a média de 30 contagens (LANNA et al., 2016).

4.7.2 **Potencial zeta e condutividade elétrica do fitocomplexo**

Experimentos de potencial zeta (PZ) e condutividade elétrica também foram realizados por titulação, em condições semelhantes, descritas nos experimentos DLS. Para esse fim, foi utilizado o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90. O PZ foi determinado por meio da técnica de Microeletroforese a Laser Doppler, no ângulo de dispersão de 173 °, utilizando um capilar descartável dobrado em células (DPS1060). Os valores de PZ foram calculados como a média de dez medidas independentes, cada uma delas obtida como a média de 30 contagens (LANNA et al., 2016).

4.8 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.8.1 **Ensaio de redução do radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH)**

O potencial de redução de radical livre foi determinado com base na capacidade da amostra de reagir com o radical livre DPPH estável (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Em uma placa de 96 poços foram adicionados, 100 μ L de soluções a 1 mg/mL do extrato e de β CD e a 2 mg/mL do fitocomplexo. Posteriormente, as amostras foram diluídas sucessivamente em 50 μ L de metanol, em seguida adicionou-se 150 μ L de solução de DPPH (na concentração de 20 μ g/mL em metanol) e assim obteve-se concentrações entre 250 e 0,49 μ g/mL. Em seguida, a placa foi incubada ao abrigo da luz durante 30 min. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 517 nm no espectrofotômetro. O branco foi preparado da mesma maneira que as amostras, utilizando-se metanol ao invés da solução de DPPH. Rutina foi usada como controle positivo, preparada da mesma forma que as

amostras. Foi realizada também a medida da absorbância do DPPH sem as amostras para o controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata e a porcentagem (%) de inibição de oxidação do extrato e fitocomplexo foi calculada da seguinte maneira:

Equação 3:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs_{branco} - Abs_{amostra}}{Abs_{branco}} \times 100$$

onde, Abs_{branco} : absorbância mensurada do branco; $Abs_{amostra}$: absorbância mensurada das amostras.

A partir dos resultados obtidos na equação 3, foi determinada a concentração inibitória de 50% (CI_{50}) em $\mu\text{g/mL}$, que é a quantidade necessária da amostra para reduzir em 50% o potencial oxidante do DPPH. Os dados foram apresentados em comparação com o controle positivo e reportados como a média \pm desvio padrão.

4.8.2 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A atividade de inibição da peroxidação lipídica foi avaliada através do método β -caroteno/ácido linoleico descrito por Melo e Mancini Filho (1989), com algumas modificações. A emulsão contendo o β -caroteno e o ácido linoleico foi preparada adicionando a um erlenmeyer, 30 μL de ácido linoleico, 265 μL de Tween 40, 500 μL de diclorometano e 100 μL da solução β -caroteno a 10 mg/mL em diclorometano. Essa preparação foi submetida a evaporação em nitrogênio gasoso para eliminação completa do diclorometano. Adicionou-se 30 mL de água destilada, previamente saturada com oxigênio durante 1 h. Após, agitou-se vigorosamente a solução e mediu-se a absorbância da emulsão em 470 nm, ajustando seu valor entre 0,6 e 0,7. Soluções de estoque de 1 mg/mL de MFM e do controle positivo (rutina) e 2 mg/mL do fitocomplexo foram preparadas em metanol obtendo-se concentrações que variaram de 1000,00 a 31,25 $\mu\text{g/mL}$. Em seguida, adicionou-se 250 μL da emulsão e 10 μL das amostras e do controle em microplacas de 96 poços, obtendo-se concentrações finais de 38,46 a 1,20 $\mu\text{g/mL}$, para cada amostra. O controle

negativo foi realizado com 250 μL desta emulsão e 10 μL de metanol para determinar o 100 % de oxidação. Todo experimento foi realizado em triplicata.

A microplaca foi incubada a 45 °C para acelerar as reações de oxidação e, em seguida, despigmentar o β -caroteno. A absorbância foi lida 470 nm em intervalos de 15 min até completar 120 min de reação. Os resultados foram medidos calculando a porcentagem de inibição, a queda da absorbância das amostras (A_{am}) foi associada à queda da absorbância do controle negativo (A_{cn}), dessa forma obteve-se a porcentagem de inibição da lipoperoxidação (%I), representada na fórmula abaixo.

A curva de oxidação entre o controle negativo, as amostras e o controle positivo foram calculadas pela tangente para encontrar os valores $F1$ (capacidade de formação de peróxido) entre 15 e 45 min após o início da reação e $F2$ (capacidade de inibir outras reações durante o processo oxidativo) entre 75 e 90 min após o início da reação de oxidação foi avaliada entre as amostras / rotina e controle negativo por cálculo da tangente (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Todas as experiências foram realizadas em triplicata.

Equação 4:

$$tg = \frac{Abs(15') - Abs(45')}{45 - 15} \qquad tg = \frac{Abs(75') - Abs(90')}{90 - 75}$$

$$F1 = \frac{tgA_{am}}{tgA_{cn}} \qquad F2 = \frac{tgA_{am}}{tgA_{cn}}$$

$$\% I = \frac{A_{cn} - A_{am}}{A_{cn}} \times 100$$

Onde, A_{cn} : absorbância mensurada para o controle negativo; A_{am} : absorbância mensurada para a amostra; % I: porcentagem de inibição da lipoperoxidação; tg: tangente.

4.8.3 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 de MFM, controle positivo (rutina) e β CD, e 10, 20 e 40 mg/mL do fitocomplexo. Inicialmente foram preparados os homogenatos de cada amostra. Para isso, foi adicionado em cada béquer 25 g de carne moída bovina com baixo teor de gordura, 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, obtendo-se as concentrações nominais de extrato de 10, 20 e 40 mg/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 absorbâncias dos dias 0, 2, 4, 6 e 8. 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 (ThermoScientificSkantIt® 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. O experimento foi realizado em triplicata.

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

4.9.1 **Linha celular RAW 264.7**

Macrófagos murinos (RAW 264.7) foram adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com antibióticos penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) e soro fetal estéril de bezerro (FCS) 10% a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂.

4.9.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular na presença de β CD, MFM e MFM/ β CD foi determinada usando o ensaio MTT (MOSMANN, 1983). As células RAW 264.7 (1×10^4 células / poço) foram semeadas em microplacas de 96 poços e incubadas durante 24 h antes do tratamento com β CD, MFM e MFM/ β CD. Os grupos foram tratados com várias concentrações (25, 50, 75 e 100 μ g/mL) a 37 °C por 44 h. Em seguida, foi adicionada solução de MTT (5 mg/mL em meio isento de soro, 20 μ L/poço) em cada poço e seguida de incubação por 4 h. Finalmente, a solução de MTT foi removida e os cristais formados por redução de MTT foram solubilizados em 200 μ L de dimethyl sulfoxido (DMSO). A absorbância foi medida a 540 nm, utilizando um leitor de microplacas (ThermoScientific® - MULTISKAN GO, Waltham, MA, EUA) e os valores foram calculados em comparação com as células controle. Para o cálculo da viabilidade celular (%) dos macrófagos utilizou-se a seguinte equação 5:

Equação 5:

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

onde, Abs_(Amostra) = absorbância mensurada após tratamento das células com as amostras; Abs_(DMSO 0,5%) = absorbância mensurada após tratamento das células com DMSO a 0,5% (veículo).

4.9.3 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi indiretamente determinada pela reação de Griess para medir a concentração de nitrito no meio de cultura (TSIKAS, 2007). Células RAW 264.7 foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 8×10^4 células / poço e foram incubadas durante 24 h. As células foram expostas a 100 ng/mL de LPS e concentrações de 25, 50, 75 e 100 μ g de β CD e de MFM e MFM/ β CD (concentrações nominais de extrato) durante 48 h. O sobrenadante da cultura (100 μ L) foi misturado com reagente de Griess (100 μ L, 1% de sulfanilamida, 0,1% de N-[1-naftil]- etilenodiamina em ácido fosfórico a 5%) e

incubado à temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida a 540 nm (ThermoScientific® - MULTISKAN GO, Waltham, MA, EUA). A concentração de NO foi determinada usando uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2) na concentração de 200 M (GUEVARA et al., 1998).

4.9.4 Zimograma

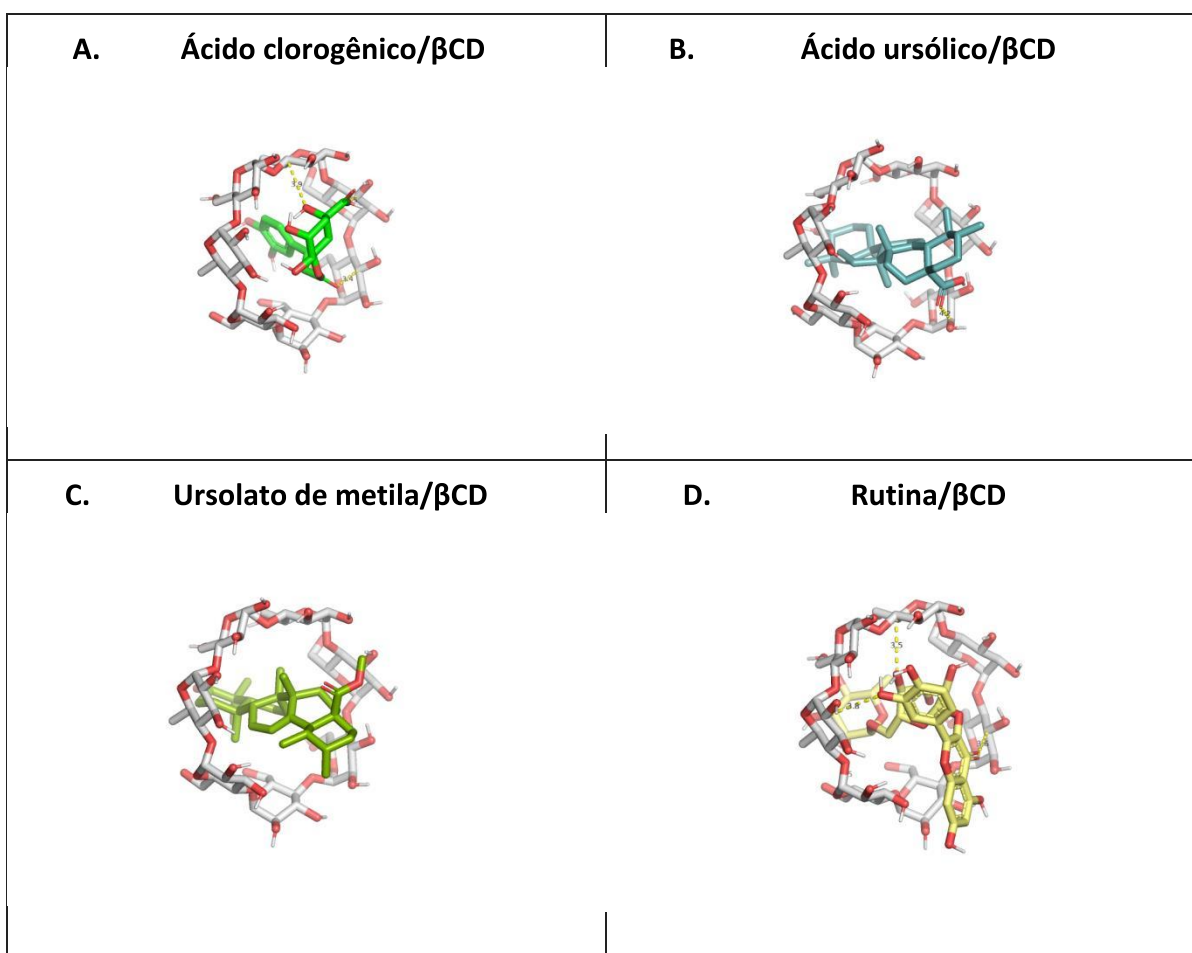
As atividades enzimáticas de MMP-2 e MMP-9 presentes nos sobrenadantes da cultura foram submetidas a eletroforese em géis de poliacrilamida (solução de acrilamida- bisacrilamida a 10% T 30% C 2,7%, gelatina contendo 2 mg/mL) em Tris-glicina (25 mM/192 mM) pH 8,3 contendo dodecilsulfato de sódio (0,1%). As células (8×10^4 células/poço) foram cultivadas em placa de 96 poços. Após 24 h, as células foram expostas a 100 ng/mL de LPS com várias concentrações de β CD, MFM e MFM/ β CD por 48 h. Os sobrenadantes foram coletados e misturados com quantidades iguais de 2 x tampão de amostra SDS contendo 125 mM de Tris-HCl, 4% de SDS, 20% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol na ausência de agente não redutor. Após a migração, os géis foram lavados com Triton X-100 (2%) e incubadas com Tris-HCl, pH 8,2 a 50, contendo 5 mM de CaCl_2 , 1 μM de ZnCl_2 e durante 24 h a 37 °C. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,5% de corante, 30% de metanol, 10% de ácido acético) e descorados (30% de metanol, 10% de ácido acético) (MIURA et al., 1995; SHAPIRO; KELLEY; KOBAYASHI, 2001). A atividade das gelatinases foi evidenciada como regiões brilhantes (branqueadas) no gel. Para medir as intensidades das bandas, foi utilizado o programa TotalLab Quant®.

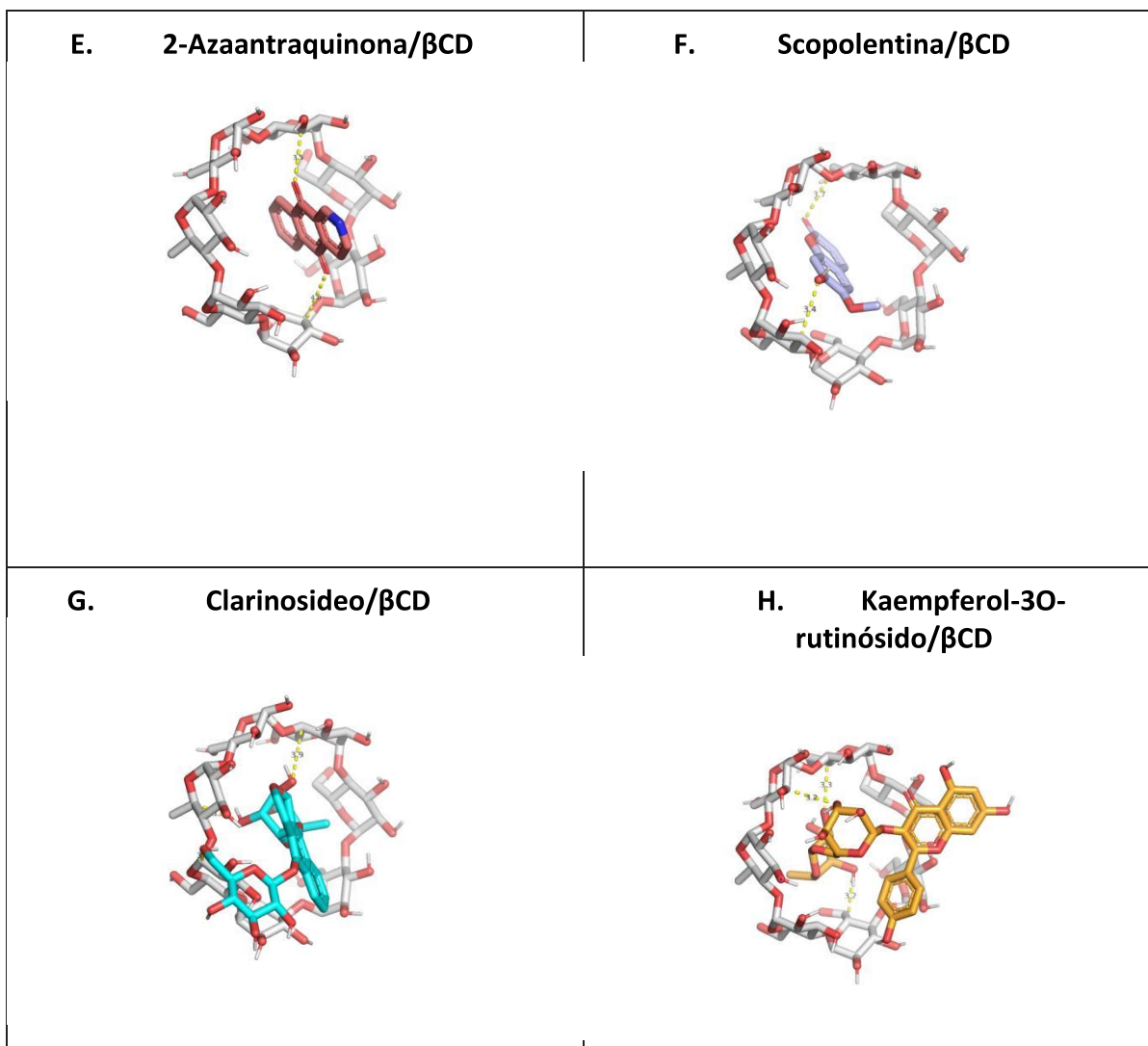
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DOCKING MOLECULAR

Por meio de uma simulação computacional utilizando estruturas tridimensionais, foi possível prever as interações mais prováveis e com maior energia de afinidade entre a ciclodextrina e a molécula hóspede. Apesar de MFM ser um extrato complexo composto por uma variedade de substâncias, simulamos a complexação a partir de compostos já identificados no extrato (Figura 5), e assim, foi realizada a avaliação dos tipos de interação e quais compostos do extrato têm maior Afinidade com a cavidade da β CD.

Figura 5. Docking molecular entre β CD e compostos identificados de MFM.





A análise de *docking* molecular apresentou possíveis formas de interação entre compostos presentes em MFM e a β CD, porém é importante ressaltar que a forma de complexação apresentada foi realizada com os compostos isolados, portanto, não retrata o que de fato ocorre com o extrato, apenas permite visualizar se os compostos interagem com a β CD. Neste sentido, todas as substâncias testadas tiveram uma inclusão parcial ou total com β CD (Tabela 1). Para os compostos com maior tamanho (Rutina, Kaempferol-3O-rutinósido e Clarinósido) o *docking* mostrou inclusão parcial na cavidade β CD, por ligações de hidrogênio, enquanto as demais substâncias realizaram inclusão total por ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Rutina, kampferol-3O-rutinosídeo e ácido ursólico foram as substâncias com maior energia de interação (Kcal/mol) com a BCD (Tabela 1).

Tabela 1. Energia de afinidade (kcal/mol) e possíveis interações entre β CD e compostos identificados de MFM.

Compostos	Energia (kcal/mol)	Interações (ligações de Hidrogênio e interações hidrofóbicas)
Ácido ursólico	-6,5	G4: C=O; HI
Ursolato de metila	-5,5	HI
Escopoletina	-5,2	G3: OH; G7: C=O
Rutina	-7,2	G1: OH; G2: OH; G3: OH; G5: C=O; G7: OH
Psichorubrina	-5,3	G4: C=O; G7: C=O
kaempferol-3O-rutinosideo	-7,0	G1: OH; G5: OH; G7: OH
Clarinosideo	-5,7	G2: OH; G3: OH; G7: OH
Ácido clorogênico	-6,2	G1: OH; G5: C=O; G6: OH; G7: OH
2-Azaantraquinona	-5,1	G4: C=O; G7: C=O

G, Unidade glicosídica, C, Carbono; O, Oxigênio; H, Hidrogênio, HI, Interações hidrofóbicas.

Este estudo mostrou que as moléculas com melhor capacidade de complexação foram o ácido ursólico e os flavonóides rutina e kaempferol-3O-rutinoside. Os dados revelam interações promissoras desses compostos, corroborando dados já descritos na literatura. O ácido ursólico, por exemplo, possui um grupo carbonila que tem a capacidade de se ligar à cavidade β CD (átomo de O no grupo carbonila do ácido ursólico e átomo de H ligando-se ao átomo de C na β CD) através de ligações de hidrogênio intermoleculares e Van der Waals interações (HUANG et al., 2017).

Os flavonóides glicosilados por sua vez, podem ter duas formas de complexação parcial dentro da β CD, uma delas consiste na entrada do núcleo aromático na cavidade, enquanto a outra consiste apenas na entrada dos anéis glicosídicos (PACZKOWSKA et al., 2017). Em nossos estudos observamos que a conformação com melhor estabilidade e energia de afinidade foi aquela em que apenas os anéis glicosídicos realizam a complexação dentro da cavidade, por ligação de hidrogênio (átomo de O nos grupos hidroxila e átomo de H ligando-se ao átomo de C em β CD). Este fato pode ser explicado devido às características

estruturais do açúcar presente na rutina e no kaempferol-3O-rutinosídeo, a raminose de porção glicosídica possui um grupo hidrofóbico (grupo metil) (NEU et al., 1992) que poderia levar à entrada dos anéis glicosídicos dessas substâncias na cavidade interna da ciclodextrina que também possui características hidrofóbicas.

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO FITOCOMPLEXO

A complexação de MFM com a β CD tem o objetivo de melhorar a solubilidade e estabilidade do extrato, a fim de potencializar sua atividade biológica.

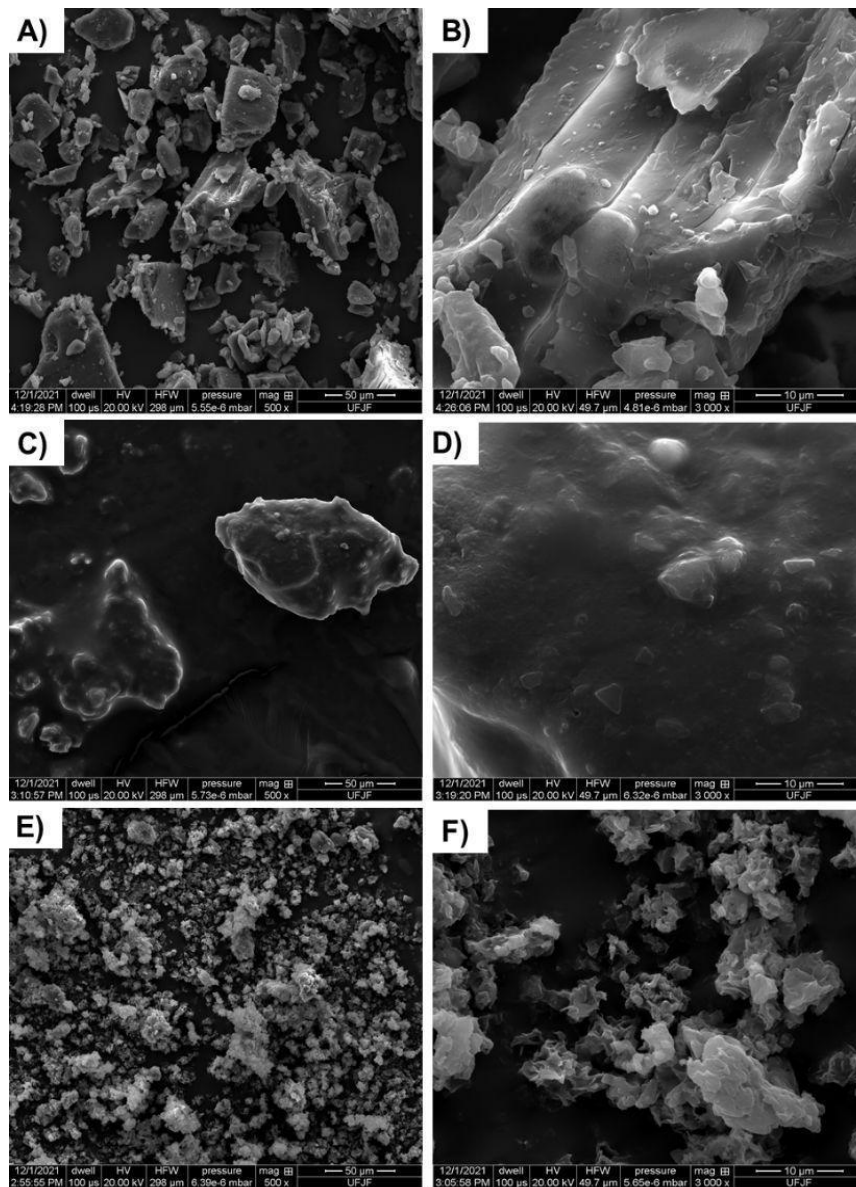
A caracterização das amostras é utilizada para confirmar a formação de complexos supramoleculares, já que os compostos de inclusão sofrem mudanças em suas propriedades físico-químicas ao se complexarem. Este fenômeno ocorre a partir da interação de moléculas ou de sua fração hidrofóbica com a ciclodextrina, por meio de ligações com grupos C-H presentes na cavidade da CD (LOFTSSON et al., 1996; SZETJLI, 1998). Quando esta interação acontece na presença de água esse processo ocorre de maneira mais intensa, pois ao mesmo tempo em que moléculas hidrofóbicas se ligam à cavidade interior das CDs, moléculas de água são eliminadas desse ambiente gerando contribuições entálpicas e entrópicas, já que a água presente na cavidade da CD, ao ser liberada em meio aquoso, tendem a formar ligações de hidrogênio estáveis, e isso gera valores exotérmicos de entalpia ($\Delta H < 0$), ao passo que as moléculas passam a ter liberdade conformacional e translacional, aumentando dessa forma a entropia. Com isso, a formação de nanoprecipitados hidrofóbicos ocorre espontaneamente (BREWSTER; LOFTSSON, 2007; DENADAI et al., 2007).

5.2.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia de superfície das amostras foi observada através de MEV. A partir da figura 6 é possível observar as amostras β CD, MF e fitocomplexos em diferentes aumentos. A imagem da β CD apresentou diferentes tamanhos de cristais com pequenas partículas aderidas à superfície. Tal morfologia já é bem descrita na literatura (WANG et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2015). Já as imagens do complexo de inclusão e da mistura física sofreram algumas mudanças. Em relação à MF, pode-se observar que as bordas das partículas apresentaram-se mais

arredondadas e irregulares. Quanto ao fitocomplexo, são observadas mudanças muito mais acentuadas na morfologia das partículas, que se apresentaram em aglomerados homogêneos e em tamanho visivelmente menor. Essas alterações na morfologia das estruturas para o fitocomplexo são uma forte evidência da formação de complexo de inclusão. Um estudo realizado com o complexo de inclusão do óleo essencial de *Lippia graveolens* Kunth. com β CD, utilizando o método de coprecipitação, apresentou resultados similares (BARBIERI et al., 2018).

Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura nos aumentos de 500x e 3000x. (A e B) - β CD (C e D) - MF (E e F) - MFM/ β CD

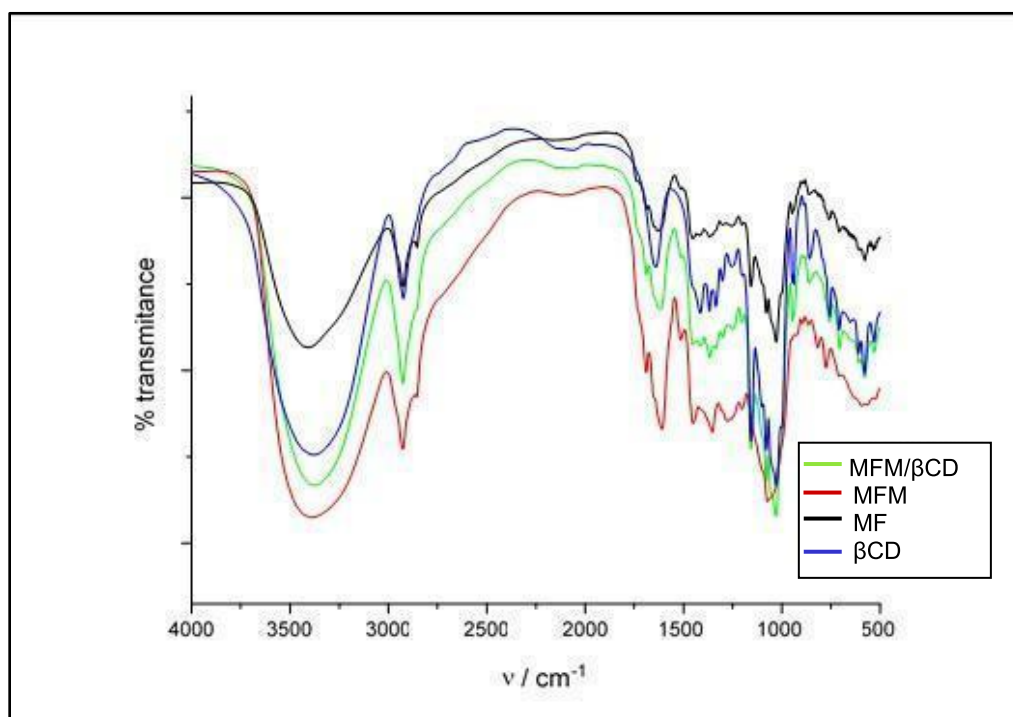


5.2.2 Caracterização espectroscópica de inclusão do fitocomplexo por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

O objetivo da espectroscopia de absorção no IV é determinar os principais grupos funcionais presentes em um material. Os grupos funcionais absorvem em diferentes frequências características de radiação na região do IV, dessa forma é possível identificá-los a partir de um padrão ou material desconhecido analisando o espectro obtido. Assim é possível determinar se houve complexação entre a molécula hóspede e a β CD a partir das bandas desta molécula, que ao se complexar podem se deslocar ou sofrerem alterações na intensidade (ZANG et al., 2009).

Os espectros de FTIR de MFM, β CD, MFM/ β CD e MF (Figura 7) foram usados para confirmar a formação do complexo supramolecular no estado sólido. As bandas de β CD estão de acordo com aquelas previamente descritas na literatura (Egyed, 1990). Com absorções principais em 3391, 2929, 1157, 1179, 1022 e 941 cm^{-1} , que correspondem ao alongamento simétrico e antissimétrico de $\nu[\text{OH}]$, $\nu[\text{CH}_2]$, $\nu[\text{C}-\text{C}]$, vibração de flexão de $\nu[\text{O}-\text{H}]$, e a vibração esquelética envolvendo (ligação α -1,4).

Figura 7. Espectros no infravermelho por transformada de *fourier* das amostras MFM, MFM/ β CD, MF e β CD.



O espectro MFM apresentou uma banda forte e larga a 3371 cm^{-1} atribuída aos grupos N-H e O-H, como as ligações de hidrogênio dos compostos fenólicos. Uma banda baixa e larga foi encontrada em 2105 cm^{-1} , que foi atribuída como um pico característico de grupamento isotiocianato. Outras bandas de absorção principais foram encontradas em comprimentos de onda (cm^{-1}) de 2924 (CH de alifáticos), 2855 (CH de aldeído), 1697 (C=O de amidas), 1608 (C = C de aromáticos), 1513 (deformação angular de NH), 1443 (CH₂ alifático), 1354 (C=O de ácidos carboxílicos), 1074 (C=O de fenóis), 817 (deformação fora do plano de C= de alcenos) e 778 (deformação fora do plano de C=C de aromáticos) (SILVERSTEIN, 1991).

Na análise dos espectros MFM/ β CD e da mistura física, algumas peculiaridades podem ser observadas. As bandas 1688, 1608 e 1443, características de MFM, foram atenuadas nas duas misturas (MFM/ β CD e mistura física). A banda 3379, característica do MFM, foi atenuada apenas na mistura física, no MFM/ β CD a banda sofreu estreitamento ou afinamento. As bandas 2924 e 1074, referentes a MFM, em MFM/ β CD foram sobrepostas por bandas características de β CD distantes, ao contrário da mistura física, em que as duas bandas ficaram mais evidentes. Uma banda 1354, referente a um MFM, sofreu deslocamento (1373) em MFM/ β CD. Na mistura física o pico foi atenuado. As bandas 817 e 778, referentes a MFM, praticamente desapareceram em MFM/ β CD, prevalecendo apenas os picos referentes a β CD nesta região do espectro. A mistura física, em geral, apresentou maior semelhança com o espectro MFM e atenuou os picos referentes a um β CD nesta região.

A alteração de energia dos modos vibracionais pode causar o deslocamento de bandas, e as variações de intensidade dessas bandas sugerem uma mudança no momento dipolo das ligações, característico de interações intermoleculares (OLIVEIRA, 2011; PAULA, 2020). Neste sentido, as alterações no deslocamento e na intensidade de algumas bandas apresentadas, sugerem a existência de interações intermoleculares entre os compostos presentes no extrato e a ciclodextrina, dando indícios de possível complexação. Análises do espectro da mistura mecânica demonstraram que as interações entre as amostras em contato na fase sólida foram menos intensas.

Em um estudo realizado com o complexo de inclusão formado entre polifenóis e HP- β CD, obteve-se algumas alterações de bandas similares ao observado neste

trabalho, principalmente em bandas referentes a grupos O-H (LI et al., 2019), corroborando a hipótese de que este grupo funcional pode estar formando as principais interações entre os polifenóis do extrato e a β CD.

Outro estudo, que caracterizou as interações entre triterpenóides e β CD também observou alterações em bandas similares às visualizadas neste trabalho, sugerindo a interação de grupos C-O, característicos de terpenos, com a β CD (SARUTA et al., 2010). Além disso, Fengzhu et al. (2012) demonstrou que bandas características de C=C do ácido ursólico interagiu com a β CD, o que também foi observado neste trabalho.

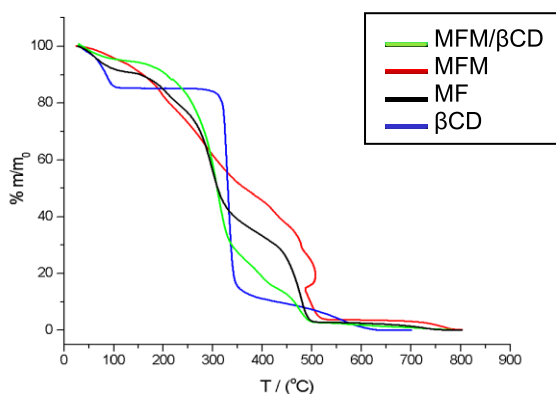
5.2.3 Experimentos por análises térmicas (TGA e DTA)

Para avaliar a estabilidade térmica dos compostos, foi usada análise termogravimétrica (TGA) e análise térmica diferencial (DTA).

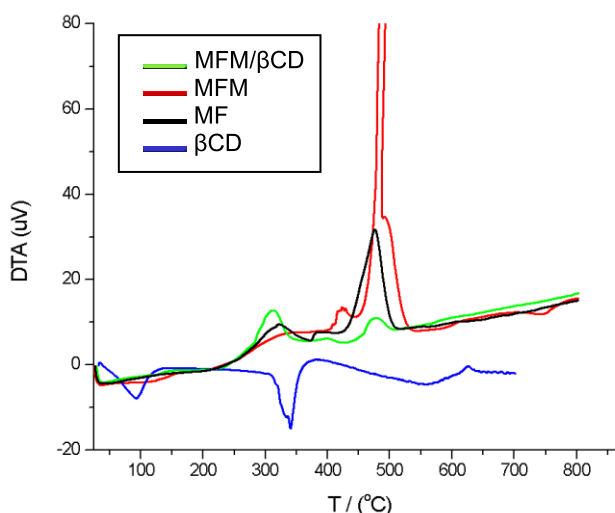
A curva TGA (Figura 8) para β CD mostra uma perda de massa de 16% na faixa de 70-115 °C, correspondendo à liberação de aproximadamente doze moléculas de água. Na curva DTA, um pico endotérmico iniciado a ≈ 70 °C com máxima a 95 °C, confirma a desidratação. Após este evento, uma estabilidade térmica de até ≈ 280 °C em ambos TGA e DTA foi observada, quando a decomposição de β CD se inicia. Estes dados corroboram a estabilidade térmica já descrita para β CD (KOHATA et al., 1993).

Figura 8. A) TGA e B) DTA. Curvas das amostras MFM, MFM/ β CD, β CD e MF.

A.



B.



A curva TGA de MFM mostrou uma perda de massa complexa e contínua desde o início do aquecimento. Esse comportamento foi atribuído à perda de compostos voláteis. Imediatamente após esta primeira temperatura de decomposição, o MFM sofre outra perda de massa até sua calcinação completa por volta de 500 °C.

Para o composto de inclusão supramolecular, o perfil térmico é diferente do observado para precursores puros e mistura mecânica, como resultado das interações no estado sólido. Na curva TGA pode-se observar que a amostra de MFM/βCD perdeu 5% de sua massa até 109 °C, sendo esse fenômeno atribuído à liberação de água remanescente ou compostos voláteis, como óleos essenciais. A curva DTA também mostra que tanto o MFM quanto o βCD tiveram suas fusões suprimidas, como resultado das interações intermoleculares. Além disso, acima da temperatura de 109 °C, a perda de massa torna-se mais intensa para o MFM, enquanto para o sistema MFM/βCD, as decomposições se iniciam em uma temperatura mais elevada. Para o sistema MFM/βCD, a maior perda de massa é inicializada a 170 °C, diferente de MFM e MF.

As alterações nas curvas de TGA e DTA para o fitocomplexo sugerem interação intermolecular entre MFM e βCD. Além disso, foi possível observar que a inclusão melhorou a estabilidade térmica do material, suprimindo a fusão do extrato e da βCD, e também aumentando a temperatura de decomposição para o fitocomplexo. Um estudo realizado com o extrato de *Bryophyllum pinnatum* (Lam.)

incorporado a β CD apresentou resultados semelhantes, sugerindo que a complexação com a β CD aumentou a estabilidade térmica do extrato (LANNA et al., 2016).

5.3 CARACTERIZAÇÃO COLOIDAL DE MFM E MFM/ β CD

Medidas de potencial zeta, condutividade elétrica e diâmetro hidrodinâmico (por espalhamento de luz dinâmico) permitem identificar a formação de nanoprecipitados hidrofóbicos (NPH) quando uma solução dos compostos dissolvidos em solvente orgânico é inserida em água. Além disso, esses experimentos permitem analisar o efeito da ciclodextrina na estabilização dos NPHs em suspensão.

5.3.1 Potencial Zeta

O potencial zeta (PZ) é fundamental para analisar a estabilidade de nanopartículas em suspensão. Esse parâmetro avalia as forças eletrostáticas entre as cargas das nanopartículas dispersas no ambiente coloidal. Dessa forma, quanto maior a repulsão entre as partículas, melhor estabilidade e dispersão da fórmula, já que a força de repulsão entre elas previne a coalescência das mesmas. De maneira geral, suspensões que apresentam valores de PZ superiores a +30 mV ou inferiores a -30 mV são estáveis, ou seja, os valores entre -30 mV e +30 mV são relacionados a formulações instáveis e com tendência a sofrer floculação e separação de fases por sedimentação (FERNÁNDEZ-NIEVES et al., 1999; NETALA et al., 2018).

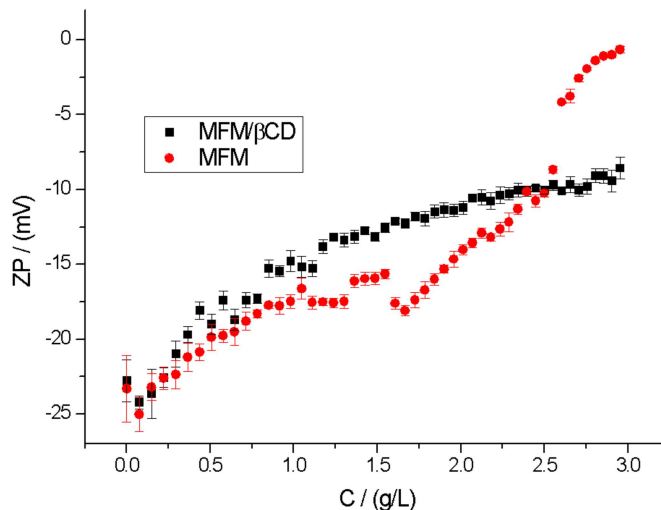
A figura 9 apresenta a titulação com medidas de potencial zeta das soluções de MFM a 20 mg/mL e MFM/ β CD a 40 mg/mL, ambos em DMSO, em água tipo 1 (Milli-Q⁺). Como observado, os nanoprecipitados hidrofóbicos formados pela adição da solução DMSO em água apresentam valores negativos de PZ em toda a faixa de concentração. Esses valores estão de acordo com a presença de espécies ácidas nas amostras. É importante ressaltar que em regime diluído, os ácidos fracos apresentam alto grau de ionização. Os valores negativos em baixas concentrações sugerem estabilização coloidal de MFM ou MFM/ β CD em um ambiente aquoso.

No entanto, à medida que a concentração aumenta, os valores de PZ tornam-se menos negativos. Este fenômeno deve-se ao menor grau de ionização dos ácidos

fracos presentes nas amostras na presença de concentrações crescentes de DMSO no ambiente. A Figura também mostra que a titulação PZ para o sistema MFM/ β CD se comporta melhor do que a titulação PZ para o sistema MFM. As variações observadas para o sistema MFM/ β CD podem ser atribuídas a destruição de agregados após titulação acima de 1,5 mg/mL, seguida de precipitação. Esses dados corroboram a hipótese de que a complexação de MFM com β CD torna os conjuntos mais coesos, devido à formação de ligações de hidrogênio entre os compostos de inclusão dentro das nanoestruturas.

Os dados mostram que acima da concentração próxima de 2,5 g/L, os valores de PZ tendem a zero, sugerindo que os NPHs de extrato puro tem baixa estabilidade coloidal acima desta concentração. Por outro lado, os NPHs formados por MFM/ β CD tem um comportamento bem mais homogêneo durante a titulação, sem qualquer quebra na curva que sugira precipitação.

Figura 9. PZ de MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.

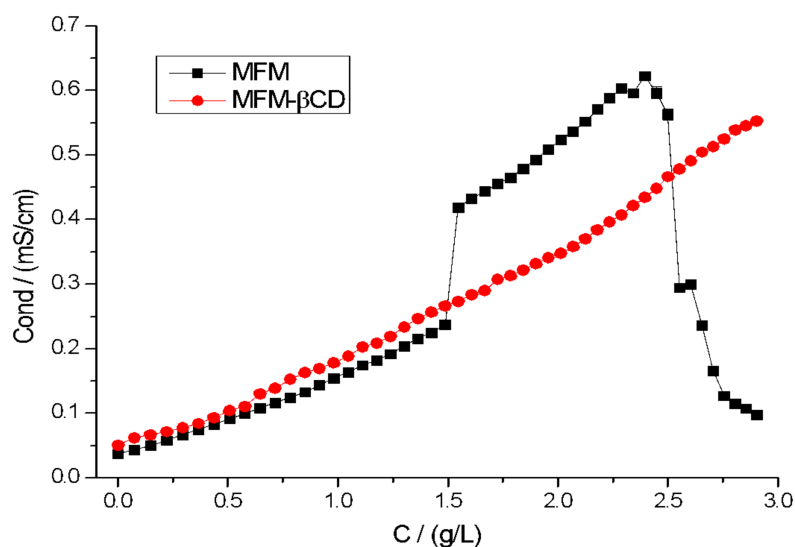


5.3.2 Condutividade elétrica

Esse parâmetro é utilizado para medir a capacidade das suspensões de nanoprecipitados hidrofóbicos conduzirem corrente elétrica em função da presença de íons dissolvidos ou liberados no meio, quando os nanoprecipitados são formados (LANNA et al., 2016).

A figura 10 mostra a titulação de condutividade elétrica de MFM a 20 mg/mL e MFM/ β CD a 40 mg/mL (mesma quantidade nominal de MFM) em água. Conforme observado nas curvas de titulação, ocorre um aumento da condutividade, que é atribuído ao aumento da concentração de espécies iônicas dissolvidas no solvente. Essas espécies podem ser ácidos fracos, como kaempferol-3 O-rutinósido, rutina, ácido ursólico e escopoletina identificados em MFM (FABRI et al., 2014a, 2014b). No entanto, acima de 1,5 mg/mL, a curva de titulação de MFM sofre uma quebra grosseira com PZ tendendo a zero, sugerindo separação de fases acima desta concentração. A partir da curva de titulação MFM/ β CD, o aumento da condutividade manteve um comportamento muito mais suave dentro da faixa de concentração analisada. Estes resultados podem ser justificados pela precipitação de MFM puro nas mesmas concentrações observadas na titulação por PZ. Além disso, a ausência de inflexões ou quebras na curva de titulação sugere que os NPHs de MFM/ β CD, embora sofram ionização (já que a condutividade elétrica aumenta com a concentração), apresentam maior estabilidade coloidal.

Figura 10. Condutividade elétrica de MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.



5.3.3 Diâmetro hidrodinâmico por DLS – D_h

A técnica de espalhamento de luz tem o objetivo de determinar o tamanho médio das nanopartículas suspensas. É possível realizar a determinação através de

um feixe de luz monocromático com intensidade de luz espalhada, medida a um ângulo de 90°. Dessa forma é possível observar a variação de tamanho de acordo com o movimento dessas partículas, as maiores se movimentam mais lentamente, já as menores se movimentam mais rapidamente e cruzam a janela do detector mais vezes dentro de um mesmo intervalo de tempo (MALVERN, 2005; MURDOCK et al., 2008). As flutuações de intensidade resultantes são utilizadas para calcular o diâmetro hidrodinâmico (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 (Equação 6) (DENADAI, 2005):

Equação 6:

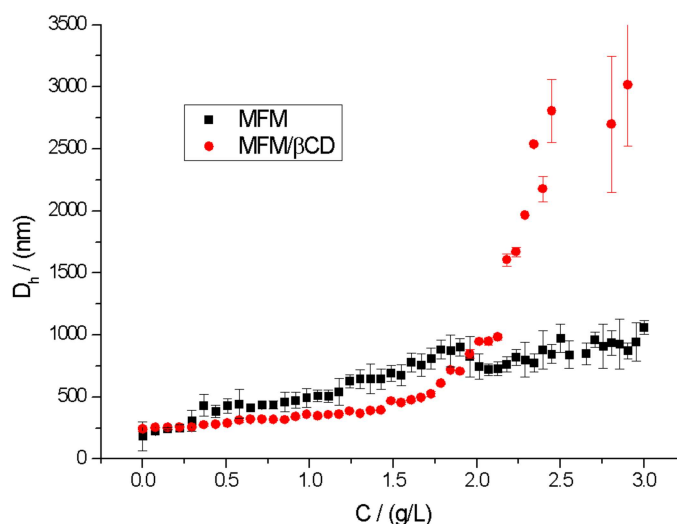
$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta\langle D_h \rangle}$$

Onde, D é o coeficiente de difusão, k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, $6\pi\eta$ é a viscosidade dinâmica do meio, D_h é o diâmetro hidrodinâmico médio.

A figura 11 mostra as titulações D_h , medidas por DLS através da titulação de uma solução DMSO de MFM a 20 mg/mL, e solução DMSO de MFM/ β CD a 40 mg/mL em 1,5 mL de água, a fim de mensurar a mesma concentração nominal de extrato nas duas titulações. Foi possível observar que o tamanho aumentou linearmente até 1,5 mg/mL para as duas amostras. Porém, para MFM, após essa concentração, um aumento irregular e quase exponencial de D_h foi observado, enquanto para MFM/ β CD o aumento foi mantido próximo da linearidade.

A partir dos resultados de potencial zeta, condutividade elétrica e diâmetro hidrodinâmico, observou-se que acima da concentração de 1,5 MFM inicia sua precipitação. Neste sentido, as espécies presentes no extrato possivelmente formam aglomerados, o que leva a perda de condutividade elétrica e aumento de tamanho das partículas, levando conseqüentemente a coalescência do sistema coloidal, que perde sua estabilidade. Por outro lado, MFM/ β CD mantém sua estabilidade em solução, não apresentando precipitação nessa faixa de concentração. Esse efeito foi atribuído à força de solvatação exercida pela β CD, que aumentou a estabilidade coloidal das nanoestruturas (LANNA et al., 2016).

Figura 11. Titulação DLS das amostras MFM 20 g/L e MFM/ β CD 40 g/L em água a 25 °C.



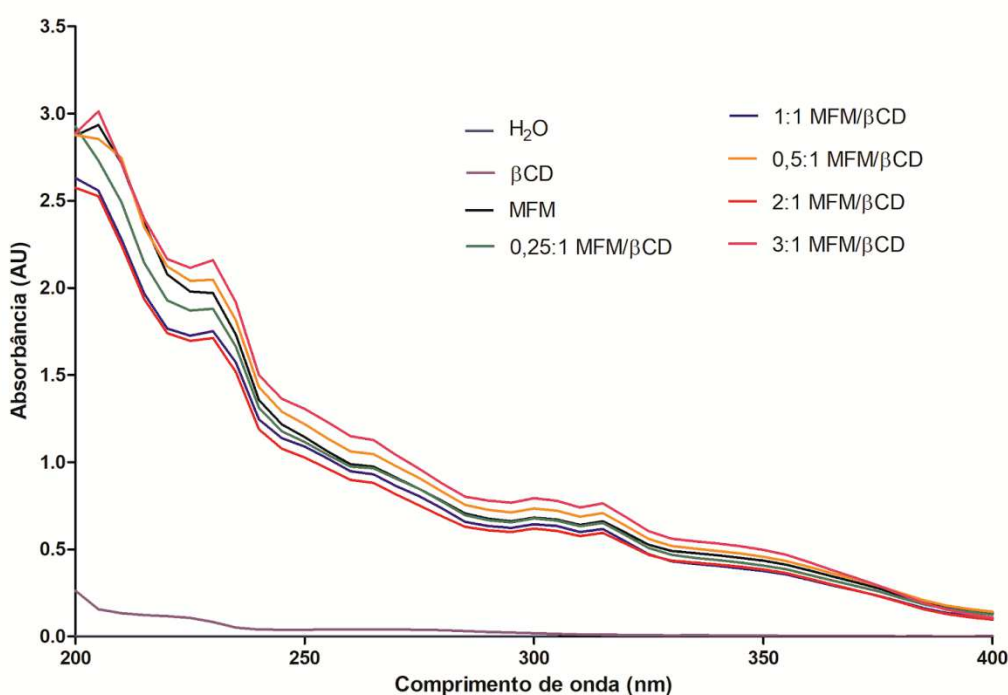
5.4 ENSAIO DE SOLUBILIDADE

A solubilidade de fases é utilizada para avaliar o efeito de um composto na solubilidade de outro. Neste sentido, o método foi utilizado para avaliar o possível aumento da solubilidade do extrato em meio aquoso após complexação, além de prever as concentrações de β CD ideais para promover tal melhoria. Porém, o extrato metanólico de *M. frigidus* é uma matriz complexa, que consiste em um conjunto de compostos atuando de forma sinérgica, e por isso, o diagrama de solubilidade de fases não pode ser realizado pelo método usual (HIGUCHI; CONNORS, 1965).

A varredura realizada por meio de espectrofotometria em UV-vis demonstrou semelhança entre MFM e seus fitocomplexos em todas as concentrações testadas (Figura 12). Comparar a disponibilidade dos principais compostos por meio dos espectros de varredura é um desafio, devido à complexidade da composição do extrato (FABRI et al., 2009, 2012a, 2014b; LEMOS et al., 2020). Ao analisar a faixa de absorção dos compostos de interesse, não foi observado alterações características, já que a grande maioria de compostos fenólicos presentes no extrato são glicosilados, e possivelmente, hidrossolúveis (FABRI et al., 2009). Além disso, os

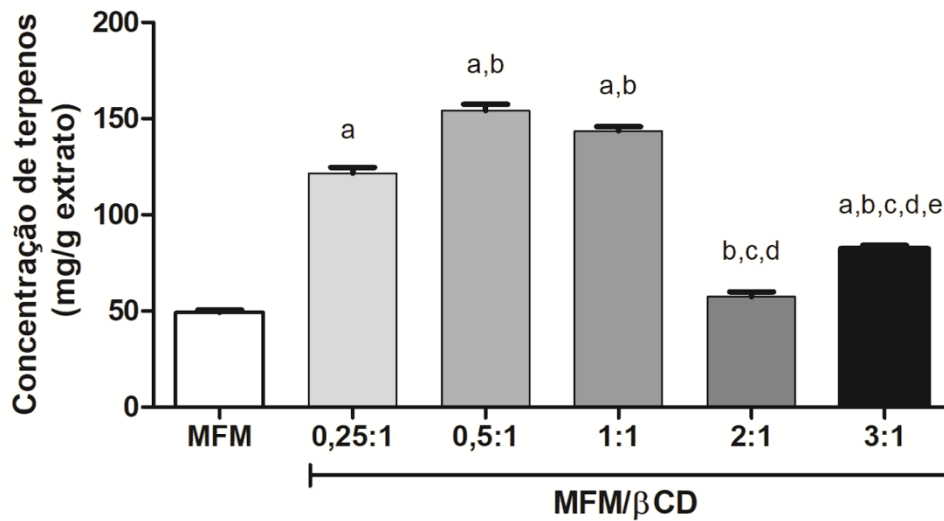
terpenos não apresentam grupo cromóforo, e portanto, sua faixa de absorção é próxima da β CD e de outros possíveis compostos presentes no extrato, o que dificulta a interpretação dos resultados (EMILIA et al., 2018).

Figura 12. Varredura espectrofotométrica em UV-vis das soluções aquosas filtradas de MFM e dos fitocomplexos supramoleculares nas proporções de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM.



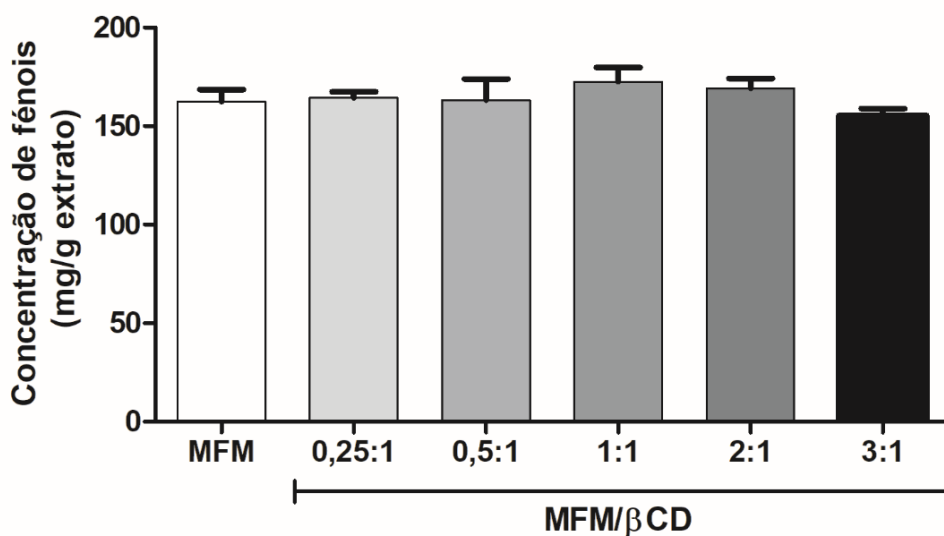
A análise da solubilidade foi efetuada por meio do doseamento dos compostos de interesse. Neste sentido, foi realizada a análise dos teores de terpenos e compostos fenólicos. A figura 13 mostra que o teor de terpenos foi significativamente diferente entre o extrato e os fitocomplexos nas razões mássicas de 0.25:1; 0.5:1; 1:1; e 3:1, sendo que, as razões mássicas 0.5:1 e 1:1 apresentaram a maior disponibilidade deste composto e não apresentaram diferença significativa entre si. Já para o doseamento de compostos fenólicos, não foi observado diferença significativa entre o extrato e os fitocomplexos (Figura 14).

Figura 13. Teor de terpenos das soluções aquosas filtradas do extrato e fitocomplexos supramoleculares nas concentrações de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM



^a Diferença estatística em relação à MFM; ^b Diferença estatística em relação à 0,25:1; ^c Diferença estatística em relação à 0,5:1; ^d Diferença estatística em relação à 1:1; ^e Diferença estatística em relação à 2:1 (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$).

Figura 14. Teor de fenóis das soluções aquosas filtradas do extrato e fitocomplexos supramoleculares nas concentrações de 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:01 e 3:1 de β CD/MFM.



Não houve diferença estatística entre as amostras testadas (ANOVA seguida de Bonferroni, $p > 0,05$).

Na figura 13, a maior disponibilidade dos terpenos em β CD/MFM pode ser justificada pela complexação destes compostos com a ciclodextrina, que promove aumento da solubilidade aquosa de moléculas de baixa polaridade. A menor concentração de terpenos nas amostras 2:1 e 3:1 β CD/MFM, pode ser atribuída a limitação de solubilidade da β CD, que sofre uma queda quando em concentrações molares acima de 2:1 mmol β CD/molécula-hóspede (KIM et al., 2019). Os compostos fenólicos presentes em MFM são principalmente glicosilados, portanto, hidrossolúveis (FABRI et al., 2009), o que justifica a manutenção da concentração de polifenóis nos fitocomplexos.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FITOCOMPLEXO

5.5.1 Avaliação da atividade antioxidante

O estresse oxidativo pode causar sérios prejuízos ao organismo, podendo oxidar biomoléculas e ocasionar a modificação e inativação destas, levando a diversas situações patológicas, bem como ao envelhecimento. Dentre as doenças relacionadas a esta condição estão: alguns tipos de câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas, diabetes mellitus, cardiopatias, dentre outras (BAGHIANI et al., 2011; SOSA et al., 2013). O uso de antioxidantes exógenos presentes principalmente em frutas e vegetais, têm a capacidade de suprir a necessidade de neutralizar o excesso de radicais livres em situações em que a produção dessas espécies é exagerada (SEN et al., 2010; LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA et al., 2013).

O DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) é um radical que apresenta elevada estabilidade, sua coloração violeta intensa é conferida pela conjugação de elétrons desemparelhados por toda a molécula (ARNAO, 2000). Quando o DPPH sofre redução pela ação de moléculas doadoras de hidrogênio, ocorre o fenômeno de emparelhamento de seus elétrons, o que altera a coloração do cromóforo inibindo sua absorvidade (BRAND-WILLIAMS, 1995).

No ensaio de DPPH• foi determinada a concentração inibitória de 50 % (CI_{50}) em μ g/mL, onde é determinada a menor concentração da amostra capaz de reduzir em 50% o potencial oxidante do DPPH, dessa forma, quanto menor a concentração necessária para reduzir 50% da ação deste radical, melhor é considerado o potencial da amostra em neutralizar radicais livres (BRAND-WILLIAMS, 1995).

A atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH, para MFM e MFM/ β CD é demonstrada na tabela 2. Nesse ensaio, MFM/ β CD e MFM foram significativamente diferentes. MFM/ β CD foi mais eficiente que o extrato em neutralizar o radical, com CI_{50} de $4,5 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, enquanto MFM obteve CI_{50} de $6,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$. β CD não apresentou atividade antioxidante nas concentrações testadas ($CI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$) e a rutina foi significativamente diferente de MFM/ β CD e MFM, com CI_{50} de $2,3 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$.

Estes resultados podem ser atribuídos a alterações na capacidade de doação do átomo de hidrogênio, devido ao processo de complexação. Quando os compostos de extrato, como flavonoides, são complexados com β CD, uma ou mais ligações de hidrogênio podem ser formadas entre os átomos de hidrogênio das hidroxilas fenólicas e os átomos de oxigênio presentes no interior da cavidade hidrofóbica de β CD. Essas novas ligações enfraqueceram as ligações covalentes entre o hidrogênio e o oxigênio das hidroxilas fenólicas e conseqüentemente, suportam a doação de hidrogênio por este grupo. Além disso, o possível aumento da biodisponibilidade dos compostos na presença de β CD favorece a interação entre os constituintes antioxidantes e o radical DPPH (LANNA et al., 2016).

O potencial de inibição da peroxidação lipídica foi avaliado pelo método de co-oxidação do complexo β -caroteno/ácido linoleico. Esse método é baseado na despigmentação do complexo, que ocorre a partir da oxidação lipídica do ácido linoleico, formando estruturas radicalares que atacam as duplas ligações do β -caroteno, este perde seu cromóforo resultando na sua descoloração. A adição de antioxidantes bloqueia a oxidação do ácido linoleico, e com isso, inibe a formação de radicais livres durante esse processo, preservando a coloração do β -caroteno (ALVES et al., 2010; SUCUPIRA et al., 2012).

Neste sentido, a atividade antioxidante de MFM e MFM/ β CD foi mensurada por meio de: I) cálculo de porcentagem de inibição, que neste caso, quanto maior a porcentagem, melhor e a capacidade antioxidante da amostra, e II) cálculo da eficiência antioxidante ($F1$ e $F2$), onde $F1$ é a capacidade da amostra de bloquear a formação de peróxidos entre 15 e 45 min após o início da reação e $F2$ a capacidade da amostra de inibir outras reações durante o processo oxidativo, que ocorre entre 75 e 90 min após início da reação. Para que o desempenho antioxidante seja satisfatório, os valores de $F1$ e $F2$ devem ser menores que 1 e próximos de 0 (NASCIMENTO et al, 2010).

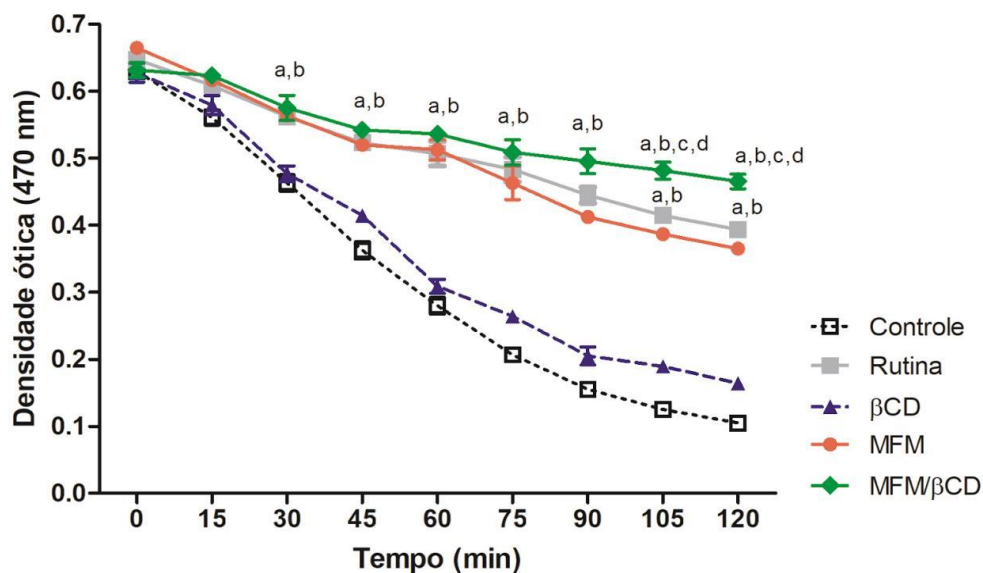
Na tabela 2 é possível observar que todas as amostras, exceto β CD, foram capazes de inibir a oxidação do complexo β -caroteno/ácido linoleico na concentração de 38,46 μ g/mL, sendo que o fitocomplexo (MFM/ β CD) apresentou maior porcentagem de inibição (58.1 ± 0.2) que MFM (45.2 ± 0.8) e a rutina (controle positivo) (52.2 ± 0.9). Além disso, ao analisar F1 e F2, nota-se que o extrato, o fitocomplexo e a rutina mantiveram suas atividades durante todo o teste, com destaque a MFM/ β CD e rutina, que na primeira fase não apresentaram diferença significativa e foram melhores que MFM na fase inicial do processo, onde a ação se dá pelo bloqueio de radicais livres. Já na segunda fase, MFM e MFM/ β CD foram significativamente melhores que a rutina e não apresentaram diferença estatística entre si.

Tabela 2. Atividade antioxidante pelos ensaios de inibição do radical DPPH e inibição do sistema β -caroteno/ácido linoleico para as amostras MFM, MFM/ β CD e rutina.

Amostras	DPPH - CI_{50} (μ g/mL)	β -caroteno/ácido linoleico (38,46 μ g/mL)		
		Inibição (%)	F1	F2
MFM	$6,1 \pm 0,1^{a,b,c}$	$45,2 \pm 0,8^{a,b,c}$	$0,67 \pm 0,01^{a,b,c}$	$0,68 \pm 0,03^{b,c}$
MFM/βCD	$4,5 \pm 0,2^{b,c}$	$58,1 \pm 0,2^b$	$0,3 \pm 0,001^b$	$0,6 \pm 0,05^{b,c}$
βCD	> 250	$2,0 \pm 0,001$	$1,3 \pm 0,04$	$0,97 \pm 0,02$
Rutina	$0,4 \pm 0,01$	$52,2 \pm 0,9$	$0,4 \pm 0,01$	$0,9 \pm 0,02$

^a Estatisticamente diferente de MFM/ β CD. ^b Estatisticamente diferente de β CD. ^c Estatisticamente diferente da rutina (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$). Todas as experiências foram realizadas em triplicata e os dados representam a média \pm DP.

Figura 15. Curva de oxidação na presença de veículo (controle), rutina, β CD, MFM e MFM/ β CD.



^a diferença estatística em relação ao controle; ^b diferença estatística em relação à β CD; ^c diferença com MFM; ^d diferença estatística em relação à rutina (ANOVA seguida por Bonferroni $p < 0,05$).

Por meio da curva de decaimento da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (Figura 15), foi possível observar que MFM e rutina tiveram o mesmo perfil de decomposição do sistema ao longo dos 120 minutos. Este fato pode ser explicado pela semelhança estrutural dos compostos fenólicos em MFM com a rutina. Além disso, o perfil cinético de MFM/ β CD teve sua curva mais atenuada do que as demais amostras, sendo possível observar uma constante entre 45 e 120 min de teste.

Com o objetivo de melhor quantificar o efeito dos compostos na velocidade de oxidação do β -caroteno, os dados foram modelados segundo equação exponencial de primeira ordem (Equação 6, forma diferencial e Equação 7, forma integrada):

Equação 6:

$$\frac{dA_{bs}}{dt} = k_{ox}A_{bs}$$

Equação 7:

$$A_{bs(t)} = A_{bs(t=0)}e^{-k_{ox}t}$$

Onde A_{bs} é absorvância (proporcional à concentração de b-caroteno no meio). A quantidade dA_{bs}/dt é a taxa (velocidade) de redução da concentração de b-caroteno, que depende da concentração instantânea de b-caroteno presente no meio, num determinado tempo. $A_{bs(t)}$ é a absorvância em um tempo t qualquer, $A_{bs(t=0)}$ é a absorvância no tempo $t = 0$ e k_{ox} é a constante cinética de oxidação do b-caroteno.

Como pode ser observado na Figura 15, o perfil cinético de decomposição na presença de MFM/ β CD foi mais atenuado do que o controle e os demais compostos. Quando analisamos os valores da constante cinética de decomposição (k_{ox}), temos que o sistema MFM/ β CD foi o que menor constante de oxidação. A ordem decrescente de velocidade é:

Controle ($0,015 \text{ s}^{-1}$) > β CD ($0,0112 \text{ s}^{-1}$) > MFM ($0,0052 \text{ s}^{-1}$) > Rutina ($0,0042 \text{ s}^{-1}$) > MFM/ β CD ($0,00275 \text{ s}^{-1}$).

Esses dados mostram que além de apresentar maior inibição, o fitocomplexo MFM/ β CD é o que apresenta maior efeito no decorrer do tempo, demonstrando que a presença de β CD confere estabilidade ao extrato e potencializa o efeito antioxidante. Considerando que o processo de oxidação do β -caroteno ocorre na interface água/óleo, acredita-se que o complexo MFM/ β CD, por apresentar maior solubilidade aquosa, tenha proporcionado uma maior disponibilidade para se oxidar seletivamente em relação ao β -caroteno.

Durante o processo de peroxidação lipídica, os radicais livres produzidos levam 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.

A porcentagem de inibição da formação de MDA é demonstrada na tabela 3, onde o extrato e o fitocomplexo apresentaram potencial de inibição significativo a partir do segundo dia de tratamento ($p < 0,05$), enquanto β CD não foi capaz de inibir a formação de MDA nos dias testados. No dia zero, não houve diferença estatística entre as amostras testadas e o controle negativo.

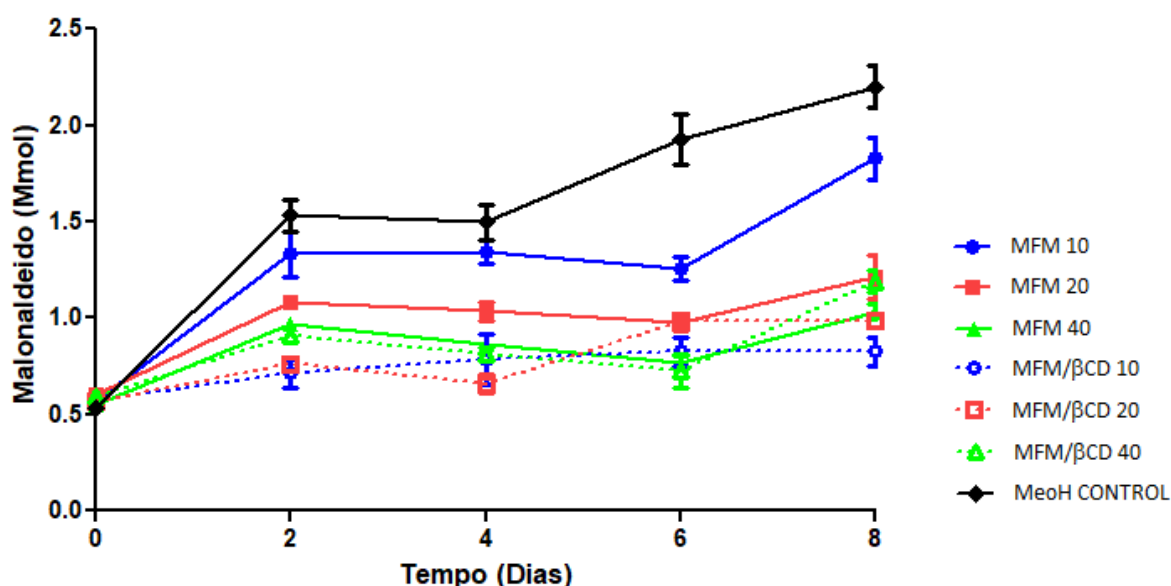
Tabela 3. Atividade antioxidante pela redução da produção de malondialdeído na presença de MFM, MFM/ β CD e rutina.

Amostras	Concentrações nominais de extrato ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de MDA (mmol/L)				
		Dia 0	Dia 2	Dia 4	Dia 6	Dia 8
Rutina	10	0,74 \pm 0,09	0,97 \pm 0,09 ^b	1,17 \pm 0,4 _{a,b}	1,06 \pm 0,08 ^{a,b}	1,03 \pm 0,16 _{a,b}
	20	0,65 \pm 0,12	0,88 \pm 0,1	1,06 \pm 0,15	0,88 \pm 0,1	0,96 \pm 0,09
	40	0,6 \pm 0,07	0,81 \pm 0,02 ^{a,b}	0,99 \pm 0,2	0,88 \pm 0,15 ^{a,b}	0,9 \pm 0,1 ^{a,b}
MFM	10	0,57 \pm 0,02	1,33 \pm 0,23 ^{c,d,e}	1,34 \pm 0,1 ^b	1,25 \pm 0,1 _{a,b,d,e}	1,58 \pm 0,43 _{a,b,c,d,e}
	20	0,6 \pm 0,04	1,08 \pm 0,07	1,03 \pm 0,1	0,97 \pm 0,1	1,21 \pm 0,27
	40	0,55 \pm 0,01	0,97 \pm 0,01	0,85 \pm 0,06 ^{a,b}	0,76 \pm 0,08 _{a,b,c,f}	1,03 \pm 0,08 _{a,b,f}
MFM/ β CD	10	0,57 \pm 0,01	0,71 \pm 0,18 _{a,b,f,g}	0,78 \pm 0,2 _{a,b,c}	0,8 \pm 0,14 ^{a,b,f}	0,82 \pm 0,1 _{a,b,f,g}
	20	0,56 \pm 0,02	0,76 \pm 0,04	0,65 \pm 0,08	0,98 \pm 0,06	0,98 \pm 0,06
	40	0,59 \pm 0,03	0,9 \pm 0,04 ^{a,b,f}	0,81 \pm 0,07 _{a,b,c}	0,72 \pm 0,19 _{a,b,c,f}	1,19 \pm 0,1 _{a,b,f,h}
β CD	20	0,55 \pm 0,01	1,21 \pm 0,16	1,77 \pm 0,19	2,13 \pm 0,36	1,95 \pm 0,01
Controle	-	0,53 \pm 0,04	1,41 \pm 0,25	1,49 \pm 0,2	1,92 \pm 0,26	2,2 \pm 0,24

^a diferença estatística em relação ao controle negativo; ^b diferença significativa em relação a β CD; ^c diferença significativa em relação a rutina 10 $\mu\text{g/mL}$; ^d diferença significativa em relação a 20 $\mu\text{g/mL}$; ^e diferença significativa em relação a rutina 40 $\mu\text{g/mL}$; ^f diferença significativa em relação a MFM 10 $\mu\text{g/mL}$; ^g diferença significativa em relação a MFM 20 $\mu\text{g/mL}$; ^h diferença significativa em relação a MFM/ β CD 10 $\mu\text{g/mL}$ (ANOVA seguindo o teste de Bonferroni, $p < 0.05$).

Uma comparação entre o extrato e o controle positivo (rutina), em concentrações equivalentes, demonstrou que nas concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$, estas amostras apresentaram mesmo potencial de inibição de MDA nos dias testados, sem diferença significativa. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, essa observação também foi identificada nos dias 2 e 8 de tratamento.

Figura 16. Concentração de malondialdeído (MDA) por meio do ensaio de peroxidação lipídica, tratadas com extrato, MFM/ β CD, β CD (controle negativo) e rutina (controle positivo), em função do tempo, durante os dias 0, 2, 4, 6 e 8.



O fitocomplexo e o extrato, em concentrações equivalentes de extrato, também foram comparados. Na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, foram significativamente diferentes, sendo que o fitocomplexo apresentou maior potencial de inibição da formação de malondialdeído em todos os dias testados. Além disso, é possível observar na Figura 16 que MFM/ β CD, nessa mesma concentração, foi a amostra que manteve maior constância de inibição de MDA em função do tempo, apresentando melhor resultado que as concentrações maiores do fitocomplexo (20 e 40 $\mu\text{g/mL}$). MFM/ β CD na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$, no dia 4, promoveu a maior inibição de MDA, sendo estatisticamente diferente de todas as concentrações de

MFM e rotina testadas naquele dia. MFM/ β CD e MFM, na concentração de 40 μ g/mL, não tiveram diferença estatística.

A partir desses resultados, é possível sugerir que a complexação do extrato com a β CD proporcionou proteção aos compostos ativos contra oxidação, e com isso, melhorou a sua estabilidade permitindo maior tempo de contato de MFM com o meio reagente sem sofrer degradação, melhorando sua atividade biológica. Além disso, a complexação com β CD é capaz de aumentar a solubilidade e biodisponibilidade dos componentes do extrato, de forma que estes ativos estejam mais disponíveis no meio, favorecendo sua atividade biológica. (LOFTSSON, DUCHÊNE, 2007). Neste sentido, é importante levar em consideração que, a maior concentração testada para MFM/ β CD (40 μ g/mL) não se diferenciou de MFM, provavelmente devido ao perfil de solubilidade de β CD, que quando em altas concentrações no meio, torna-se menos solúvel.

Em estudos anteriores, em que avaliou-se a atividade antioxidante do extrato e partições de *Mitracarpus frigidus*, todas as amostras apresentaram potencial antioxidante para o sequestro de radical livre e para a peroxidação lipídica, devido principalmente, a presença de polifenóis na planta (FABRI et al., 2009; FERREIRA et al., 2021). Além disso, diversos estudos demonstraram que a complexação de espécies antioxidantes com a ciclodextrina potencializou a atividade destes compostos (LU et al., 2011; FERREIRA et al., 2013; LANA et al., 2016). Estes dados corroboram os resultados encontrados neste trabalho

5.5.2 Avaliação da viabilidade celular em RAW 264.7

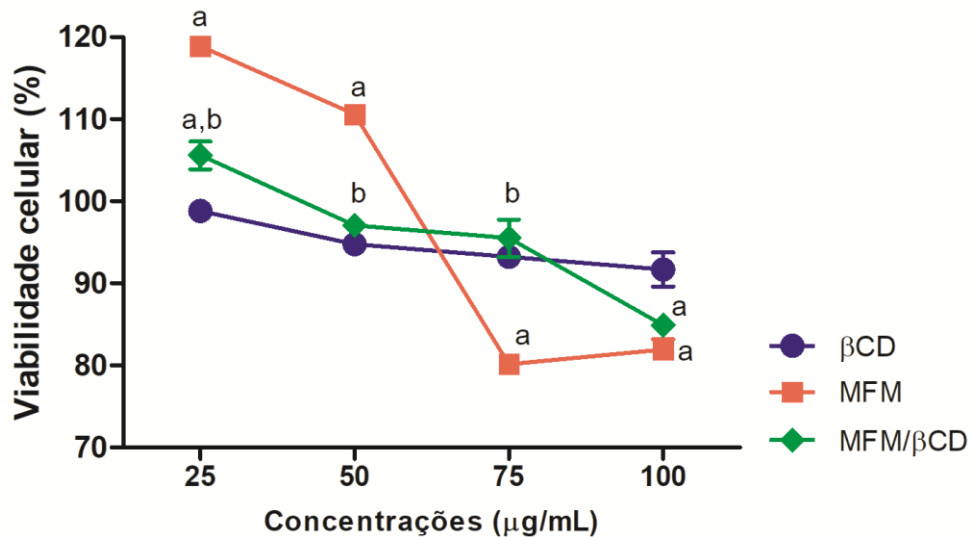
A viabilidade celular é um indicador essencial para a compreensão das vias envolvidas na sobrevivência ou morte celular, após exposição a agentes tóxicos. Assim, os ensaios de citotoxicidade celular são geralmente usados para triagem de drogas, a fim de detectar se as moléculas-teste têm efeitos sobre a proliferação celular ou exibem citotoxicidade direta, contribuindo para a descoberta de novos medicamentos com segurança e eficácia elevadas (NASCIMENTO, 2010).

A viabilidade da célula é dada a partir da clivagem do MTT, que é realizada por células vivas e metabolicamente ativas, mas não por células mortas ou eritrócitos. Neste sentido, o teste permite analisar a sobrevivência e proliferação celular. Para que a viabilidade seja aceitável, é preconizado pela ISO10993-5

(2009), que a porcentagem de células viáveis não retroceda o limite de 70% em investigações de citotoxicidade *in vitro*.

No ensaio de MTT com células macrófagos murinos (RAW 264.7), observou-se que MFM e MFM/ β CD não apresentaram efeitos tóxicos, já que a viabilidade celular, em todas as concentrações testadas, mantiveram valores maiores que 70% (Figura 17). Tais resultados demonstraram que, tanto o extrato livre, como seu fitocomplexo, são seguros e apresentam potencial para o desenvolvimento de formulações, principalmente para uso tópico.

Figura 17. Avaliação do perfil de viabilidade celular pela clivagem do MTT para MFM, MFM/ β CD e β CD.



^aEstatisticamente diferente de β CD. ^b Estatisticamente diferente de MFM (ANOVA seguida de Bonferroni, $p < 0,05$).

5.5.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória

A inflamação é um mecanismo de defesa fisiológico contra um agente agressor. Porém, quando essa resposta é exacerbada, há uma crescente produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio secretadas por células inflamatórias ativas, que levam a destruição tissular e danos ao DNA (RANG, 2012; CARNEIRO et al., 2019).

O NO é uma espécie reativa secretada por macrófagos e neutrófilos durante o processo inflamatório, e está relacionada com a expressão de ciclo-oxigenase 1

(COX-1) e ciclo-oxigenase 2 (COX-2), podendo levar ao aumento da produção de prostaglandinas (TRIPATHI et al., 2007; FANG, 2015). Além disso, o NO está envolvido em um dos processos que estimulam a vasodilatação, promovendo a taxonomia de citocinas pró inflamatórias (WALLACE, 2005).

A dosagem indireta de NO pelo método de Griess demonstrou que as células estimuladas com LPS apresentaram maior produção de NO em relação às células não estimuladas (Tabela 4). De forma geral, foi possível observar que as células tratadas com MFM/ β CD tiveram uma redução maior na produção de NO em comparação com MFM, enquanto que β CD não reduziu a produção de NO, não havendo diferença estatística em relação às células estimuladas com LPS, sem tratamento ($p < 0,05$).

Além disso, vale destacar que MFM/ β CD nas concentrações de 100, 75, 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ inibiram em torno de 68,27; 69,53; 68,63 e 59,61% da produção de NO nas células tratadas, respectivamente, enquanto que as mesmas concentrações de MFM inibiram 29,66; 47,78; 49,26 e 65,19%, respectivamente. MFM/ β CD apresentou diferença estatística para MFM nas concentrações de 75 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

Em resposta a estímulos patológicos, as células hospedeiras expressam várias metaloproteinases (MMPs) de matriz (endopeptidases dependentes de zinco), que podem estar associadas à eliminação de infecções no início da resposta imune. No entanto, a produção excessiva dessas MMPs pode levar à degradação da matriz e a vários processos patológicos (SUÁREZ, 2014). Essas enzimas são mediadores importantes da inflamação, remodelação do tecido e aumento da carcinogênese (PUJADA, 2017).

Na tabela 4, nota-se uma redução da relação das metaloproteinases MMP-9/MMP-2 em células tratadas com MFM e MFM/ β CD. Diminuições nos níveis de MMP-9 foram marcadas para MFM/ β CD em relação a MFM. MFM/ β CD apresentou diferença estatística em comparação a MFM na concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$).

Tais resultados sugerem que as amostras MFM e MFM/ β CD podem atuar na redução do processo inflamatório, bem como na proteção contra danos causados pela resposta exacerbada. Estudos anteriores com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* demonstraram que o extrato apresentou potencial anti-inflamatório, sendo tal atividade associada à presença de polifenóis e terpenos na espécie (FABRI et al., 2014b).

A melhor atividade de MFM/ β CD pode estar relacionada à maior disponibilidade dos compostos ativos, provavelmente devido à maior solubilidade e biodisponibilidades conferidas pela complexação com β CD.

Tabela 4. Atividade anti-inflamatória de MFM, MFM/ β CD e β CD pelos métodos de redução do óxido nítrico e medição de metaloproteinase.

Concentração das amostras ($\mu\text{g/mL}$)

	0		25.0		50.0		75.0		100.0	
	NO *	MMP **	NO *	MMP*	NO *	MMP**	NO *	MMP*	NO *	MMP*
LPS	22,3 \pm 0,2	2 \pm 0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
LPS + β CD	-	-	23,1 \pm 0,5	3 \pm 0,01	23,8 \pm 0,3	1,2 \pm 0,003	22,0 \pm 0,2	1,4 \pm 0,002	0,5 \pm 0,2	2 \pm 0,001
LPS + MFM	-	-	13,3 \pm 0,4 ^{a,b}	1 \pm 0,02	14,2 \pm 1,2 ^{a,b}	0,9 \pm 0,002 ^{a,b}	15,3 \pm 1,1 ^{a,b}	1,0 \pm 0,03 ^b	8,0 \pm 1,1	8 \pm 0,001 ^{a,b}
LPS + MFM/ β CD	-	-	3,8 \pm 0,9 ^{a,b}	9 \pm 0,002 ^{a,b}	11,6 \pm 1,0 ^{a,b}	0,8 \pm 0,001 ^{a,b}	11,5 \pm 1,0 ^{a,b,c}	0,8 \pm 0,001 ^{a,b,c}	2,2 \pm 0,8 ^{a,b,c}	7 \pm 0,001 ^{a,b}

* em μM ; ** na proporção [MM9]/[MM2]. ^a Estatisticamente diferente de LPS. ^b Estatisticamente diferente de LPS + β CD. ^c Estatisticamente diferente de LPS + MFM (ANOVA seguida de Bonferroni, $P < 0,05$). Todas as experiências foram realizadas em triplicata e os dados representam a média \pm DP.

CONCLUSÃO

Com presente trabalho obteve-se os seguintes resultados:

- Por meio de *docking* molecular foi possível sugerir que os compostos de interesse de MFM (fenóis e terpenos), podem ter preferência em complexar-se com a β CD, em relação a outros compostos do extrato, já que apresentaram menor gasto de energia durante a complexação.
- MEV demonstrou alterações na morfologia das partículas do fitocomplexo, sugerindo complexação de MFM com a β CD.
- Através de espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier obteve-se a caracterização do extrato e fitocomplexo, demonstrando que houve a sobreposição ou atenuação de bandas características do extrato, no fitocomplexo, sugerindo a complexação com β CD.
- Observou-se uma melhora na estabilidade térmica dos fitocomplexos supramoleculares em comparação aos extratos puros através da análise térmica DTA e TGA, indicando que a formação do complexo supramolecular é satisfatória.
- A formação do nanoprecipitado hidrofóbico permitiu avaliar a estabilidade coloidal das amostras por análise de condutividade elétrica, PZ e DLS, onde o fitocomplexo apresentou maior estabilidade em relação ao extrato puro.
- A análise de solubilidade demonstrou que a complexação com a β CD, foi eficiente em melhorar a solubilidade de compostos hidrofóbicos presentes no extrato.
- O fitocomplexo obteve melhores resultados em relação ao extrato para as atividades antioxidante e anti-inflamatória por meio dos ensaios *in vitro* realizados neste estudo.

Os resultados deste estudo geraram um depósito de patente intitulado: “Formulação fitoterápica nanoestruturada à base de *Mitracarpus frigidus* com ciclodextrina, processo de obtenção, composições e usos”(ANEXO 1). Dessa forma, nosso grupo de pesquisa tem o intuito de dar sequência aos estudos, a fim de aprimorar a patente depositada.

REFERÊNCIAS

- 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.
- 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.
- AMSELEM, S., GABIZON, A. & BARENHOLZ, Y. Optimization and upscaling of doxorubicin containing liposomes for clinical use. **J. Pharm. Sc.**, v. 79, p. 1045–52, 1990.
- ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, p. 419-421, 2000.
- 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**, v. 2014, 2014.
- 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.
- BARBIERIA, N., SANCHEZ-CONTRERAS, A., CANTO, A., CAUICH-RODRIGUEZ, J.V., VARGAS-CORONADO, R., CALVO-IRABIEN, L.M. Effect of cyclodextrins and Mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth.) chemotypes on the microencapsulation of essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 114-123, 2018.
- BARBOSA, P.F.P.; CUMBA, L.R.; ANDRADE, R.D.A.; DO CARMO, D.R. Chemical modifications of cyclodextrin and chitosan for biological and environmental applications: Metals and organic pollutants adsorption and removal. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, p. 1352–1366, 2019.
- BARBOZA, J.N., BEZERRA FILHO, C.S.M., SILVA, R.O., MEDEIROS, J.V.R., DE SOUSA, D.P. An overview on the anti-inflammatory potential and antioxidant profile of eugenol. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2018, 2018.
- BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical–physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25 (1), 2020.
- BISIGNANO, G. et al. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30 (2), p. 105-108, 2000.

BITTENCOURT, V.C.E., MOREIRA, A.M. dos S., da SILVA, J.G., GOMIDES A.F. de F., VELLOSO-RODRIGUES, C., KELMANN, R.G., MENDONÇA, L.M., LULA, I.S., DENADAI, A.M. Hydrophobic nanoprecipitates formed by benzoylphenylureas and β -cyclodextrin inclusion compounds: Synthesis, characterization and toxicity against aedes aegypti larvae. **Heliyon**, v. 5, p. 1–12, 2019.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel wissenschaft and technologie*. **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.

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.

CARNEIRO, N.V.Q., et al. *Sambucus australis* modulates inflammatory response via inhibition of nuclear factor kappa b (nf-kb) *In vitro*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.91, e20170831, 2019.

CONRAD, M., KAGAN, V.E., BAYIR, H., PAGNUSSAT, G.C., HEAD, B., TRABER, M.G., STOCKWELL, B.R. Regulation of lipid peroxidation and ferroptosis in diverse species. **Genes & Development**, v. 32, p. 602-619, 2018.

DALZIEL, John M. **Useful Plants of West tropical Africa**. London: The Crown Agents for Overseas Colonies, 1937.

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, 2006.

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

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.

DUH, P.D., YEN, G.C. Antioxidative activity of three herbal water extracts. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 639-45, 1997.

EGYED, O.: Spectroscopic studies on β -cyclodextrin. **Vib. Spectrosc**, v. 1, p. 225-227, 1990.

EMILIA, M.; SCHMIDT, P.; PIRES, F.P.; LUCAS PAINES BRESSAN, L.P.; DA SILVA JR., F.V.; OSMAR LAMEIRA, O.; da Rosa, M.B. Some triterpenic compounds in extracts of *Cecropia* and *Bauhinia* species for different sampling years. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28(1), 2018.

EPKENDU, T. O. E.; ADESOMOJU, A. A.; OKOGUN, J. I. Chemical studies of *Mitracarpus villosus* (Sw) DC - a medicinal rubiaceous weed. **Journal of Chemical Society of Nigeria**, v. 26, p. 69-74, 2001.

ESCOBAR-AVELLO, D.; AVENDAÑO-GODOY, J.; SANTOS, J.; LOZANO-CASTELLÓN, J.; MARDONES, C.; BAER, D.V.; LUENGO, J.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; GÓMEZ-GAETE, C. Encapsulation of Phenolic Compounds from a Grape Cane Pilot-Plant Extract in Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin and Maltodextrin by Spray Drying. **Antioxidants**, v. 10(7), p. 1130, 2021.

ETIENNE, O. K. et al. Chemical characterization, antioxidant and enzyme inhibitory effects of *Mitracarpus hirtus* extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 194, p. 113799, 2021.

FABRI, R. L. et al. Antibacterial and leishmanicidal effects of the hexane extract of *Mitracarpus frigidus* (*Rubiaceae*) aerial parts. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 95, n. 2, p. 695-714, 2014a.

FABRI, R. L. et al. Anti-inflammatory and antioxidative effects of the methanolic extract of the aerial parts of *Mitracarpus frigidus* in established animal models. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 5, p. 722-732, 2014b.

FABRI, R. L. et al. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1073-1080, 2012b.

FABRI, R. L. et al. In-vivo laxative and toxicological evaluation and in-vitro antitumor effects of *Mitracarpus frigidus* aerial parts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 439-448, 2012c.

FABRI, R. L. et al. *Mitracarpus frigidus* (*Rubiaceae*) inhibits inflammatory and oxidative stress mediators in *Salmonella* sp. mouse infection. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73 (1), p. 82-92, 2021.

FABRI, R.L. et al. Pentacyclic triterpenoids from *Mitracarpus frigidus* (Willd. ex Roem. &Schult.) K. Shum: In vitro cytotoxic and leishmanicidal and in vivo anti-inflammatory and antioxidative activities. **Medicinal Chemistry Research**. v. 23, p. 5294–5304, 2014c.

FABRI, R.L., GRAZUL, R.M., CARVALHO, L.O., et al. Antitumor, antibiotic and antileishmanial properties of the pyranonaphthoquinone psychorubrin from *Mitracarpus frigidus*. **Anais da academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 1081–1090, 2012a.

FABRI, R.L.; NOGUEIRA, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; SCIO, E. *Mitracarpus frigidus* aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial, and antioxidant effects. **Bioresource Technology**, v. 100 (1), p. 428-433, 2009.

FANG, H., JIANG, W., CHENG, J., LU, Y., LIU, A., KAN, L., DAHMEN, U. Balancing innate immunity and inflammatory state via modulation of neutrophil

function: A novel strategy to fight sepsis. **Journal of immunology Research**, v. 2015, 2015.

FANG, L., CHANG, H.M., CHENG, J.C., LEUNG, P.C.K., SUN, Y.P. Nitric oxide and cgmpinduce 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.

FATAL, V.; EUGÊNIO, J. Evolução da Nanotecnologia: abordagem nacional e internacional. **INPI**, P. 1–22, 2010.

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

Ferreira, F. da R., Valentim, I.B., Ramones, E.L.C., Trevisan, M.T.S., Olea-Azarc, C., Perez-Cruz, F., de Abreu, F.C., Goulart, M.O.F. Antioxidant activity of the mangiferin inclusion complex with β -cyclodextrin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51(1), p. 129-134, 2013.

FERREIRA, K. C.; OLIVEIRA, L. M.; LEMOS, A. S. O.; PAULA, P. L.; FABRI, R. L. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* de partições do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus*. In: I CONGRESSO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA (CONCIFAR), 1, 2019, Juiz de Fora. **Brazilian Journal of Health Pharmacy**, v. 1, supl. 1. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora 2019, p. 11. Disponível em: https://www.ufjf.br/concifar/files/2019/10/BJHP_vol1_Out2019.pdf. Acesso em: 30 mar. 2021.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On Tyrosine And Tryptophane Determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, p. 627, 1927.

FRANCO C, SCHWINGEL L, LULA I, SINISTERRA RD, KOESTER LS, BASSANI VL. Studies On Coumestrol/ β -cyclodextrin association: Inclusion complex Characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 369, p. 5-11, 2009.

GAO, S.; JIANG, J.; LI, X.; YE, FEI.; YINGFU, Y.; ZHAO, L. An Environmentally safe formulation with enhanced solubility and fungicidal activity: Self-assembly and characterization of Difenoconazole- β -CD inclusion complex. **Journal of Molecular Liquids**, V. 327, 2021

GBAGUIDI, F. et al. HPLC quantification of two isomeric triterpenic acids isolated from *Mitracarpus scaber* and antimicrobial activity on *Dermatophilus congolensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39 (5), p. 990-995, 2005.

GUO, Z. The modification of natural products for medical use. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 2, p. 119-136. 2017.

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

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, Y.; QUAN, P.; WANG, Y.; ZHANG, D.; ZHANG, M.; LI, R.; JIANG, N. Host-guest interaction of β -cyclodextrin with isomeric ursolic acid and oleanolic acid: Physicochemical characterization and molecular modeling study. **The Journal of Biomedical Research**, v. 31, n.5, p. 395–407, 2017.

IROBI, O. N.; DARAMOLA, S. O. Antifungal activities of crude extracts of *Mitracarpus villosus* (*Rubiaceae*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40 (2), p. 137-140, 1993.

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, p. 356-362, 2016.

JANSOOK, P., OGAWA, N., LOFTSSON, T. Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. **International Journal of pharmaceutics**, v. 535, n. 1-2, p. 272-28, 2018.

JOHN-AFRICA, L. B. et al. Sedative Properties of *Mitracarpus villosus* leaves in mice. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 8 (5), p. 2132-2142, 2014.

KE, F.; ZHANG, M.; QIN, N.; ZHAO, G.; CHU, J.; WAN, X. Synergistic antioxidant activity and anticancer effect of green tea catechin stabilized on nanoscale cyclodextrin-based metal–organic frame works. **Journal of Materials Science**, v. 54, p. 10420–10429, 2019.

KERHARO, J.; ADAM, J. G. **La pharmacopée sénégalaise traditionnelle – plantes médicinale**, v. 1. Paris: VigotFrères, 1974.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12 (7), p. 908-931, 2019.

KIM, D.H., LEE, S.E., PYO, Y.C., TRAN, P., PARK, J.S. Solubility enhancement and application of cyclodextrins in local drug delivery. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 50, p.17–27, 2019

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

KRINGEL, D.H.; ANTUNES, M.D.; KLEIN, B.; CRIZEL, R.L.; WAGNER, R.; DE OLIVEIRA, R.P.; DIAS, A.R.G.; ZAVAREZE, E.D. Production, characterization, and stability of orange or eucalyptus essential Oil/ β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Food Science**, v. 82 (11), 2017.

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

KYUNGMI, M.S.; EBELER, E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 96-104, 2008.

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 *Bryophyllumpinnatum* (Lam.) Okenin incorporated in β -cyclodextrin. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 85, n. 247, 2016.

LEMOS, A. S. O. et al. Antifungal activity of the natural coumarin scopoletin against planktonic cells and biofilms from a multidrug-resistant *Candida tropicalis* strain. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1525, 2020.

LI, J., LOH, X.J. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1000–1017, 2008.

LI, W., RAN, L., LIU, F., HOU, R., ZHAO, W., LI, W., WANG, C., DONG, J. Preparation and characterisation of polyphenol-HP- β -cyclodextrin inclusion complex that protects lamb tripe protein against oxidation. **Molecules**, v. 24(24), p. 4487, 2019.

LIMA, B.S.; SHANMUGAM, S.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ARAÚJO, A.A.S. Inclusion complex with cyclodextrins enhances the bioavailability of flavonoid compounds: A systematic review. **Phytochemistry Reviews**, v. 18, p. 1337–1359, 2019.

LIMA, P.S.S.; LUCCHESI, A.M.; ARAÚJO-FILHO, H.G.; MENEZES, P.P.; ARAÚJO, A.A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; QUINTANS, J.S.S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

LIMA, S.S.P., LUCCHESI, M.A., ARAÚJO-FILHO G.H., MENEZES, P.P., ADRIANO, A.S., ARAÚJO A.A.S., QUINTANS-JÚNIOR, L.J., QUINTANS, J.S.S. Inclusion of terpenes in cyclodextrins: Preparation, characterization and pharmacological approaches. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 965-987, 2016.

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

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 co enhancers in dermal and transdermal drug delivery. **Pharmazie, Berlin**, v. 53, p. 137-139, 1998.

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

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on the chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v.763, p. 1-10, 2013.

LU, Y.; ZHANG, X.; LAI, J.; YIN, Z.; WU, W. Physical characterization of meloxicam- β -cyclodextrin inclusion complex pellets prepared by a fluid-bed coating method. **Particuology**, v. 7, p. 1-8, 2009.

LU, Z., CHEN, R., FU, R., XIONG, J., HU, Y. Cytotoxicity and inhibition of lipid peroxidation activity of resveratrol/cyclodextrin inclusion complexes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 73, p. 313–320, 2012.

MALEKIA, S.J.; CRESPO, J.F.; CABANILLASBC, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 299, p. 125124, 2019.

MALVERN INSTRUMENTS (2005). **Pharmaceutical Formulations and The Importance of Zeta Potential to Pharmaceutical Formulations**.

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

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2014). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/mma-em-numeros/biodiversidade-flora>> Acesso em 23/04/2021

MIRZA, A.; SIDDIQUI, F. Nanomedicine and drug delivery: A mini review. **International Nano Letters**, v. 94, 2014.

MIURA, R.O., YAMAGATA, S., MIURA, Y., HARADA, T., YAMAGATA, T. Analysis of glycosaminoglycan-degrading enzymes by substrate gel electrophoresis (zymography). **Analytical Biochemistry**, v. 225, p. 333-340. 1995.

MOREIRA, A.M. dos S., BITTENCOURT, V.C.E., COSTA, F.L.S. , de LIMA, M.E., BORGES, M.T.P.L., WARLEY S., MARTINS, G.F. , NASCIMENTO Jr C.S., da SILVA, J.G. , DENADAI, A.M., BORGES, K.B. Hydrophobic nanoprecipitates of β -cyclodextrin/ivermectins inclusion compounds reveal insecticide activity against aedes aegypti larvae and low toxicity against fibroblasts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66 (28), p. 7275-7285, 2018.

MOREIRA, F. L. MARQUES, L. MM. LOPES, N. DE OLIVEIRA, P. A. RM. *In vitro* metabolism studies of natural products are crucial in the early development of medicines. **Phytochemistry Reviews**, v.16, p. 355-373, 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.

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, R. J., ARAÚJO, C. R., MELO, E. A. Atividade antioxidante de extratos de resíduo agroindustrial de goiaba (*Psidium guajava* L.). **Alimentos e Nutrição/Braslian Journal of Food and Nutrition** v.21, p. 209-216, 2010.

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). **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, v. 6, p. 1–11, 2018.

NEU, T.R.; DENGLER, T.; JAN, B.; PORALLA, K.; Structural studies of an emulsion-stabilizing exopolysaccharide produced by an adhesive, hydrophobic *Rhodococcus* strain. **Journal of General Microbiology**, v.138, p.1-2537, 1992.

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.

NOBILE, S.; NOBILE, L. Nanotechnology and Early Human Development. **Applied Sciences**, v. 10 (12), p. 4323, 2020. DOI:10.3390/app10124323

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**, 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.

OZDEMIR, N., ERKIN, J. Enhancement of dissolution rate and bioavailability of sulfamethoxazole by complexation with beta-cyclodextrin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 38, n. 3, p. 331-340, 2012.

PACZKOWSKA, M.; MIZERA, M.; PIOTROWSKA, H.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D.; LEWANDOWSKA, K.; GOSCIANSKA, J.; PIETRZAK, R.; BEDNARSKI, W.; MAJKA, Z.; CIELECKA-PIONTEK, J.C. Complex of rutin with β -cyclodextrin as potential delivery system. **PLoS ONE**, v. 10(3): e0120858. doi:10.1371/journal.pone.0120858.

PAULA, L.P. **Atividades antioxidante e anti-inflamatória das folhas e ramos de *Plinia cauliflora* (DC.) Kausel (Jabuticaba) e seus fitocomplexos com -ciclodextrina**: Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora - MG; p. 141, 2020

PEDROSA, A.M.; DE CASTRO, W.V.; CASTRO, A.H.F.; DUARTE-ALMEIDA, J.M. Validated spectrophotometric method for quantification of total triterpenes in plant matrices. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 281–286, 2020.

PEREIRA, Z.V., DE CARVALHO-OKANO, R.M., GARCIA, F.C.P. *Rubiaceae Juss.* da reserva florestal Mata do paraíso, Viçosa, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, 2006.

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.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: A review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 1-11, 2007.

POPRAC, P.; JOMOVA, K.; SIMUNKOVA, M.; KOLLAR, V.; RHODES, C.J.; VALKO, M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. **Trends Pharmacological Science**, v. 38(7), p. 592-607, 2017, doi: 10.1016/j.tips.2017.04.005.

PUJADA, A., WALTER, L., PATEL, A., BUI, T., ZHANG, Z., ZHANG, Y., DENNING, T., GARG, P. Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer. **Oncotarget**, v. 8, p. 94650–94665, 2017.

RAHUL CHECKER, R.; SANDUR, S.K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R.S.; KOHLI, S.J.V.; GAUTAM SETHI, G.; AGGARWAL, B.B.; SAINIS, K.B.; Potent Anti-Inflammatory Activity of Ursolic Acid, a Triterpenoid Antioxidant, Is Mediated through Suppression of NF- κ B, AP-1 and NF-AT. **PLoS ONE**, v. 7(2), 2012.

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.

RODRIGUES, T.; REKER, D.; SCHNEIDER, P.; SCHNEIDER, G. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, 2016.

SANOGO, R. et al. Selective antimicrobial activities of *Mitracarpus scaber* Zucc against *Candida* and *Staphylococcus* sp. **Phytomedicine**, v. 2 (3), p. 265-268, 1996.

SARUTA, N., FUKAMI, T., FURUISHI, T., SUZUKI, T., TOMONO, K. Powdered formulation of liquid oil terpenoid included in cyclodextrins for chemical stabilization and improved handling. **Advanced Powder Technology**, v. 21(3), p. 326-330, 2010.

SCHMALTZ, C.; SANTOS, J.V.; GUTERRES, S.S. Nanocápsulas como uma tendência promissora na área cosmética: A imensa potencialidade desde pequeno grande recurso. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, p. 80-85, 2005.

SEDDIKI, Y.; SILVA, H.M.; SILVA, F.M. Antioxidant properties of polyphenols and their potential use in improvement of male fertility: A review. **Biomedical**

Journal of Scientific & Technical Research, 2017, doi: 10.26717/BJSTR.2017.01.000259.

SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRIDHAR, C., REDDY, Y.S.R., DE, B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytochemicals: Current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SHAPIRO, S.D., KELLEY, D., KOBAYASHI, D. Measurement of metalloproteinases. **Methods In Molecular Medicine**, v. 56, p. 383-390, 2001.

SHUKLA, S.K.; CHAN, A.; PARVATHANENIA, V.; KANABARA, D.D.; PATEL, K.. Enhanced solubility, stability, permeation and anti-cancer efficacy of Celastrol- β -cyclodextrin inclusion complex. **Journal of Molecular Liquids**. v. 318, 2020.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, C.G., MORRILL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds, fifth ed. **John Wiley & Sons**. New York, 1991.

SIMSEK, T.; SIMSEK, S.; MAYER, C.; RASULEV, B. Combined computational and experimental study on the inclusion complexes of β -cyclodextrin with selected food phenolic compounds. **Structural Chemistry**, v. 30, p. 1395–1406, 2019.

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R.; HIROSHI, K.; LLEONART, M.E. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v.12, p. 376-390, 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.

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 Food Science Tech**, v. 15, p. 137–142, 2004.

T. HIGUCHI, K. A. CONNORS, Phase solubility techniques. **Advanced Analytical Chemistry of Instrumentation**, Vol. 4, 1965, pp. 117-212.

TEICHMANN, A.; HEUSCHKEL, S.; JACOBI, U.; PRESSE, G.; NEUBERT, R.H.H.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 3, p. 699-706, 2007.

TIAN, B.; LIU, J. The classification and application of cyclodextrin polymers: A review. **New Journal of Chemistry**, Issue 22, 2020.

TRIPATHI, P., TRIPATHI, P., KASHYAP, L., SINGH, V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. **FEMS Immunology and Medicinal Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 443-52, 2007.

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

URICH-MERZENICH, G.; ZEITLER, H.; JOBST, D.; PANEK, D.; VETTER, H., & WAGNER, H. Application of the "-omic-" technologies in phytomedicine. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 70-82, 2007.

VANDERLAN DA S. BOLZANI, V. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68 (1), 2016.

VENTURINE, C.G.; NICOLINE, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 360-368, 2008.

VIJAY, K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. **International Immunopharmacology**, v. 59, p. 391-412, 2018.

WACKER, M. G. Frontiers in pharmaceutical nanotechnology. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 10, p. 2538–2540, 2019.

WADHWA, G.; KUMAR, S.; CHABRA, L.; MAHANT, S.; RAO, R. Essential oil–cyclodextrin complexes: an updated review. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 89, p. 39–58, 2017.

WALLACE, J.L. Nitric oxide as a regulator of inflammatory processes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 5-9, 2005.

WANG, S.; DONG, G.; SHENG, C. Structural simplification of natural products. **chemical Review**, v. 119, p. 4180–4220, 2019. DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00504

WU, Q., YU, J., LI, M., TAN, L., REN, X., FU, C., CHENA, Z., CAO, F., REN, J., LI, L., LIANG, P., ZHANG, Y., MENG, X. Nanoengineering of nanorattles for tumor treatment by CT imaging-guided simultaneous enhanced microwave thermal therapy and man aging inflammation. **Biomaterials**, v. 179, p. 122-133, 2018.

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.

ZANG, X.; WU, D.; LAI, J.; LU, Y.; YIN, Z.; WU, W. Piroxicam/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex prepared by a new fluid-bed coating technique. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 98, p. 665-675, 2009.

ZELLER, B.L.; SALEEB, F.Z.; LUDESCHER, R.D. Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use on flavor encapsulation. **Trends Food and Science Technology**, v. 9, p. 389–394, 1999.

ANEXO 1



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

Número do Processo: BR 10 2021 018480 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: 36036900

País: Brasil

Telefone: (032)21023435

Fax: (032)2102-3435

Email: pc.critt@ufjf.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Formulação fitoterápica nanoestruturada à base de *Mitracarpus frigidus* com ciclodextrina, processo de obtenção, composições e usos

Resumo: Trata-se a presente invenção do processo de obtenção de uma formulação fitoterápica nanoestruturada (fitocomplexo) a partir do extrato metanólico das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* (Willd. Ex Reem Schult.) K. Schum incorporado a ciclodextrina e suas composições e usos. Tanto a solução do extrato como seu complexo supramolecular podem ser utilizados como agentes antioxidantes e anti-inflamatórios. A presença de ciclodextrina induz um mecanismo de liberação controlada dos componentes ativos do extrato de modo a aumentar a solubilidade aquosa, melhorar a biodisponibilidade, aumentar a estabilidade térmica dos componentes, potencializar e vetorizar os efeitos antioxidante e anti-inflamatório.

Figura a publicar: 1

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 17/09/2021 às 09:39, Petição 870210085737