



Universidade Federal de São Paulo
Campus Diadema



KARINE PIRES BARSALOBRA

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Baccharis
trimera* (LESS.) DC. (ASTERACEAE) EM
QUERATINÓCITOS**

DIADEMA

2022

KARINE PIRES BARSALOBRA

**Análise da citotoxicidade e da atividade
antioxidante de *Baccharis trimera* (Less.) DC.
(Asteraceae) em queratinócitos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e farmacêuticas da
Universidade Federal de São Paulo –
Campus Diadema.

Orientadora: Prof. Dra. Patricia Santos
Lopes

DIADEMA

2022

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Barsalobra, Karine Pires

Análise da citotoxicidade e da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) em queratinócitos / Karine Pires Barsalobra. -- Diadema, 2022.

56 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) -
Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2022.

Orientador: Patrícia Santos Lopes

Coorientador: Marcio Adriano Andréo

1. Atividade antioxidante. 2. *Baccharis trimera*. 3. Citotoxicidade.
4. Cosméticos. 5. Flavonoides. I. Título.

KARINE PIRES BARSALOBRA

**Análise da citotoxicidade e da atividade
antioxidante de *Baccharis trimera* (Less.) DC.
(Asteraceae) em queratinócitos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como exigência parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Farmácia, ao Instituto de Ciências
Ambientais, Químicas e farmacêuticas da
Universidade Federal de São Paulo –
Campus Diadema.

Diadema, 01 de dezembro de 2022.

Banca examinadora

Prof. Dra. Patricia Santos Lopes

Ms. Andreza Rodrigues Ueoka

Ms. Ana Carolina Henriques Ribeiro Machado

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por sempre me acompanhar, me proteger e me abençoar.

Aos meus pais, Marcos e Kátia, que sempre me apoiaram, incentivaram, e acreditaram em mim. Que não mediram esforços para me ver feliz e traçar meu caminho. Tudo que conquistei devo à vocês. Meu amor e gratidão eterna.

Ao meu irmão, Luis Felipe, pela parceria e apoio.

Ao meu amor, Italo, por me apoiar e sempre estar ao meu lado. Por acreditar em mim e me fazer feliz.

À minha avó Odete, que sempre confiou e acreditou em mim. Tenho certeza que ela está orgulhosa de onde estiver.

Às minhas tias Beatriz e Juliana, que fizeram o possível para me ajudar e me apoiar neste caminho.

Às minhas amigas Ana, Caroline, Giovana e Ingrid, por estarem ao meu lado durante esses anos, compartilhando momentos inesquecíveis e muito felizes.

Às minhas colegas de laboratório, em especial a Andreza, por compartilhar seu conhecimento e sempre me ajudar.

À minha orientadora Patricia, por ter confiado e acreditado em mim, e por todo apoio e dedicação. Jamais esquecerei o que fez por mim e levarei seus ensinamentos por toda vida.

À UNIFESP e todo corpo docente, por se dedicarem a um ensino de qualidade e por contribuírem para a minha formação. Viva à ciência!

“O ser humano não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível”.

Max Weber

RESUMO

Radicais livres produzidos em excesso podem causar danos à pele, tais como a perda de elasticidade e aceleração do envelhecimento. Os antioxidantes são capazes de minimizar ou prevenir esses danos, reduzindo a formação de radicais livres. A *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), conhecida popularmente como “carqueja”, possui substâncias com grande potencial antioxidante, tornando a sua investigação importante para identificar compostos naturais que possam retardar o envelhecimento cutâneo. Diante disso, este estudo teve por objetivo realizar testes *in vitro* em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT) para identificar a citotoxicidade e a atividade antioxidante de extratos de *B. trimera* (Less.) DC. A citotoxicidade foi determinada pelo método de coloração com a solução de MTS/PMS. No ensaio de atividade antioxidante, a fluorescência foi obtida utilizando o 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). As substâncias isoladas e identificadas foram os flavonoides quercetina, luteolina e apigenina. Os resultados também determinaram o IC₅₀ de 1961 µg/ml para o extrato aquoso, 460 µg/ml para o extrato hidroalcoólico, 50 µg/ml para a luteolina, 240 µg/ml para a apigenina e 241,3 µg/ml para a quercetina. As amostras testadas mostraram ótimos resultados, evidenciando um potencial antioxidante de 80,5% para o extrato aquoso, 86,0% para o extrato hidroalcoólico; 78,0% para a luteolina; 83,0% para a apigenina e 86,8% para a quercetina, indicando resultados promissores para seu uso em cosméticos, principalmente relacionados ao extrato hidroalcoólico.

Palavras chaves: Atividade antioxidante, *Baccharis trimera*, citotoxicidade, cosméticos, flavonóides.

ABSTRACT

Free radicals produced in excess can cause skin damage, such as loss of elasticity and accelerated aging. Antioxidants are able to minimize or prevent this damage by reducing the formation of free radicals. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae), popularly known as “carqueja”, has substances with great antioxidant potential, making its investigation important to identify natural compounds that can delay skin aging. This study aimed to perform in vitro tests on a lineage of immortalized human keratinocytes (HaCaT) to identify the cytotoxicity and antioxidant activity of extracts of *B. trimera* (Less.) DC. Cytotoxicity was determined by the staining method with the MTS/PMS solution. In the antioxidant activity assay, the fluorescence was obtained using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). The substances isolated and identified were the flavonoids quercetin, luteolin and apigenin. The results also determined IC₅₀ of 1961 µg/ml for the aqueous extract, 460 µg/ml for the hydroalcoholic extract, 50 µg/ml for luteolin, 240 µg/ml for apigenin and 241.3 µg/ml for quercetin. The tested samples showed excellent results, showing an antioxidant potential of 80.5% for the aqueous extract, 86.0% for the hydroalcoholic extract; 78.0% for luteolin; 83.0% for apigenin and 86.8% for quercetin. The *B. trimera* showed promising results for its use in cosmetics, mainly related to the hydroalcoholic extract.

Keywords: Antioxidant activity, *Baccharis trimera*, cytotoxicity, cosmetics, flavonoid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cromóforos encontrados em flavonóides e seus respectivos comprimentos de onda máximos de absorção	20
Figura 2 - Caule alado da Carqueja	21
Figura 3 - Representação esquemática da ação do DCFH-DA intracelular	23
Figura 4 - Demonstração da microplaca de 96 poços para o ensaio de citotoxicidade	30
Figura 5 - Representação da microplaca preta de 96 poços utilizada na padronização do teste de atividade antioxidante.....	34
Figura 6 - Exemplo da montagem da microplaca preta de 96 poços para avaliar a atividade antioxidante de amostras da <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	37
Figura 7 - Viabilidade das células HaCaT após exposição ao extrato aquoso de <i>B. trimera</i>	38
Figura 8 - Viabilidade das células HaCaT após exposição ao extrato hidroalcoólico de <i>B. trimera</i>	40
Figura 9 - Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonóide apigenina de <i>B. trimera</i>	42
Figura 10 - Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonoide luteolina de <i>B. trimera</i>	43
Figura 11 - Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonoide quercetina de <i>B. trimera</i>	44
Figura 12 – Estrutura química dos flavonoides apigenina (A) luteolina (B) e quercetina (C).....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Fluorescência emitida na padronização do teste de atividade antioxidante	35
Gráfico 2 – Porcentagem da viabilidade das células em contato com o solvente DMSO	45
Gráfico 3 – Atividade antioxidante da <i>Baccharis trimera</i> (Less) DC. em intensidade de fluorescência (nm)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores do IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ do extrato aquoso de <i>B. trimera</i>	39
Tabela 2 – Valores de IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ do extrato hidroalcoólico de <i>B. trimera</i>	41
Tabela 3 – Valores do IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ do flavonoide apigenina de <i>B. trimera</i>	43
Tabela 4 – Valores do IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ do flavonoide luteolina de <i>B. trimera</i>	44
Tabela 5 – Valores do IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ do flavonoide quercetina de <i>B. trimera</i>	45
Tabela 6 – Comparativo dos valores do IC ₅₀ , IC ₁₀ e DL ₅₀ das amostras da <i>Baccharis trimera</i>	46

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

BHT	Hidroxitolueno butilado
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbônico
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCF	Diclorofluoresceína
DCFH-DA	2',7'-diclorofluoresceína diacetato
DL ₅₀	Dose Letal que causa a morte de 50 % da população em estudo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2'-difeníl-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético - <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FPS	Fator de proteção solar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOMO	Orbital molecular ocupado de energia mais alta - <i>Highest occupied molecular orbital</i>
IC ₁₀	Concentração inibitória de 10% da população em estudo
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% da população em estudo
LUMO	Orbital molecular desocupado de energia mais baixa - <i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium</i>
NAC	N-acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
OH	Hidroxila
PBS	Tampão fosfato-salino - <i>Phosphate buffered saline</i>
PMS	<i>Phenazine methosulfate</i>
RC	Registro de citotoxicidade
RMN	Ressonância magnética nuclear

SOD	Superóxido dismutase
TMS	Trimetilsilano
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

μg – micrograma (s)

μL – microlitro (s)

μM – micromolar (s)

cm^2 – centímetro quadrado

g – grama (s)

kg – quilograma (s)

% - porcentagem

nm – nanômetro

π – pi

λ - comprimento de onda

L – litro (s)

M – molar

m - metro

mg – miligrama (s)

mL – mililitro (s)

mM - milimolar

v/v - volume do soluto (mL) volume da solução (mL)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Radicais livres e antioxidantes	17
2.2 Ação dos antioxidantes na proteção da pele	18
2.3 Flavonoides	19
2.4 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. (Asteraceae)	20
2.5 Avaliação <i>in vitro</i> da segurança de compostos antioxidantes	22
2.6 Método <i>in vitro</i> para a avaliação da atividade antioxidante	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivos gerais	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Cultura celular	26
4.2 Obtenção das amostras de <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	27
4.2.1 Material vegetal	27
4.2.2 Preparo dos extratos	27
4.2.3 Isolamento e identificação de flavonoides em <i>B. trimera</i> comercial.	28
4.3 Teste de citotoxicidade.	29
4.3.1 Plaqueamento das células	29
4.3.2 Preparo das amostras	30
4.3.3 Aplicação do MTS/PMS	31
4.3.4 Viabilidade celular	31
4.4 Teste de atividade antioxidante	32
4.4.1 Padronização do ensaio	32
4.4.2 Ensaio de atividade antioxidante de <i>B. trimera</i>	35
4.4.2.1 Preparo das amostras de <i>B. trimera</i>	35
4.4.2.2 Aplicação dos reagentes e amostras	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	38
5.1 Avaliação da citotoxicidade	38
5.1 Avaliação da atividade antioxidante	47
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A oxidação é essencial para a vida aeróbica e do metabolismo celular, pois geram radicais livres que são moléculas ou átomos produzidos constantemente e que agem em diversas reações bioquímicas como mediadores em transferências de elétrons, sendo de grande importância ao metabolismo (PHANIENDRA *et al.*, 2015).

Os radicais livres possuem um par de elétrons desemparelhados que lhes conferem grande reatividade, necessitando doar ou retirar um elétron de outro átomo ou molécula para a sua estabilização (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). O prejudicial dessa necessidade da oxidação é que a produção de radicais livres em excesso pode causar diversos danos oxidativos (APAK *et al.*, 2016).

Na pele, os efeitos dos radicais livres levam ao envelhecimento precoce, devido à danificação do colágeno e da elastina, causando o desenvolvimento de rugas, manchas, perda da luminosidade e perda da elasticidade. Os radicais livres também provocam lesões ao ácido desoxirribonucléico (DNA), que à longo prazo podem desencadear o câncer de pele (EMERIT, 1992; GROMBONE-GUARATINI *et al.*, 2020). A produção dos radicais livres na pele se dá, em maior parte, à exposição aos raios ultravioletas (UV), portanto, a administração tópica de antioxidantes é considerada uma estratégia para a redução destes danos (VINARDELL; MITJANS, 2015).

Os antioxidantes são substâncias que têm como característica a capacidade de combater os radicais livres, mesmo em pequenas quantidades, conseguindo bloquear sua formação, diminuindo seus efeitos e reparando os problemas celulares por eles causados (GULCIN, 2020).

Existem antioxidantes que são produzidos sinteticamente, porém, estudos sugerem que alguns antioxidantes deste tipo não oferecem proteção adequada contra o estresse oxidativo (POLJSKAK *et al.*, 2013). Além disso, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de alguns antioxidantes fenólicos sintéticos, como o hidroxitolueno butilado (BHT), utilizados em alimentos e cosméticos apresentarem efeito carcinogênico (WANG; KANNAN, 2019). Com isso, tem-se aumentado o número de pesquisas por compostos antioxidantes naturais que podem ser obtidos da extração de plantas e vegetais e que vêm demonstrando um elevado potencial (ZHONG *et al.*, 2019).

Mesmo possuindo efeitos benéficos, substâncias de origens naturais em

doses elevadas podem causar toxicidade ocasionando danos à pele, sendo necessária a realização de testes para determinar concentrações adequadas, que não são tóxicas, as quais proporcionarão maior segurança aos produtos desenvolvidos com estes ativos (ANTIGNAC *et al.*, 2011).

A *B. trimera* (Less.) DC., conhecida popularmente como carqueja, é uma espécie arbustiva originária da América do Sul pertencente à família Asteraceae. Seus usos são, segundo Abad & Bermejo (2007), Soicke & Peschlow (1987), e Gene *et al* (1996), principalmente contra desordens gástricas e digestivas, além de febrífuga, antihepatotóxica, hipoglicemiante e analgésica. São utilizadas suas partes aéreas em infusões, decocções e tinturas, que possuem majoritariamente ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, saponinas e outros compostos fenólicos (taninos) (BIONDO *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Os flavonoides estão entre os metabólitos secundários presentes em maior quantidade na *B. trimera* e apresentam maior atividade terapêutica (RABELO; COSTA, 2018). Estes compostos são grandes doadores de elétrons, devido a sua estrutura, sendo capazes de estabilizarem radicais livres envolvidos no processo oxidativo proporcionando uma grande ação antioxidante (VIHAKAS, 2014).

Pesquisas voltadas aos extratos e ativos de plantas medicinais com ação antioxidante estão sendo cada vez mais visadas para o desenvolvimento de novos produtos que combatam os sinais do envelhecimento cutâneo precoce (MOROCHO-JÁCOME *et al.*, 2021).

O fato da *B. trimera* possuir uma grande quantidade de compostos com ação antioxidante desperta o interesse para a identificação de potenciais ativos cosméticos desta planta. Não são relatadas na literatura pesquisas relacionadas à avaliação de extratos e flavonoides da carqueja para uso em cosméticos, apenas utilizando seu óleo essencial.

Diante do exposto acima, este estudo avaliou a segurança e a atividade antioxidante de extratos e flavonoides obtidos da *B. trimera*, especificamente em células da pele (queratinócitos humanos), com o intuito de gerar evidências sobre o potencial uso desses ativos em futuros produtos cosméticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radicais livres e antioxidantes

Os radicais livres são átomos ou moléculas que durante processos metabólicos são produzidos constantemente, agindo em diversas reações bioquímicas e possuindo um importante papel no metabolismo (PHANIENDRA *et al.*, 2015). Eles possuem grande reatividade por apresentarem um par de elétrons desemparelhados, portanto, para a estabilização, precisam retirar ou doar um elétron de outro átomo ou molécula (SANTOS-SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados de EROs (espécies reativas de oxigênio) e ERNs (espécies reativas de nitrogênio). Porém, a necessidade da oxidação pode causar consequências quando há uma produção de espécies reativas em excesso, que acabam provocando danos oxidativos (JUAN, *et al.*, 2021).

Os radicais livres possuem diversas funções no organismo como a sinalização intercelular, síntese de substâncias biológicas importantes, regulação do crescimento celular, produção de energia e fagocitose (SHARMA, *et al.*, 2018). Porém, em quantidades elevadas, os radicais livres passam a atacar células sadias para a sua estabilização, causando danos à membrana celular, proteínas, mitocôndrias e ao DNA, mudando conformações de estruturas e funções celulares. Sendo assim, estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas (Mal de Alzheimer), artrite reumatoide, hipertrofia muscular, câncer, aterosclerose, disfunções cognitivas, entre outras (PHANIENDRA *et al.*, 2015).

O envelhecimento precoce da pele também está associado aos danos causados pelos radicais livres, onde as propriedades adesivas dos queratinócitos epidérmicos vão se danificando levando ao ressecamento e afinamento da pele, o que pode ser observado pelo desgaste das junções dermo-epidérmicas e atrofia cutânea. O colágeno e a elastina (produzidos pelos fibroblastos da derme) também são danificados. Com isso ocorrem diversas reações que envolvem o desenvolvimento de rugas, manchas, perda da luminosidade, perda da elasticidade e da firmeza cutânea, caracterizando a flacidez, e, nos casos mais sérios, desenvolvimento de câncer basocelular ou espinocelular (EMERIT, 1992;

GROMBONE-GUARATINI *et al.*, 2020).

Diante disso, o próprio organismo age para combater esses radicais livres, produzindo substâncias antioxidantes para prevenir ou regenerar os danos oxidativos, utilizando enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutationala peroxidase e a catalase (ALI, *et al.*, 2020).

Os estudos sobre os radicais livres e seus efeitos prejudiciais ao organismo na geração de doenças e danos às células, impulsionaram as buscas nos últimos anos pelo desenvolvimento de novos métodos para descobrir e avaliar a atividade antioxidante de novas substâncias (MUNTEANU; APETREI, 2021).

Um antioxidante é uma molécula capaz de inibir a oxidação de outras moléculas mesmo em baixas concentrações, conseguindo bloquear a formação de radicais livres, prevenindo, retardando ou removendo os danos oxidativas causados em uma molécula (GULCIN, 2020).

Os antioxidantes podem ser originados de substâncias tanto sintéticas quanto naturais. Os sintéticos são utilizados na fase de propagação da oxidação, fazendo com que ela diminua, porém essas substâncias são decompostas com facilidade em altas temperaturas e também são voláteis (MARTINEZ-TOME, *et al.*, 2001). Além disso, um fator que cria um alerta sobre uso de antioxidantes sintéticos é a associação de algumas moléculas a efeitos colaterais graves, inclusive ao câncer. Muitos estudos estão sendo feitos para medir a exposição humana a estes compostos, o que leva cada vez mais a busca por alternativas, como os antioxidantes naturais, para a utilização em produtos, seja na indústria alimentícia ou cosmética (WANG; KANNAN, 2019; CALEJA, *et al.*, 2017).

2.2 Ação dos antioxidantes na proteção da pele

A adição de antioxidantes em cosméticos vem crescendo muito nos últimos anos, pois a administração tópica destes compostos em cremes, sérums, filtros solares, conseguem bloquear reações em cadeia causada pelos radicais livres e estresse oxidativo, combatendo o ressecamento, o aparecimento de rugas e principalmente o fotoenvelhecimento (KUSUMAWATI; INDRAYANTO, 2013). Muitos antioxidantes possuem em sua estrutura compostos aromáticos que apresentam um grupo doador de elétrons, como uma amina ou um grupo metoxila, na posição orto do anel aromático, onde o tipo de substituinte e o lugar dele no anel são condições decisivas

para suas propriedades espectroscópicas no UV. Ao absorver a radiação UV, os elétrons situados no orbital π HOMO (orbital molecular ocupado de energia mais alta) são excitados para orbital π^* LUMO (orbital molecular desocupado de energia mais baixa) e, ao retornarem para o estado inicial, o excesso de energia é liberado em forma de calor. É necessário ressaltar que um maior número de ligações duplas conjugadas nas moléculas faz com que sua absorção máxima seja deslocada para maiores comprimentos de onda, resultando em uma absorção mais intensa (JANSEN *et al.*, 2013; HASHEMI *et al.*, 2019).

Além disso, muitos antioxidantes presentes ou derivados de extratos vegetais possuem vários cromóforos, ou seja, substâncias que têm a capacidade de absorver a energia da luz UV, como por exemplo, os flavonoides. Os antioxidantes também atuam indiretamente no aumento do fator de proteção solar (FPS). As EROs produzidas pela radiação UV são responsáveis pelo aparecimento de eritema cutâneo, conseqüentemente, quando as EROs são reduzidas por compostos antioxidantes, o FPS *in vivo* tende a aumentar, pois o mesmo é avaliado com base no aparecimento do eritema cutâneo (GILABERTE; GONZÁLEZ, 2010).

Com isso, é possível observar a relação entre a fotoproteção e os antioxidantes, os quais proporcionam o aumento da capacidade fotoprotetora em uma formulação, mostrando ser uma combinação muito promissora, uma vez que muitos destes compostos antioxidantes são encontrados em extratos de plantas (MANSUR, *et al.*, 2012).

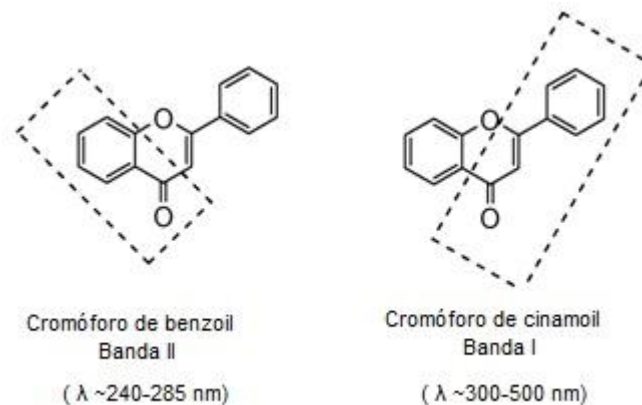
2.3 Flavonoides

Os flavonoides são as moléculas constituídas por dois anéis de aromáticos unidos por um anel heterocíclico de pirano ou pirona (com uma ligação dupla) no meio, que podem sofrer diversas variações químicas, formando assim mais de quatro mil compostos que são agrupados em classes (KARAK, 2019). Estudos indicam que estes compostos possuem como principal ação um grande potencial antioxidante, devido a sua estrutura química, mas que também agem de maneira terapêutica no sistema circulatório, nervoso, cardiovascular e imunológico (GEORGIEV, *et al.*, 2014). Além desses efeitos, evidências mostram que flavonoides regulam a atividade de enzimas antioxidantes, modulam receptores nucleares e atuam sobre a sinalização celular e expressão gênica (SEERAM; HEBER, 2006).

Possuem capacidade de neutralizar os radicais livres e quelar íons metálicos, apresentando em sua estrutura grupos hidroxila (OH), que doam átomos de hidrogênio e conseguem estabilizar a molécula, inibindo assim as reações de oxidação das espécies reativas de oxigênio (VIHAKAS, 2014).

Além disso, como citato no item 2.2 os flavonoides possuem dois cromóforos, que apresentam duas bandas de absorção para a radiação UV (Figura 1): uma entre 240 e 285 nm, atribuída a um anel, e outra entre 300 até 550 nm, correspondendo à ligação do anel heterocíclico com o outro anel (NUNES, et al, 2018; VIHAKAS, 2014). Além da absorção de luz UV, os flavonóides também podem contribuir para estabilizar os filtros solares por vários mecanismos, incluindo a eliminação de radicais livres, inibição de peroxidação lipídica e quelação de íons metálicos, porém, estas são características que ainda precisam ser mais estudadas para sua comprovação (VELASCO, *et al*, 2008).

Figura 1 – Cromóforos encontrados em flavonóides e seus respectivos comprimentos de onda máximos de absorção.



Fonte: Adaptado de Grombone-guaratini, et al, 2020.

2.4 *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae)

A procura pelo consumo de produtos naturais vem aumentando ao longo dos anos, pela grande quantidade de pesquisas que indicam seus benefícios, inclusive para o tratamento de diversas doenças. Os estudos em busca de propriedades provindas de plantas com ação fitoterápica também vêm crescendo, mesmo sendo utilizadas desde os primórdios da humanidade. Dentre as espécies nativas com

potencial farmacológico, destaca-se a *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Figura 2), conhecida popularmente como carqueja (KARAM, *et al.*, 2013; DIAS, *et al.*, 2009).

O gênero *Baccharis*, incluído na ordem Asterales da família Asteraceae, são arbustos que medem geralmente de 0,5 a 4,0 m de altura em média. Está presente em países como Argentina, Brasil, Colômbia, Chile e México, sendo representada por mais de 500 espécies distribuídas. Elas são normalmente consumidas na forma de chá e apresentam um elevado valor socioeconômico (VERDI, *et al.*, 2005).

A *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae), é muito utilizada no Brasil e é atribuída ao tratamento de diversas doenças com propriedades estomáquicas, febrífugas, tônicas, além de seus efeitos antiinflamatórios e digestivos. Age principalmente em problemas hepáticos e contra disfunções estomacais e intestinais (KARAM, *et al.*, 2013).

Das propriedades encontradas na *B. trimera* foi observado que os flavonoides estão entre os metabólitos secundários presentes em maior quantidade e que apresentam maior atividade terapêutica, destacando-se a ação hepatoprotetora e antioxidante, indicando as atividades farmacológicas da carqueja (RABELO; COSTA, 2018).

Figura 2 – Caule alado da Carqueja.



Fonte: Sjabelski, R., 2013.

2.5 Avaliação *in vitro* da segurança de compostos antioxidantes

Uma grande parcela da população, de maneira equivocada, acredita que o uso em grandes quantidades de plantas com ativos medicinais não causa riscos à saúde pelo fato de ser um composto natural, porém, a determinação das concentrações que apresentam toxicidade é de grande importância para evitar o consumo em níveis elevados que podem desencadear efeitos negativos e resultar em quadros clínicos graves (PERON *et al.*, 2008).

O teste de citotoxicidade é um ensaio realizado *in vitro* que avalia a interferência de moléculas no metabolismo celular e na forma de como esses processos podem alterar a sobrevivência, crescimento e viabilidade celular, sendo possível determinar qual é a concentração da substância que inibe 50 % do crescimento das células, ajudando no estabelecimento de concentrações adequadas, que não são tóxicas, para a evolução do estudo (GROOTHUIS *et al.*, 2015). Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o material de interesse em contato com uma cultura de células para verificar as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes (ROGERO, *et al.*, 2003).

Um dos métodos utilizados é a solução de corante MTS/PMS - MTS:3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2Htetrazolium) e um agente acoplador de elétrons (PMS: *phenazine methosulfate*), que ao entrar em contato com as enzimas desidrogenases presentes nas células vivas provocam uma alteração na coloração (MALICH, *et al.*, 1997). O MTS é biorreduzido pelas células a um produto que é solúvel no meio de cultura, o formazano, sendo possível determinar as concentrações de compostos de interesse que não vão apresentar toxicidade às células, pois a quantidade de corante incorporada pela população celular é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (BARLTROP, *et al.*, 1991).

Segundo o guia para testes de citotoxicidade da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) 129 de 2010, o uso de ensaios *in vitro* para estimar o valor a ser usado como dose inicial poderia reduzir potencialmente o uso de animais em até 28 % para testes de toxicidade e até 50 % para testes de substâncias não classificadas, revelando a sua importância na diminuição da utilização de animais e na verificação da segurança dos compostos. Além disso, os testes *in vitro* possuem alguns benefícios em relação aos testes *in vivo*, como

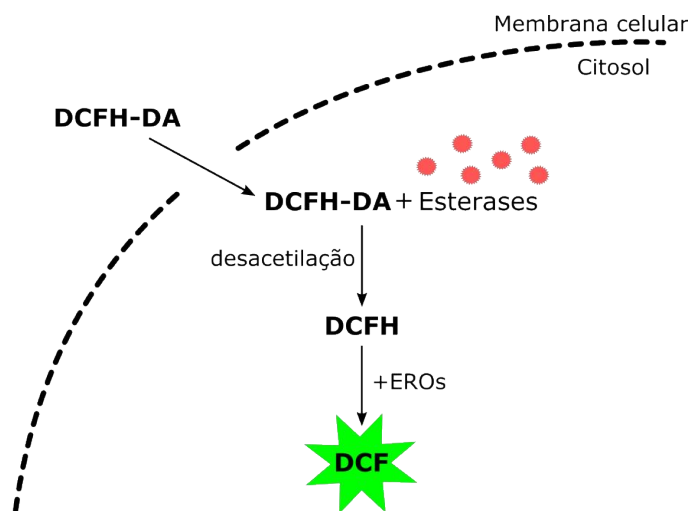
apresentar um tempo de teste mais curto, em muitos casos, limitar o número de variáveis no experimento e também obter dados relevantes com menor dificuldade (ROGERO, *et al.*, 2003).

2.6 Método *in vitro* para a avaliação da atividade antioxidante

Na literatura podemos observar diversos métodos sendo desenvolvidos para a descoberta de potentes agentes antioxidantes, como por exemplo a utilização de sondas fluorescentes, que detectam espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, e estão sendo utilizadas com frequência em sistemas biológicos (KALYANARAMAN *et al.*, 2012).

Um exemplo é o composto denominado 2',7' – diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) que é permeável às células, e quando internalizado entra em contato com as esterases citólicas (enzimas), ocorrendo o processo de desacetilação, que resulta em diclorofluorescina (DCFH). O DCFH não é fluorescente, mas na presença de espécies reativas de oxigênio é convertido em diclorofluoresceína (DCF), como é possível visualizar na Figura 3. O DCF por sua vez é um composto fluorescente que é detectado pelo comprimento de onda de excitação em 485 nm e emissão em 528 nm. É um composto comumente utilizado para medir o nível de espécies reativas, sendo diretamente proporcional à intensidade da fluorescência (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Figura 3 – Representação esquemática da ação do DCFH-DA intracelular.



Fonte: elaborado pela autora.

Quanto maior a fluorescência, maior é a quantidade de espécies reativas que estão disponíveis e são encontradas no meio. Uma vez que um composto apresenta uma atividade antioxidante, a intensidade de fluorescência diminui devido à capacidade de defesa contra esses radicais livres (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004).

Nota-se que este é um método de extrema relevância, por avaliar a capacidade antioxidante intracelular de um composto, sendo encontrados poucos estudos na literatura que o utilizam para a avaliação de agentes naturais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antioxidante, *in vitro*, do extrato aquoso, extrato hidroalcoólico e de três flavonoides (luteolina, apigenina e quercetina) obtidos das partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC, em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT).

3.2 Objetivos específicos

- Identificar através do ensaio de citotoxicidade os valores da IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ de cada amostra, e com isso detectar a concentração adequada para iniciar o teste de atividade antioxidante;
- Verificar e analisar a capacidade antioxidante de cada amostra, em diferentes concentrações, no combate às espécies reativas de oxigênio utilizando o composto DCFH-DA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura celular

Foi realizada a cultura celular de uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizadas, a HaCaT, em meio de cultura D10, composto por *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) alta glicose (Vitrocell®), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Vitrocell®), 1% (v/v) de L-Glutamina (Vitrocell®) e 1% (v/v) de solução de antibióticos (10.000 UI. mL⁻¹ de penicilina, 10 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 1 mg.mL⁻¹ de anfotericina B) (Vitrocell®).

As células foram cultivadas em garrafas próprias que possuem adesão para o desenvolvimento e multiplicação celular. Inicialmente as células foram colocadas em garrafas pequenas (25 cm²), sendo 2,5 mL de células e 2,5 mL de meio de cultura (D10) que foram incubadas em uma estufa a 37°C e 5% de CO₂ com umidade controlada (modelo 3425, Thermo Scientific™).

Posteriormente foi realizada a tripsinização e amplificação das garrafas de células. Como a HaCaT é uma linhagem que possui adesão, é utilizada uma solução de tripsina (tripsina - 2,5 g.L⁻¹ e EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético, 0,38 g.L⁻¹) (Vitrocell®), uma enzima que provoca o desprendimento das células para a troca e amplificação da garrafa. Para isso, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com solução fisiológica – cloreto de sódio (NaCl) 0,9% (m/v) (Eurofarma®) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração desta solução, foram adicionados 2,5 mL de solução tripsina. A garrafa com a tripsina é incubada novamente a 37°C, por 20 minutos, para o desprendimento total das células. Feito isso, a ação da tripsina foi bloqueada por meio da adição de meio de cultura (que contém o soro fetal bovino), completando o volume da garrafa.

As células juntamente com o meio de cultura foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL (Falcon®) e colocados em uma centrífuga por 5 minutos a 1500 rpm. Como as células possuem maior densidade que o meio, formou-se um *pellet* das células e o sobrenadante foi aspirado. As células foram ressuspensas em 5 mL de meio de cultura e transferidas para uma garrafa média (75 cm²), sendo completada com 5 mL de meio e incubadas novamente.

Para a amplificação da garrafa média para a garrafa grande (150 cm²), que possui capacidade de 20 mL, foi realizado o mesmo procedimento, diferindo-se

apenas em relação aos volumes, os quais são proporcionais ao tamanho da garrafa.

4.2 Obtenção das amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Todas as amostras utilizadas neste projeto, bem como o preparo e a obtenção das mesmas vieram de uma colaboração com o Prof. Dr. Márcio Adriano Andréo, docente da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), o qual foi orientador do projeto de iniciação científica da Gabriella Lisboa dos Santos, discente da UNIFESP, responsável pela execução dos métodos descritos nesta seção.

4.2.1 Material vegetal

Para este estudo, foram utilizados os caules alados de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae. O material vegetal padrão foi obtido por cultivo de *B. trimera* e identificado pelo Prof. Dr. Ilio Montanari Junior, coordenador da Divisão de Agrotecnologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), localizado em Campinas, SP, Brazil. O material vegetal comercial foi obtido em comércio localizado na Zona Cerealista, no centro da cidade de São Paulo, SP, Brasil. O registro deste estudo no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) recebeu o nº A31EEF9.

4.2.2 Preparo dos extratos

Os caules alados da amostra comercial de *B. trimera* e da amostra padrão foram selecionados manualmente, secos em estufa (NI1525, Nova Instruments®) e triturados em moinho de facas ultracentrífugo (ZM200, RETSCH®).

Os extratos etanólicos da amostra comercial e padrão foram obtidos por percolação etanol 95 % P. A. (Synth®). Inicialmente, uma amostra de 100 g de material moído foi colocada em maceração por 24 horas em 300 mL de etanol 95 %. Em seguida, foi iniciada a primeira etapa da percolação, até serem recolhidos 600 mL, que foram armazenados em vidro âmbar fechados à temperatura ambiente. A segunda etapa da percolação foi retomada até serem recolhidos mais 2 L de extrato. O conteúdo obtido na segunda etapa da percolação passou por secagem em

evaporador rotativo (HeiVAP, Heidolph®) até evaporação total do solvente. O conteúdo, obtido em balão, foi transferido ao extrato obtido na primeira etapa da percolação utilizando etanol 95 %. Por fim, o extratos tiveram seus volumes finais acertados para 1 L, sendo armazenados em frascos âmbar fechados e em geladeira.

Os extratos aquosos da amostra comercial e padrão foram obtidos por infusão em água filtrada em ultrapurificador (MS2000, Gehaka®). A proporção de material vegetal e solvente foi estabelecida seguindo o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011). Uma mostra de 10 g do material moído foi submetida a infusão com 500 mL de água fervente (100 °C). Após 10 minutos, a infusão foi filtrada em algodão e resfriada a temperatura ambiente. O volume final da extração foi ajustado para 500 mL em balão volumétrico. Os extratos aquosos foram armazenados em frasco âmbar fechados e em geladeira.

4.2.3 Isolamento e identificação de flavonoides em *B. trimera* comercial

Uma alíquota de 500 mL do extrato etanólico foi seca em evaporador rotativo. Em seguida, este extrato seco foi lavado com 3 alíquotas de 100 mL de hexano, com auxílio de ultrassom (Ultronique, modelo Q1.8/40^a) por 30 minutos. A parte insolúvel em hexano foi separada, dissolvida em etanol 95%, filtrada em algodão e aplicada em Coluna de Sephadex LH-20 (600 mm X 55 mm), eluída com etanol 95%, sendo coletadas 69 frações de cerca de 50 mL cada. Após análise comparativa por CLAE-DAD, as frações foram reunidas por semelhança. Aqueles grupos de frações que continham os flavonóides foram evaporadas, preparadas em etanol 95 % e purificadas em coluna de Sephadex LH-20 (500 mm x 20 mm). As substâncias purificadas foram evaporadas e depois dissolvidas em 0,5 mL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) 99,9% com 0,03% de TMS (trimetilsilano) (Aldrich®), filtradas e analisadas de ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H em espectrômetro (Bruker®, modelo DPX-300) operando a 300 MHz para ¹H.

As análises comparativas entre os extratos, frações e substâncias purificadas foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE, Agilent Infinity 1260) com detector de arranjo de diodos (DAD). A coluna utilizada foi C-18 Inertsil ODS-3 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm). O volume injetado foi de 20 µL, a vazão de 0,8 mL/min e a temperatura de 30°C. A fase móvel foi composta de ácido acético a 0,5 % (v/v) (A), metanol (B) e acetonitrila (C), sendo o gradiente: 0-3 min (65% A, 30% B

e 5% C), 3-10 min (65-30% A, 30-60% B e 5-10% C), 10-11 min (30-0% A, 60-90% B 10% C), 11-14 (0% A, 90% B 10% C), 14-15 min (0-65% A, 90-30% B e 10-5% C), 15-19 min (65% A, 30% B e 5% C).

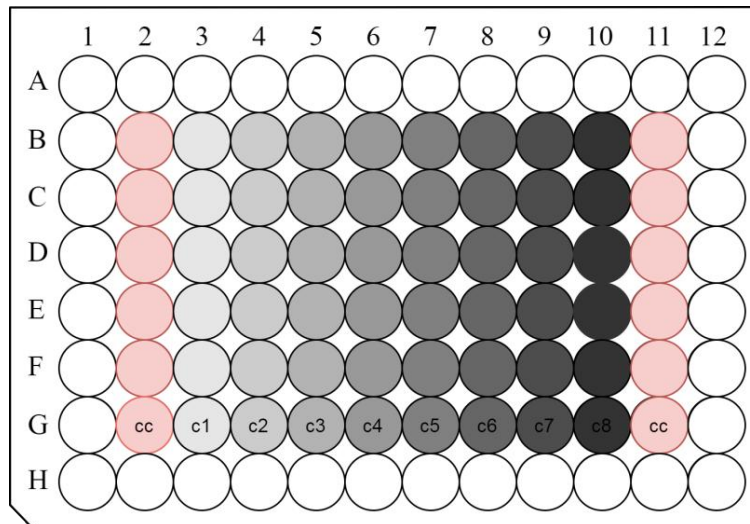
O fracionamento e purificação realizado a partir do extrato etanólico, utilizando principalmente coluna de filtração molecular (Sephadex, LH-20) resultou no isolamento de 3 substâncias. Para cada uma das substâncias foi obtido o espectro de RMN de ^1H , permitindo a identificação dos flavonóides apigenina, quercetina e luteolina.

4.3 Teste de citotoxicidade

4.3.1 Plaqueamento das células

Para a realização deste teste foi utilizada uma microplaca de 96 poços que possui adesão, os quais as células (HaCaT) foram semeadas separadamente para a obtenção dos resultados. Na primeira etapa foi realizado o plaqueamento, onde as células cultivadas foram distribuídas por 60 poços da microplaca, com cada poço contendo 50.000 células. Para isso, as células que estavam em cultivo nas garrafas passaram pelo processo de tripsinização descrito no item 4.1. Após a formação do *pellet* as células foram ressuspensas com meio de cultura no tubo cônico e dessa solução foram retirados 10 μL , que foram aplicados na câmara de Neubauer, um dispositivo que permite a contagem das células em microscópio. Após a contagem, foi possível determinar o volume da solução de células com meio de cultura que era necessário para fazer o plaqueamento, depositando um volume de 100 μL por poço. Para a realização deste teste, as células são aplicadas nos 60 poços internos, que são destinados para os controles positivos (somente células) e aplicação das amostras. No restante dos poços é aplicado somente meio de cultura, caracterizando os brancos do teste, como mostra a Figura 4.

Figura 4 - Demonstração da microplaca de 96 poços para o ensaio de citotoxicidade.



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: CC = controle positivo; c1 (solução menos concentrada) à c8 (solução mais concentrada) = diluições seriadas.

Após a aplicação das células, a placa foi incubada a 37°C em uma estufa com umidade controlada a 5% de CO₂ (modelo 3425, Thermo Scientific™) por 24 horas para a adesão.

4.3.2 Preparo das amostras

Para solubilizar o extrato aquoso foi adicionada uma quantidade de meio de cultura no tubo contendo a amostra, que em seguida passava por um agitador de tubos (Vortex) até a sua solubilização completa. Essa preparação resultou na amostra mais concentrada, a c8, como mostra a Figura 4. Para as demais concentrações foi realizada uma diluição seriada de 1:2 da seguinte maneira: foram separados microtubos para cada diluição (previamente identificados) e neles foram adicionados 750 µL de meio de cultura com o auxílio de uma micropipeta. Do tubo c8, contendo a solução do extrato aquoso, foram retirados 750 µL, que foram passados para microtubo c7. Após a homogeneização, do microtubo c7 foram retirados 750 µL de solução que foram passados para o microtubo c6, e assim por diante até o microtubo c1.

Para a solubilização do extrato hidroalcoólico foi utilizado uma quantidade de álcool 70% e de meio de cultura. Depois da adição dos solventes, o tubo contendo a solução também era colocado em um agitador de tubos. Dependendo da

concentração a ser alcançada em cada teste era necessária a realização de mais diluições para iniciar a diluição seriada, que ocorre da mesma forma que o extrato aquoso.

Já para os flavonoides que também não solubilizavam apenas com o meio de cultura, foi adicionado o dimetilsulfóxido (DMSO), que é um composto muito usado como solvente, e que adicionado nos três flavonoides (quercetina, luteolina e apigenina) permitiram a sua solubilização, juntamente com o meio de cultura. Depois da adição dos solventes nos tubos contendo as amostras, a solubilização também era realizada no agitador de tubos. Com todos os flavonoides era necessária a realização de mais uma diluição para iniciar a diluição seriada, que ocorre da mesma maneira que foram realizadas nas outras amostras. Após a preparação de todas as amostras e suas diluições, a microplaca foi retirada da estufa e os meios foram aspirados. Posteriormente foram aplicados 100 µL de cada solução nos poços destinados para uma análise de cada concentração em sextuplicata. Ao fim das aplicações as microplacas foram incubadas por 48 horas.

4.3.3 Aplicação de MTS/PMS

Após as 48 horas, foi realizada a coloração da placa (com a luz do fluxo apagada) pelo preparo da solução de corante MTS/PMS (Promega®), que foi descongelada em banho termostaticado, a 37 °C. Para cada microplaca a solução de corante continha 10 mL de meio de cultura, 2,4 mL de MTS e 0,12 mL de PMS. Os meios dos poços da microplaca foram removidos, lavados com solução fisiológica (NaCl 0,9% m/v) para a coloração do extrato não interferir no resultado do corante. Após a remoção foram adicionados 100 µL da solução do corante nos poços da microplaca, que em seguida foi incubada por 2 horas. Posteriormente, a leitura das absorbâncias foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas no comprimento de onda de 490 nm (modelo Synergy HT, Biotek®).

4.3.4 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi calculada da seguinte forma: viabilidade celular (%) = $(CT / CC) \times 100$, onde CT é a absorbância das células tratadas e CC a absorbância do controle de células. Com estes valores foi possível obter a curva da viabilidade

celular, utilizando o software Microsoft® Office Excel 2007 e o GraphPad Prism® versão 5.0. Por meio desta curva foi possível encontrar a concentração inibitória de 50% da população em estudo (IC₅₀) que significa a concentração do extrato que induz 50% de lise ou morte celular. Além da IC₅₀ foi encontrada também a concentração inibitória de 10% da população em estudo (IC₁₀), ou seja, a concentração do extrato que induz 10% de lise ou morte celular. Esses valores foram obtidos através da utilização do programa *Phototox* versão 2.0 e pela análise das curvas.

A partir dos valores da IC₅₀ foi possível identificar a dose letal que causa a morte de 50 % da população em estudo (DL₅₀). A DL₅₀ prevê a partir do registro de citotoxicidade (RC) a melhor dose inicial adequada para o ensaio *in vivo* a ser utilizada. Para encontrar o valor da DL₅₀ foi utilizada a Equação 1 (ICCVAM, 2006).

$$\log (\text{DL50 [mg/kg]}) = 0.372 \times \log \text{IC50 } (\mu\text{g/mL}) + 2.024 \quad (1)$$

4.4 Teste de atividade antioxidante

4.4.1 Padronização do ensaio

Para dar início ao ensaio da análise da atividade antioxidante de amostras da *B. trimera* foi necessário realizar uma padronização do teste para estipular a quantidade ideal de células que deveriam ser utilizadas no experimento e verificar qual seria a ordem dos reagentes a serem colocados para uma melhor resposta da ação antioxidante das amostras.

Para isso, foi realizado o plaqueamento, da mesma maneira descrita no item 4.3.1, onde as células cultivadas foram distribuídas em uma microplaca preta de 96 poços, que não reflete e nem espalha luz, necessária no teste devido a utilização de um composto fluorescente. A placa foi dividida em duas porções iguais, de maneira que na primeira metade da placa foram aplicadas 50.000 células por poço e na outra metade 100.000 células por poço. A microplaca foi incubada por 24 horas em uma estufa a 37°C com 5% de CO₂ (modelo 3425, Thermo Scientific™) para a adesão das células.

No dia seguinte, a primeira etapa é a preparação dos reagentes, que são realizadas dentro do fluxo laminar com a luz apagada, para evitar possíveis reações

fotoquímicas e interferências. Este teste é realizado por meio da adição de um composto denominado 2',7' – dicloroflurosceína diacetato (DCFH-DA), e sua preparação consistiu na retirada de 150 μL de DCFH-DA de uma solução mãe de 2000 μM , que foram adicionados em um tubo cônico contendo 4,85 mL de PBS (tampão fosfato-salino) - pH 7,4, totalizando uma solução de 5 mL, volume adequado para o composto ser distribuído pela placa a uma concentração de 60 μM .

Além do DCFH-DA, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também foi utilizado. O H_2O_2 é um agente oxidante que promove a geração de radicais livres e sua preparação ocorreu a partir da diluição de uma solução mãe de H_2O_2 (4M), de onde foram retirados 5 μL e adicionados em 10 mL de PBS, totalizando uma concentração de peróxido de hidrogênio de 2 mM na solução.

Por fim, foi preparada uma solução de N-acetilcisteína (NAC) que é um agente mucolítico e apresenta propriedades antioxidantes comprovadas devido a sua habilidade de reduzir espécies reativas de oxigênio (FUKUZAWA, *et al.*, 1995). Sua preparação foi realizada a partir da pesagem em uma balança analítica de 16,32 mg de NAC que foram diluídos em 10 mL de PBS, caracterizando uma solução mãe de 100 mM. Dessa solução foram retirados 200 μL e adicionados a um tubo cônico contendo 1800 μL de PBS, possuindo uma concentração final de 10 mM.

Em seguida a microplaca preta foi retirada da estufa, os meios foram removidos e os poços lavados duas vezes com PBS - pH 7,4. Logo após, iniciou-se a aplicação das soluções na microplaca, que ocorreu em três etapas da seguinte maneira:

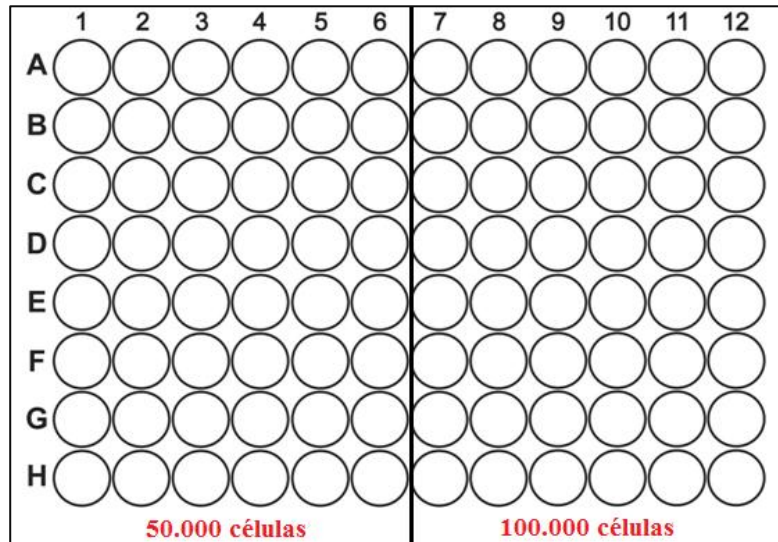
Primeira etapa: foram adicionados 50 μL de DCFH-DA (60 μM) em todos os poços, exceto naqueles presentes na coluna 1 e 7 (Figura 5), que foram adicionados 100 μL de PBS por poço, caracterizando os brancos, sendo analisada a fluorescência apenas das células. Após a adição das soluções a microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Segunda etapa: após 30 minutos a microplaca foi retirada da estufa e em cada poço presente nas colunas 3, 6, 9 e 12 (Figura 5) foram adicionados 50 μL de H_2O_2 (2 mM). Já nos poços presentes nas colunas 4, 5, 10 e 11 (Figura 2) foram aplicados 100 μL da solução de NAC (10 mM) em cada poço. Após a aplicação, a microplaca foi incubada por mais 30 minutos.

Terceira etapa: passando-se os 30 minutos a microplaca foi retirada e nos poços presentes nas colunas 5 e 11 (Figura 5) foram adicionados 50 μL de H_2O_2 (2

mM). Nos poços das colunas 6 e 12 (Figura 5) foram aplicados 100 μ L de NAC (10 mM). Posteriormente a placa foi incubada por mais 30 minutos.

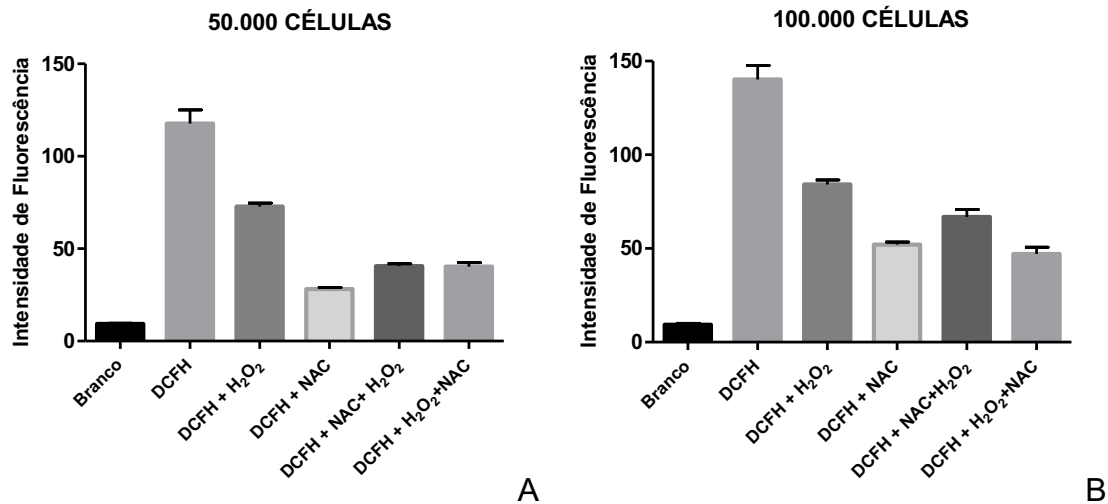
Figura 5 - Representação da microplaca preta de 96 poços utilizada na padronização do teste de atividade antioxidante.



Fonte: elabora pela autora.

Após os 30 minutos, a placa foi retirada e todos os poços foram aspirados. Em seguida foram adicionados 100 μ L de PBS em todos os recipientes e a microplaca foi colocada em um agitador de placas por 10 minutos. Logo após, foi realizada a leitura de fluorescência em um espectrofotômetro com excitação em 485 nm e emissão em 528 nm (modelo Synergy HT, Biotek®). É importante destacar que todos os procedimentos foram realizados na ausência de luz direta na placa para evitar possíveis interferências e reações. Com os valores das fluorescências foram obtidos os gráficos (Gráfico 1).

É possível observar que a sequência de DCFH + H₂O₂ + NAC indicada na Gráfico 1.B promoveu uma ação mais expressiva do composto antioxidante (NAC) quando comparado com a outra sequência de reagentes (DCFH + NAC + H₂O₂), por apresentar uma fluorescência menor. Já no gráfico referente à aplicação de 50.000 células por poço (Gráfico 1.A) é possível perceber que não houve uma diferença significativa na fluorescência comparando-se a sequência de reagentes inseridos. Portanto, definiu-se que o teste deveria ser realizado contendo 100.000 células por poço e que as amostras da *B. trimera* deveriam ser inseridas após o H₂O₂, para uma melhor ação antioxidante.

Gráfico 1 - Fluorescência emitida na padronização do teste de atividade antioxidante.

Fonte: elaborado pela autora.

4.4.2 Ensaio de atividade antioxidante de *B. trimera*

Foi realizado o plaqueamento das células cultivadas em uma microplaca preta de 96 poços, de maneira que fossem aplicadas 100.000 células em cada um dos poços. A microplaca foi incubada em uma estufa a 37°C com 5% de CO₂ (modelo 3425, Thermo Scientific™) por 24 horas para a adesão celular.

Após as 24 horas, todos os seguintes passos foram realizados na ausência de luz direta na microplaca e o experimento seguiu-se com a preparação dos reagentes (DCFH-DA, H₂O₂ e NAC), realizado da mesma maneira descrita no item 4.4.1. No ensaio, além da preparação dos reagentes, ocorreu também a preparação de todas as amostras que foram testadas da *B. trimera*. Com os valores da IC₅₀ encontrados através do teste de citotoxicidade foi possível realizar a aplicação das amostras a uma concentração adequada, que não fossem provocar a lise ou morte de todas as células.

4.4.2.1 Preparo das amostras de *B. trimera*

Neste experimento foram aplicadas duas concentrações diferentes de cada amostra, realizando uma diluição de 1:10, sendo a maior concentração nomeada de C1 e a menor de C2.

Para o extrato aquoso foi utilizado 28,4 mg de uma amostra seca que foi solubilizada em 10 mL de PBS, resultando em uma concentração de C1 = 2840

$\mu\text{g/mL}$. Desta solução foram retirados 150 μL e adicionados em 1350 μL , resultando em $C_2 = 284 \mu\text{g/mL}$.

Para o extrato hidroalcoólico uma amostra seca contendo 52 mg foi solubilizada adicionando 2,6 mL de etanol 70 % e 7,4 mL de PBS. Desta solubilização foram retirados 300 μL que foram adicionados em 2700 μL de PBS resultando em $C_1 = 520 \mu\text{g/mL}$. Para C_2 foram retirados 150 μL que foram aplicados em 1350 μL de PBS obtendo $C_2 = 52 \mu\text{g/mL}$.

Com o flavonoide quercetina uma amostra seca de 2,5 mg foi solubilizada em 125 μL de DMSO e 9,875 mL de PBS resultando em $C_1 = 240 \mu\text{g/mL}$. Desta solução foram retirados 150 μL que foram adicionados em 1350 μL de PBS adquirindo uma concentração de $C_2 = 24 \mu\text{g/mL}$.

Para uma amostra de 2,5 mg de apigenina foi realizado o mesmo procedimento que a quercetina, obtendo as mesmas concentrações de C_1 e C_2 . Já para a luteolina uma amostra seca de 2,5 mg foi solubilizada com 125 μL de DMSO e 9,875 mL de PBS, caracterizando uma solução mãe. Da solução mãe foram retirados 1 mL que foram adicionados em 4 mL de PBS obtendo $C_1 = 50 \mu\text{g/mL}$. Desta solução foram retirados 150 μL que foram adicionados em 1350 μL de PBS, resultando em $C_2 = 5 \mu\text{g/mL}$.

4.4.2.2 Aplicação dos reagentes e amostras

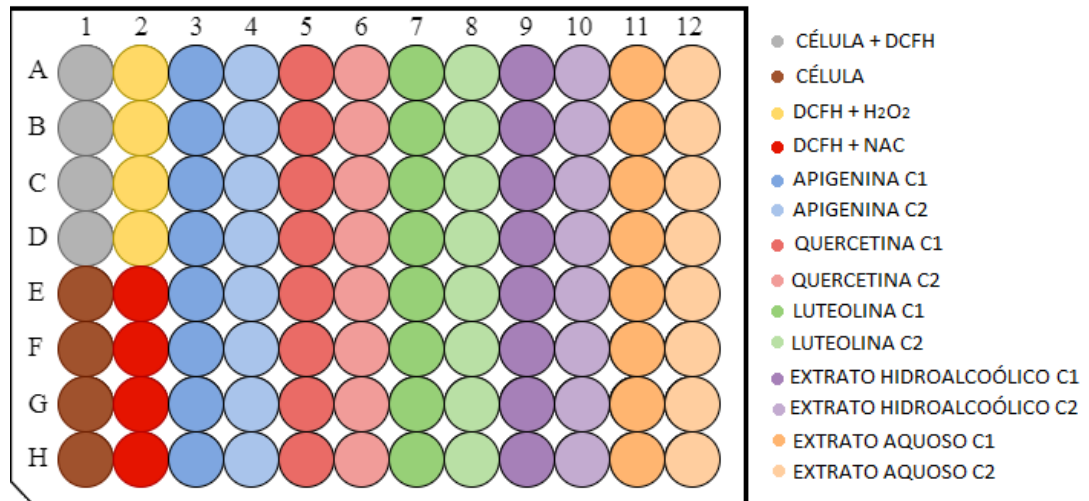
A microplaca foi retirada da estufa, os meios foram aspirados e lavados duas vezes com PBS. Posteriormente iniciou-se a aplicação de 50 μL DCFH-DA (60 μM) em todos os poços, exceto naqueles considerados como o branco, onde foram inseridos 100 μL de PBS. A placa foi incubada a 37°C por 30 minutos.

Após os 30 minutos a microplaca foi retirada da estufa e como visto pela padronização que colocar o H_2O_2 antes do NAC resulta em um potencial antioxidante mais expressivo, em todos os poços destinados à aplicação das amostras da *B. trimera* foram adicionados 50 μL de H_2O_2 . Além destes, também foram aplicados 50 μL de H_2O_2 nos poços designados para o controle positivo do peróxido de hidrogênio. Também nesta etapa foram adicionados 100 μL de NAC nos poços reservados para o controle positivo deste composto, e a microplaca foi incubada por mais 30 minutos.

Em seguida, foram aplicados 100 μL de cada amostra da *B. trimera* nos poços

destinados para avaliar a atividade antioxidante de cada uma. A imagem a seguir retrata a maneira como a microplaca foi montada para a realização do teste:

Figura 6 - Exemplo da montagem da microplaca preta de 96 poços para avaliar a atividade antioxidante de amostras da *Baccharis trimera* (Less.) DC



Fonte: elaborado pela autora.

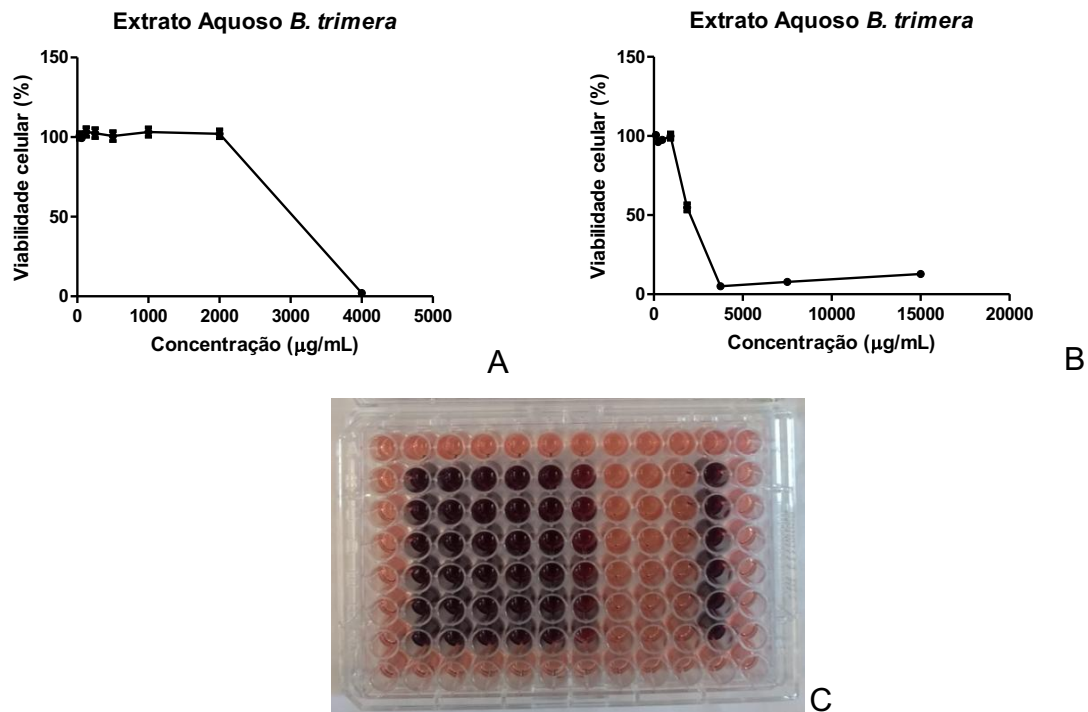
Após a aplicação de todas as amostras a microplaca foi incubada por mais 30 minutos. Posteriormente a placa foi retirada e todos os poços foram aspirados. Em seguida foram adicionados 100 µL de PBS em todos os recipientes e a microplaca foi agitada em um agitador de placas por 10 minutos. Logo após, foi realizada a leitura de fluorescência em um espectrofotômetro com excitação em 485 nm e emissão em 528 nm (modelo Synergy HT, Biotek®) para a obtenção dos resultados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Avaliação da citotoxicidade

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, portanto, o teste de citotoxicidade foi realizado com as amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Para o extrato aquoso, foi realizado um teste inicial com 32 mg de amostra seca, que foi solubilizada e obteve o resultado observado na Figura 7.A.

Figura 7 – Viabilidade das células HaCaT após exposição ao extrato aquoso de *B. trimera*.



Fonte: própria autora.

Legenda: Curva da primeira análise da viabilidade das células em contato com o extrato aquoso de *Baccharis trimera* (Less.) DC (A); curva da segunda análise (B); foto da coloração observada na microplaca após a aplicação do corante vital MTS/PMS (C).

Na Figura 7.A, foi possível observar que apenas a concentração em 4000 µg/mL apresentou toxicidade às células. Diante disso foi realizado outro teste para aumentar a área da curva e para a obtenção de melhores resultados. Com isso, em outra amostra seca do extrato aquoso contendo 30 mg foi adicionada uma quantidade menor de meio de cultura, de maneira que fosse aumentada a concentração da solução, resultando na curva representada na Figura 7.B, e na Figura 7.C mostrando o resultado da microplaca.

Com a melhora dos resultados, o teste foi repetido da mesma maneira e a curva apresentou o mesmo padrão. Com isso foi possível identificar os valores da IC_{50} e IC_{10} (Tabela 1) com a utilização do software *Phototox* versão 2.0, e o valor da DL_{50} utilizando a equação apresentada no item 4.4.4.

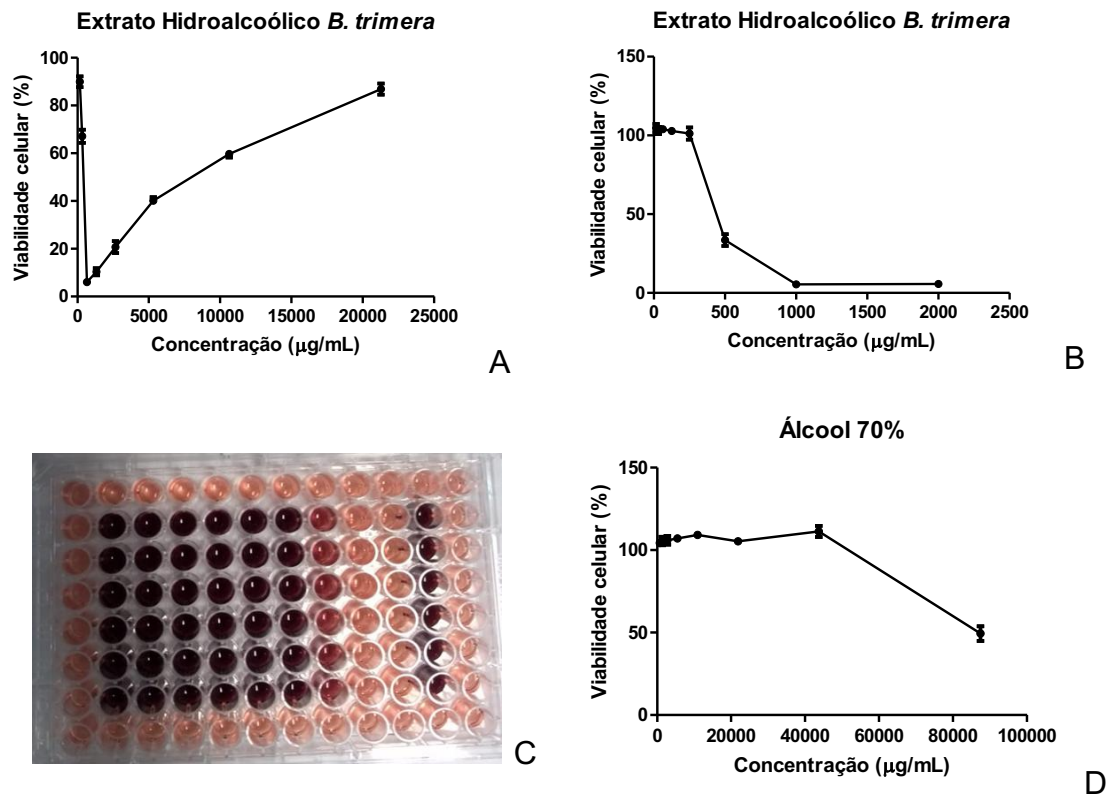
Tabela 1 - valores do IC_{50} , IC_{10} e DL_{50} do extrato aquoso de *B. trimera*.

Parâmetro	Concentração
IC_{50}	1961 $\mu\text{g/mL}$
IC_{10}	1508,7 $\mu\text{g/mL}$
DL_{50}	1773,4 mg/kg

Fonte: elaborado pela autora.

Já para o extrato hidroalcoólico, após a verificação de que sua solubilização não era possível apenas com meio de cultura, foi realizado um teste adicionando 765 μL de álcool 70% e 265 μL de meio de cultura a uma amostra seca contendo 153 mg de extrato hidroalcoólico. Esta foi homogeneizada e diluída, obtendo assim a seguinte curva (Figura 8.A).

Figura 8 – Viabilidade das células HaCaT após exposição ao extrato hidroalcoólico de *B. trimera*.



Fonte: própria autora.

Legenda: Curva da primeira análise da viabilidade das células em contato com o extrato hidroalcoólico de *Baccharis trimera* (A); curva da segunda análise (B); foto indicando a coloração da microplaca após a utilização do corante vital MTS/PMS (C); curva da viabilidade das células em contato com o álcool 70% nas mesmas concentrações utilizadas para diluição do extrato hidroalcoólico (D).

Com a curva apresentada na Figura 8.A foi possível verificar que houve uma interferência do extrato durante a leitura devido a sua coloração, e que a concentração que apresentava maior toxicidade às células estava em torno de 2000 µg/mL. Diante disso foi realizado outro teste para que fosse evitada essa interferência e para ampliar a área da curva para melhores resultados. Com isso, em uma amostra seca do extrato hidroalcoólico contendo 20 mg foram adicionados 1 mL de álcool 70% e 9 mL de meio de cultura, obtendo a curva 8.B, decorrente da Figura 8.C.

Estes resultados levaram a identificação de uma melhora da curva com a diminuição da concentração. Para verificar que o solvente não estava interferindo no resultado foi realizado um ensaio utilizando apenas o solvente sem o extrato hidroalcoólico. Portanto foi feita uma solução contendo 1 mL de álcool 70% e 9 mL de meio de cultura, resultando na curva da Figura 8.D.

Na Figura 8.D nota-se que o solvente não interferiu nos resultados, mesmo o último ponto apresentando uma viabilidade celular menor. O teste com o extrato foi repetido da mesma maneira para a confirmação dos resultados e a curva apresentou o mesmo padrão. Com isso foram obtidos os valores descritos na Tabela 2

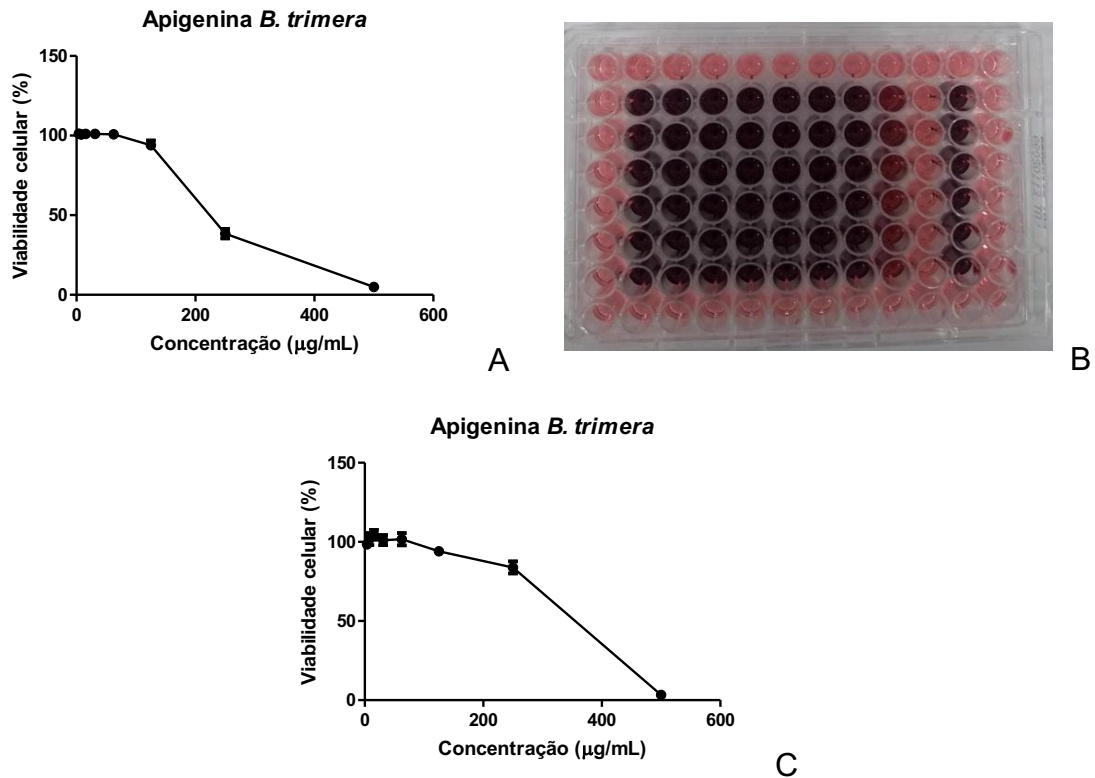
Tabela 2 - valores de IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ do extrato hidroalcoólico de *B. trimera*.

Parâmetro	Concentração
IC ₅₀	460 µg/mL
IC ₁₀	356,6 µg/mL
DL ₅₀	1034,1 mg/kg

Fonte: elaborado pela autora.

Para o flavonoide apigenina o teste foi realizado utilizando o DMSO como solvente, assim como nos outros dois flavonoides. Para uma amostra seca de apigenina contendo 3,5 mg foi adicionado 180 µL de DMSO e 820 µL de meio de cultura. Após homogeneização e diluição da solução, foi obtida a curva 9.A. Na Figura 9.B é possível observar o resultado da microplaca.

Figura 9 – Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonoide apigenina de *B. trimera*.



Fonte: própria autora.

Legenda: Curva da primeira análise da viabilidade das células em contato com o flavonoide apigenina da *Baccharis trimera* (Less.) DC (A); foto da coloração da microplaca com MTS/PMS (B); curva obtida com a solução de apigenina armazenada em geladeira após 4 semanas (C).

Por apresentar um perfil de viabilidade celular adequado (Figura 9.A) foi realizado outro teste para a confirmação dos dados, porém como se tratava de uma amostra de difícil isolamento, o ensaio foi realizado com a mesma solução do teste anterior, que foi armazenada na geladeira durante um período de 4 semanas. Com isso, obteve-se a curva 9.C.

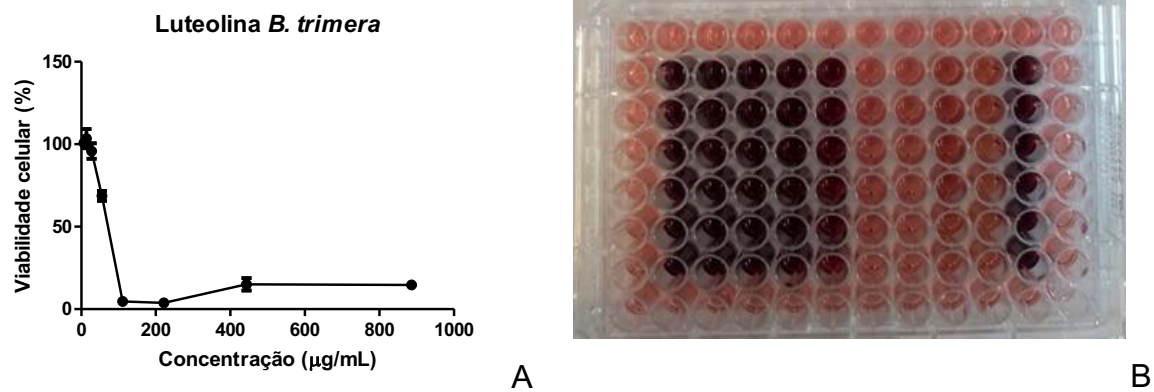
Com esta curva da Figura 9.C foi possível observar que a apigenina em solução perde relativamente sua atividade, destacando principalmente o ponto referente à c7, porém apresentou um perfil similar de c1 a c6 comparado ao teste anterior. Com isso os valores da IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ foram retirados do primeiro ensaio, gerando os valores descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - valores do IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ do flavonoide apigenina da *B. trimera*.

Parâmetro	Concentração
IC ₅₀	240 µg/mL
IC ₁₀	145,4 µg/mL
DL ₅₀	811,8 mg/kg

Fonte: elaborado pela autora.

Já a preparação para uma amostra seca do flavonoide luteolina contendo 6,2 mg foi adicionado 310 µL de DMSO e 690 µL de meio de cultura. Após homogeneização e diluição da solução obteve-se a curva 10.A.

Figura 10 – Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonoide luteolina de *B. trimera*.

Fonte: própria autora.

Legenda: Curva da viabilidade das células em contato com o flavonoide luteolina de *Baccharis trimera* (Less) DC (A); foto da coloração da microplaca com MTS/PMS (B).

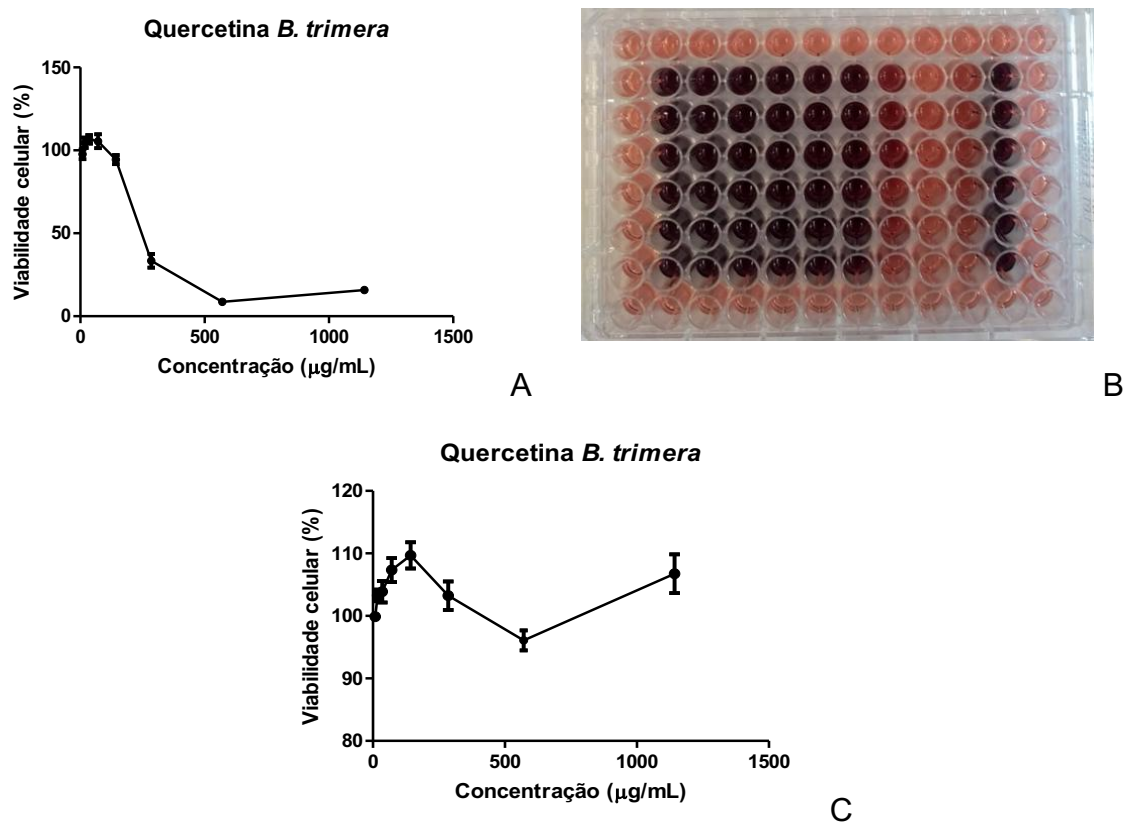
Diante da Figura 10.A e 10.B observa-se que possivelmente houve uma interferência da amostra devido à sua coloração nos dois últimos pontos, mas que não prejudicava na determinação da viabilidade celular e nos valores da IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀. Com o resultado, os valores foram descritos na Tabela 4.

Tabela 4: valores do IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ do flavonoide luteolina da *B. trimera*.

Parâmetro	Concentração
IC ₅₀	50 µg/mL
IC ₁₀	28,5 µg/mL
DL ₅₀	452,9 mg/kg

Fonte: elaborado pela autora.

Por fim, para o flavonoide quercetina foram adicionados 400 µL de DMSO e 600 µL de meio de cultura em uma amostra seca contendo 8 mg, sendo esta homogeneizada e diluída. Obteve-se o resultado descrito na Figura 11.A e 11.B

Figura 11 – Viabilidade das células HaCaT após exposição ao flavonoide quercetina de *B. trimera*.

Fonte: própria autora.

Legenda: Curva da primeira análise da viabilidade das células em contato com o flavonoide quercetina de *Baccharis trimera* (Less.) DC (A); foto ilustrativa da coloração da microplaca com MTS/PMS (B); curva obtida com a solução de quercetina armazenada em geladeira após 2 semanas (C).

Com a obtenção deste resultado foi realizado outro teste para a sua confirmação, porém, assim como a apigenina, foi utilizada a mesma amostra para a realização do novo ensaio, que ficou armazenada por 2 semanas na geladeira,

resultando na curva 11.C.

Na Figura 11.C é possível observar que a quercetina em solução, após um período de tempo, perde quase que por completo a sua atividade, mantendo a viabilidade celular em todos os pontos acima de 90%. Com isso, os valores da IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ foram retirados da primeira análise, resultando nos valores descritos na Tabela 5.

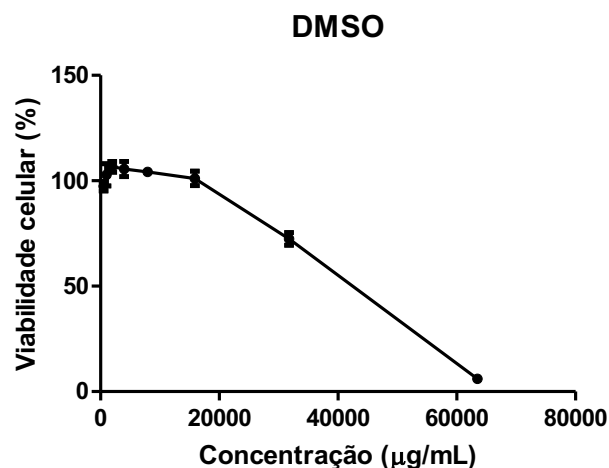
Tabela 5 - valores do IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ do flavonoide quercetina de *B. trimera*.

Parâmetro	Concentração
IC ₅₀	241,3 µg/mL
IC ₁₀	151,5 µg/mL
DL ₅₀	813,4 mg/kg

Fonte: elaborado pela autora.

Como todos os flavonoides utilizaram como solvente o DMSO, foi realizado um ensaio para verificar se o uso deste composto influenciava nos resultados. Como a quercetina é o flavonoide que utiliza uma maior quantidade de DMSO o teste se iniciou a partir da diluição de 400 µL de DMSO em 600 µL de meio de cultura como foi realizado com os flavonoides. O ensaio com o solvente resultou na curva apresentada no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Porcentagem da viabilidade das células em contato com o solvente DMSO.



Fonte: própria autora.

Diante desta curva é possível analisar que o DMSO tem influência no último ponto, o qual possui a mesma quantidade presente na solução mais concentrada da

quercetina. Porém, observando a curva 11.A da quercetina é possível verificar que o ponto referente à c7 e c6 apresentam viabilidade celular abaixo de 50%, diferente da curva contendo apenas o solvente, mostrando que nesses pontos a ação foi do flavonoide. Diante disso é possível concluir que o solvente não influenciou diretamente nos resultados dos três flavonoides, uma vez que as quantidades usadas tanto na apigenina quanto na luteolina foram ainda menores.

Na Tabela 6 é possível visualizar, de um modo geral, os resultados obtidos neste experimento e compará-los.

Tabela 6 – comparativo dos valores do IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀ das amostras da *Baccharis trimera* (Less)DC.

Amostra	IC₅₀ (µg/mL)	IC₁₀ (µg/mL)	DL₅₀ (mg/kg)
Extrato Aquoso	1961,0	1507,8	1773,4
Extrato Hidroalcoólico	460,0	356,6	1034,1
Apigenina	240,0	145,4	811,8
Luteolina	50,0	28,5	452,9
Quercetina	241,3	151,5	813,4

Fonte: elaborado pela autora.

Ao analisar os resultados obtidos nos experimentos de citotoxicidade, nota-se que o extrato aquoso foi a amostra que demandou uma maior concentração, dentre todas, para causar toxicidade às células. Já a luteolina foi a amostra que apresentou maior toxicidade, possuindo sua IC₅₀ em apenas 50 µg/mL. Além disso, observa-se que todos os flavonoides reduziram a viabilidade celular em concentrações menores do que os extratos, indicando que eles possuem uma maior toxicidade. Li *et al.*, (2008) desenvolveram uma pesquisa testando a citotoxicidade de diversos flavonoides, indicando que em doses elevadas eles apresentam toxicidade e que seu uso em grandes quantidades não deve ser incentivado.

Pelos valores da Tabela 6 é possível observar que após os flavonoides isolados, o composto que necessita de uma menor concentração para apresentar citotoxicidade é o extrato hidroalcoólico. Isso é decorrente da quantidade de flavonoides encontrados nesse extrato, uma vez que o isolamento dos mesmos é

feitos a partir do extrato hidroalcoólico.

Na literatura já foram relatados estudos sobre a citotoxicidade dos extratos, como no estudo de Grance *et al.* (2008) onde foi verificada a toxicidade do extrato hidroalcoólico da *B. trimera* em uma concentração de 8,4 mg/kg em ratas grávidas, que acabaram apresentando toxicidade nas células renais e hepáticas, embora essas reações fossem reversíveis com a interrupção da administração. Já Rabelo *et al.* (2018) demonstrou que o extrato hidroalcoólico possui uma baixa citotoxicidade em células hepáticas, encontrando o valor de IC₅₀ na concentração mais alta testada, mostrando boas perspectivas para o extrato.

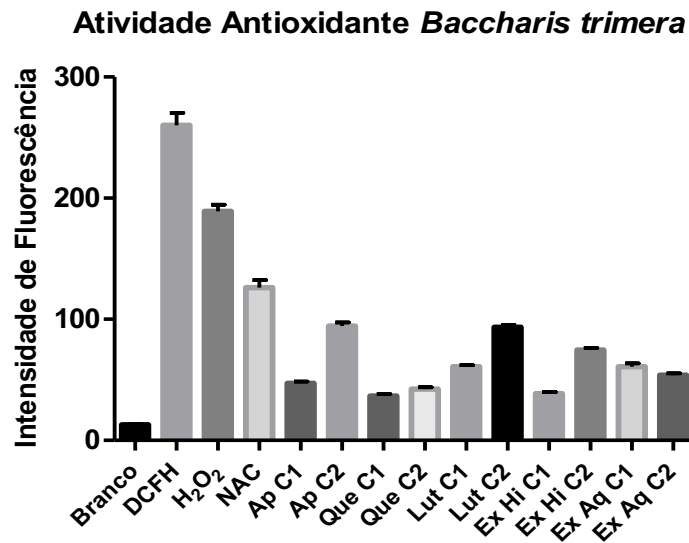
Quanto ao extrato aquoso, Pinho *et al.* (2010) realizaram um estudo para avaliar o potencial citotóxico da infusão da *B. trimera* em células de raízes de *Allium cepa*. A pesquisa indicou um crescimento de anomalias no ciclo mitótico das células em doses usuais de 20g/L do chá de carqueja, e doses dez vezes mais concentradas indicaram efeitos antiproliferativos e mutagênicos, levando a indicação do uso com moderação do chá pelos autores. Dos Santos *et al.* (2018) também identificaram efeitos citotóxicos e mutagênicos no extrato aquoso devido a descoberta de um novo glicosídeo isolado da *B. trimera*, mostrando a importância de novos estudos.

Diante disso, nota-se a importância desta análise, pois além do estabelecimento de concentrações seguras para o prosseguimento deste trabalho, ainda não são encontrados números expressivos de estudos na literatura voltados à utilização da carqueja como ativo cosmético, e a verificação da citotoxicidade especificamente em células da pele de seus extratos e flavonoides demonstram ser de grande relevância.

5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Com a utilização do composto DCFH-DA foi realizado o ensaio para analisar o potencial antioxidante das amostras da *Baccharis trimera* (Less.) DC, resultando no Gráfico 2.

Gráfico 3 - Atividade antioxidante da *Baccharis trimera* (Less) DC. em intensidade de fluorescência (nm).



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: Branco = apenas células. DCFH = 2',7' – diclorofluoresceína diacetato (60 μ M). H₂O₂ = peróxido de hidrogênio (2 mM). NAC = N-acetilcisteína (10 mM). Ap C1 = apigenina (240 μ g/mL). Ap C2 = apigenina (24 μ g/mL). Que C1 = quercetina (240 μ g/mL). Que C2 = quercetina (24 μ g/mL). Lut C1 = luteolina (50 μ g/mL). Lut C2 = luteolina (5 μ g/mL). Ex. Hi C1 = extrato hidroalcoólico (520 μ g/mL). Ex. Hi C2 = extrato hidroalcoólico (52 μ g/mL). Ex. Aq C1 = extrato aquoso (2840 μ g/mL). Ex. Aq C2 = extrato aquoso (284 μ g/mL).

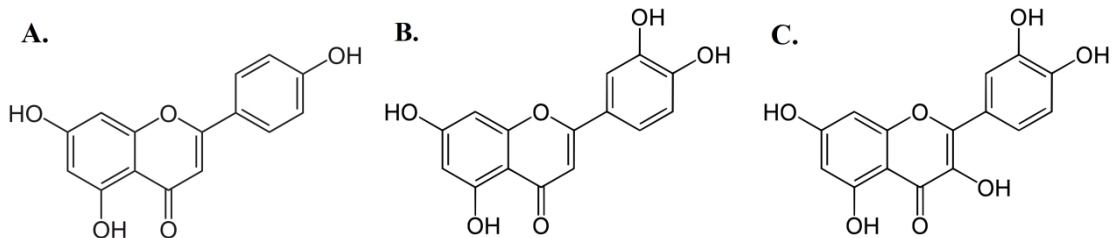
O Gráfico 3 mostra que o composto que apresentou maior intensidade de fluorescência foi o DCFH. Com isso, a análise dos resultados foi baseada na comparação com o maior valor de fluorescência para indicar a porcentagem da atividade antioxidante de cada amostra. Portanto, a N-acetilcisteína (NAC), que possui sua atividade antioxidante comprovada, obteve como resultado um potencial antioxidante de 52,3%. Todas as amostras da *B. trimera* analisadas possuem atividade antioxidante e todas apresentaram maior potencial nas maiores concentrações, exceto o extrato aquoso, que expressou um potencial maior em C2. As amostras demonstraram uma atividade antioxidante mais elevada que o padrão, indicando o extrato aquoso com um potencial de 80,5%; extrato hidroalcoólico com 86,0%; luteolina com 78,0%; apigenina com 83,0% e quercetina com 86,8%. Dessa forma, o flavonoide quercetina é o composto que possui maior atividade antioxidante, porém é necessário destacar o extrato hidroalcoólico que apresentou um potencial parecido e que possui uma extração menos complexa e de melhor custo-benefício.

Conforme descrito na literatura, o composto DCFH não reage diretamente

com peróxido de hidrogênio para formar as espécies fluorescentes, o DCF. No entanto, várias espécies que oxidam um elétron, convertem o DCFH a DCF e o mesmo é indicado para reconhecimento da sinalização de mecanismo redox (KALYANARAMAN *et al.*, 2012). Podemos observar no Gráfico 2, que o H₂O₂ realmente não causou um estresse oxidativo elevado, indicando que o experimento tem validade.

Assim como relatado sobre a ação citotóxica, o efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico possivelmente também pode ser explicado pela presença e ação dos flavonoides. Conforme explicado no item 2.3 a ação antioxidante de um flavonoide está ligada à sua estrutura química, como podemos observar na Figura 12 a seguir.

Figura 12 – Estrutura química dos flavonoides apigenina (A) luteolina (B) e quercetina (C).



Fonte: Adaptado de TIAN, C., 2021.

Na Figura 12 é possível perceber que todos os flavonoides possuem estruturas muito parecidas e que todos apresentam grupos hidroxila (OH), o que indica sua capacidade antioxidante. Nota-se que a quercetina é o composto que apresenta esses grupos em maior quantidade, e talvez por isso seja a substância de maior potencial.

Não há estudos envolvendo os extratos e flavonoides da *B. trimera* em células HaCaT, desta forma, não é viável a comparação dos resultados obtidos neste estudo com outros descritos na literatura, porém vale ressaltar evidências sobre a promissora atividade antioxidante dos extratos desta planta.

A maioria dos estudos encontrados na literatura utilizam o radical 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH), para determinar a atividade antioxidante da *B. trimera*, como mostra Dias *et al.*, (2009) que identificaram uma atividade antioxidante em frações e extratos da carqueja em comparação a vitamina E (comumente utilizada em cosméticos), principalmente de frações de etanol absoluto e 50% em concentrações de 25 µg/mL que expressaram um potencial antioxidante próximo a 70%. Já Pádua

et al., (2010) mostrou que o extrato hidroetanólico de *B. trimera* reduziu a liberação de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicando um grande potencial antioxidante de maneira dose-dependente mesmo em concentrações muito baixas (5 µg/mL) que conseguiu inibir a produção de EROs em 85%.

Dos Reis Lívero, *et al.* (2016) relataram que o extrato hidroalcoólico de *B. trimera* promove um aumento da expressão de Nrf2, um regulador da resposta antioxidante do organismo, mostrando seu efeito da diminuição de EROs. Já Rabelo *et al.* (2018) utilizando o carboxi-H2DCFDA mostraram que um pré-tratamento com o extrato hidroalcoólico reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio em células HepG2 incubadas com etanol à níveis similares ao controle negativo (células não incubadas com etanol), evidenciando a relevância do extrato.

Sabir *et al.* (2017) evidenciaram o potencial antioxidante do extrato aquoso da *B. trimera*, sendo o primeiro trabalho a identificar a presença de rutina (um flavonoide) nesse extrato, reforçando a ação antioxidante dos flavonoides e destacando as folhas da *B. trimera* como fonte natural promissora de antioxidantes.

Suzuki, *et al.* (2017) cita que o óleo essencial da carqueja é um dos dez óleos mais consumidos pela indústria no Brasil, sendo uma delas a indústria a cosmética, portanto o presente estudo utilizando os extratos é muito promissor. Além disso, Grombone-Guaratini, *et al.* (2020) citam evidências que demonstram uma forte relação na utilização de extratos vegetais em formulações fotoprotetoras, e que em muitos casos há uma melhora da performance do produto utilizando um composto natural.

Como é possível observar, muitas pesquisas indicam o grande potencial da *Baccharis trimera* (Less) DC na ação antioxidante, mostrando ser uma planta muito benéfica. Mais pesquisas relatando o uso desta planta na pele humana precisam ser realizadas, porém, neste estudo, além de ser comprovada uma expressiva ação antioxidante de todas as amostras, a avaliação do efeito antioxidante em células presentes na epiderme contribuíram significativamente para evidenciar o potencial da *B. trimera* como uma futura matéria-prima cosmética, ajudando no combate aos sinais do envelhecimento cutâneo precoce e nos demais efeitos causados pelos radicais livres.

6. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo revelaram a importância da análise da citotoxicidade das amostras da *B. trimera* para o estabelecimento de concentrações eficazes e seguras, para o prosseguimento do estudo e obtenção de melhores resultados, mantendo assim a viabilidade das células para a análise da atividade antioxidante e permitindo a identificação dos valores da IC₅₀, IC₁₀ e DL₅₀, que são parâmetros importantes em análises *in vitro*.

Os resultados mostraram uma promissora atividade antioxidante da *Baccharis trimera* (Less) DC, revelando a importante ação dos flavonoides no combate aos radicais livres, sendo destacada principalmente a ação do extrato hidroalcoólico, por ser um composto de fácil extração, de menor complexidade e de melhor custo-benefício, que demonstrou elevada porcentagem na ação antioxidante. A pesquisa evidenciou ativos de origem natural que podem trazer diversos benefícios à população e que pesquisas voltadas à carqueja mostram ser de extrema relevância para seu uso futuro em cosméticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, Maria José; BERMEJO, Paulina. Baccharis (Compositae): a review update. **Arkivoc**, v. 7, n. 7, p. 76-96, 2007.

ALI, Syed Saqib et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of food biochemistry**, v. 44, n. 3, p. e13145, 2020.

ANTIGNAC E, NOHYNEK GJ, RE T, CLOUZEAU J and TOUTAIN H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. *Food Chem Toxicol* 49: 324-341, 2011.

APAK, Reşat et al. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 5, p. 997-1027, 2016.

BARLTROP, J. A.; OWEN, T. C.; CORY, A. H; CORY, J.G. "5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulphophenyl) tetrazolium, Inner Salt (MTS) and Related Analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reducing to Purple water-soluble Formazans as cell-viability Indicators", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 1, n. 11, pp.611-614, 1991.

BIONDO, Thais Maira A. et al. Antisecretory actions of Baccharis trimera (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: Analysis of underlying mechanisms. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 368-373, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

CALEJA, Cristina et al. A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. **Food chemistry**, v. 216, p. 342-346, 2017.

DIAS, Larissa Funabashi de Toledo et al. Atividades antiúlcera e antioxidante Baccharis trimera (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1B, p. 309-314, 2009.

DOS REIS LIVERO, Francislaine A. et al. Hydroethanolic extract of Baccharis trimera ameliorates alcoholic fatty liver disease in mice. **Chemico-biological interactions**, v. 260, p. 22-32, 2016.

DOS SANTOS, Marcela Silva et al. Biotoxicological analyses of trimeroside from Baccharis trimera using a battery of in vitro test systems. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018.

EMERIT, Ingrid. Free radicals and aging of the skin. **Free radicals and aging**, p. 328-341, 1992.

FUKUZAWA, Kengo et al. N-acetylcysteine ameliorates reperfusion injury after warm hepatic ischemia. **Transplantation**, v. 59, n. 1, p. 6-9, 1995.

GENE, Rosa M. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Baccharis trimera*: identification of its active constituents. **Planta medica**, v. 62, n. 03, p. 232-235, 1996.

GEORGIEV, Vasil; ANANGA, Anthony; TSOLOVA, Violeta. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

GILABERTE, Y.; GONZÁLEZ, S. Update on photoprotection. **Actas Dermo-Sifiligráficas** v. 101, n. 8, p. 659-672, 2010.

GRANCE, Simone Reschke Mendes et al. *Baccharis trimera*: effect on hematological and biochemical parameters and hepatorenal evaluation in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 28-33, 2008.

GROMBONE-GUARATINI, Maria Tereza et al. Antioxidant and Photoprotective Properties of Neotropical Bamboo Species. **Plant Antioxidants and Health**, p. 1-35, 2020.

GROOTHUIS, Floris A. et al. Dose metric considerations in in vitro assays to improve quantitative in vitro–in vivo dose extrapolations. **Toxicology**, v. 332, p. 30-40, 2015.

GULCIN, İlhami. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, v. 94, n. 3, p. 651-715, 2020.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal Of Pharmacology*. n.142, p.231-255, 2004.

HASHEMI, Zahra; EBRAHIMZADEH, Mohammad Ali; KHALILI, Masoumeh. Sun protection factor, total phenol, flavonoid contents and antioxidant activity of medicinal plants from Iran. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 7, p. 1443-1448, 2019.

ICCVAM, 2006. **Peer review panel report**: The use of *in vitro* basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication n°: 07-4519. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Disponível: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf>. Acesso em: 10 de Outubro de 2022.

JANSEN, R.; OSTERWALDER, U.; WANG, S. Q.; BURNETT, M.; LIM, H. W. Photoprotection: Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 6, p. 1–14, 2013.

JUAN, Celia Andrés et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

KALYANARAMAN, Balaraman et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free radical biology and medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.

KARAK, Prithviraj. Biological activities of flavonoids: an overview. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, n. 4, p. 1567-1574, 2019.

KARAM, Thaysa Ksiaskiewicz et al. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. **Rev. bras. plantas med**, v. 15, n. 2, p. 280-286, 2013.

KUSUMAWATI, Idha; INDRAYANTO, Gunawan. Natural antioxidants in cosmetics. **Studies in natural products chemistry**, v. 40, p. 485-505, 2013.

LI, Na et al. Comparative evaluation of cytotoxicity and antioxidative activity of 20 flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 56, n. 10, p. 3876-3883, 2008.

MALICH, Gregor; MARKOVIC, Boban; WINDER, Chris. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v. 124, n. 3, p. 179-192, 1997.

MANSUR, MCPPR et al. Evaluation of the antioxidant and phototoxic potentials of *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz leaf extracts. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 31, n. 2, p. 200-206, 2012.

MARTINEZ-TOME, Magdalena et al. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of food protection**, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MOROCHO-JÁCOME, Ana Lucía et al. In vivo SPF from multifunctional sunscreen systems developed with natural compounds—A review. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 20, n. 3, p. 729-737, 2021.

MUNTEANU, Irina Georgiana; APETREI, Constantin. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3380, 2021.

NUNES, Alesandra R. et al. Use of flavonoids and cinnamates, the main photoprotectors with natural origin. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2018.

OLIVEIRA, Cristiane B. et al. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 1113-1123, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Series on testing and assessment Test No. 129: guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocus/oecd/oecd-gd129.pdf>>. Acesso em 8 de Outubro de 2022.

PÁDUA, B.C.; SILVA L.D.; ROSSONI Junior, J.V.; HUMBERTO, J.L.; CHAVES, M.M.; SILVA, M.E.; PEDROSA, M.L.; COSTA, D.C. Antioxidant properties of *Baccharis trimera* in the neutrophils of Fisher rats. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 381–386, 2010.

PERON, Ana Paula et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L., em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 2, 2008.

PHANIENDRA, Alugoju; JESTADI, Dinesh Babu; PERIYASAMY, Latha. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian journal of clinical biochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-26, 2015.

PINHO, D.S.; STURBELLE, R.T.; MARTINO-ROTH, M.G.; GARCIAS, G.L. Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa* e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.20, n.2, p.165-170, 2010.

POLJSAK, Borut; SUPUT, Dusan; MILISAV, Irina. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013.

RABELO, Ana Carolina Silveira et al. *Baccharis trimera* protects against ethanol induced hepatotoxicity in vitro and in vivo. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 1-13, 2018.

RABELO, Ana Carolina Silveira; COSTA, Daniela Caldeira. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 296, p. 65-75, 2018.

ROGERO, Sizue Ota et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, p. 317-320, 2003.

SABIR, S. M. et al. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. **South African Journal of Botany**, v. 113, p. 318-323, 2017.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. Francenia et al. Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. **Antioxidants**, v. 10, p. 1-29, 2019.

SEERAM, Navindra P.; HEBER, David. Impact of berry phytochemicals on human health: Effects beyond antioxidation. Chapter 21; 2006.

SHARMA, Ganesh N.; GUPTA, Gaurav; SHARMA, Piyush. A comprehensive review of free radicals, antioxidants, and their relationship with human ailments. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 28, n. 2, 2018.

SJABELSKI, Roni Santi. **PLANTAS MEDICINAIS DE USO POPULAR NO MUNICÍPIO DE MAJOR VIEIRA/SC**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

SOICKE, Hartwig; LENG-PESCHLOW, Elke. Characterisation of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. **Planta Medica**, v. 53, n. 01, p. 37-39, 1987.

SUZUKI, Érika Yoko et al. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC.(carqueja-amarga). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 3, p. 346-358, 2017.

TIAN, Chunlian et al. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 257-264, 2021.

VELASCO, Maria Valéria Robles et al. Broad spectrum bioactive sunscreens. **International journal of pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 50-57, 2008.

VERDI, Luiz Gonzaga; BRIGHENTE, Inês Maria Costa; PIZZOLATTI, Moacir Geraldo. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química nova**, v. 28, p. 85-94, 2005.

VIHAKAS, M. **Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Characterization and Interactions with Lepidopteran and Sawfly larvae**. Turun yliopisto University of Turku, Turku, Finland, 2014.

VINARDELL, María Pilar; MITJANS, Montserrat. Nanocarriers for delivery of antioxidants on the skin. **Cosmetics**, v. 2, n. 4, p. 342-354, 2015.

WANG, Wei; KANNAN, Kurunthachalam. Quantitative identification of and exposure to synthetic phenolic antioxidants, including butylated hydroxytoluene, in urine. **Environment international**, v. 128, p. 24-29, 2019.

ZHONG, Qiwu et al. The antioxidant activity of polysaccharides derived from marine organisms: An overview. **Marine drugs**, v. 17, n. 12, p. 674, 2019.



Antioxidant and Photoprotective Properties of Neotropical Bamboo Species

11

Maria Tereza Grombone-Guaratini, Cláudia Maria Furlan,
Patricia Santos Lopes, Karine Pires Barsalobra, Vânia R. Leite e Silva,
and Paulo Roberto H. Moreno

Contents

1	Introduction	232
2	Neotropical Bamboos: Diversity, Distribution, and Ecology	233
3	Antioxidant Properties of Neotropical Bamboos	236
3.1	Antioxidant Secondary Metabolites	236
3.2	In Vitro Tests and Safety Assessment of Antioxidant Compounds	240
3.3	Antioxidant Properties	246
3.4	Environmental Influence on the Antioxidant Potential	249
4	Photoprotective Activity	252
4.1	The Importance of Photoprotection	252
4.2	Sunscreen Effectiveness Test	253
4.3	Photoprotection X Antioxidant Activity	254
4.4	Neotropical Bamboo Photoprotective Action	255
5	Conclusion	257
	References	257

M. T. Grombone-Guaratini

Núcleo de Pesquisa em Ecologia, Instituto de Botânica -SMA/SP, São Paulo, Brazil

C. M. Furlan

Departamento de Botânica, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

e-mail: furlancm@ib.usp.br

P. S. Lopes · K. P. Barsalobra · V. R. Leite e Silva

Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

e-mail: patricia.lopes@unifesp.br; vania.leite@unifesp.br

P. R. H. Moreno (✉)

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

e-mail: prmoreno@iq.usp.br

Reference Series in Phytochemistry

Series Editors:

J.-M. Mérillon · K.G. Ramawat

SPRINGER NATURE

Reference



Halina Maria Ekiert
Kishan Gopal Ramawat
Jaya Arora *Editors*

Plant Antioxidants and Health



Springer

POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Baccharis trimera* (LESS.) DC: CARQUEJA COMO ATIVO COSMÉTICO?

Karine Pires Barsalobra¹; Gabriella Lisboa dos Santos¹; Márcio Adriano Andreo¹; Patricia Santos Lopes¹

¹Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas – UNIFESP – Campus Diadema

INTRODUÇÃO

Radicais livres produzidos em excesso podem gerar diversos danos ao organismo, assim como para a pele, causando efeitos como a perda de elasticidade e aceleração no aparecimento de rugas. Os antioxidantes são capazes de minimizar ou prevenir esses danos, reduzindo a formação de radicais livres e impedindo a destruição do colágeno e elastina. A *Baccharis trimera* (Less.) DC, conhecida popularmente como carqueja, é uma planta que possui uma grande quantidade de flavonoides, que são indicados como potenciais antioxidantes naturais.

OBJETIVO

Avaliar a citotoxicidade e a atividade antioxidante, *in vitro*, do extrato aquoso, extrato hidroalcoólico e de três flavonoides (apigenina, luteolina e quercetina) obtidos das partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados (HaCat).

METODOLOGIA

Teste de citotoxicidade

Pelo método de coloração com a solução de MTS/PMS, que indica a viabilidade celular.



Teste da atividade antioxidante

Pela utilização do composto 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o qual promove fluorescência.



RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 1: Experimentos de citotoxicidade que geraram os valores da IC50, IC10 e DL50 das amostras da *Baccharis trimera* (Less) DC.

Amostra	IC50 (µg/mL)	IC10 (µg/mL)	DL50 (µg/mL)
Extrato Aquoso	1961	1507,8	1773,4
Ex.Hidroalcoólico	460	356,6	1034,1
Apigenina	240	145,4	811,8
Luteolina	50	28,5	452,9
Quercetina	241,3	151,5	813,4

Tabela 2: Porcentagens da atividade antioxidante das amostras da *Baccharis trimera* (Less) DC.

Amostras	Antioxidante (%)
NAC	52,3
Ex. Aquoso	80,5
Ex. Hidro.	86
Apigenina	83
Luteolina	78
Quercetina	86,8

Atividade Antioxidante *Baccharis trimera*

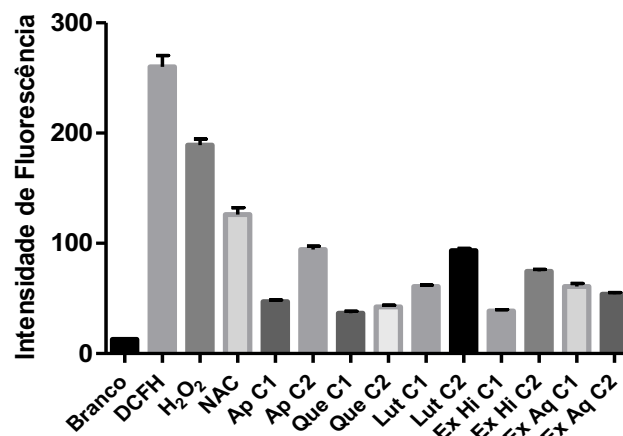


Figura 1: Gráfico representativo da atividade antioxidante da *Baccharis trimera* (Less) DC. em intensidade de fluorescência.

CONCLUSÃO

Os resultados mostraram uma promissora atividade antioxidante da *Baccharis trimera* (Less) DC, evidenciando que ativos de origem natural podem trazer diversos benefícios à população, e que pesquisas voltadas à carqueja mostram ser de extrema relevância para seu uso futuro em produtos cosméticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o CNPq pelo apoio e suporte financeiro (Bolsa Pibic) na realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Series on testing and assessment Test No. 129: guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests, 2010.



Congresso
Acadêmico
UNIFESP 2020

Ciência e Universidade: Transformações para a Sociedade

Análise da citotoxicidade e da atividade antioxidante de amostras da *Baccharis trimera* (Less) DC.

Autor: Karine Pires Barsalobra

Colaboradores: Gabriella Lisboa dos Santos, Márcio Adriano Andreo,
Patricia Santos Lopes.

Julho / 2020