



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



CLARA BEATRIZ DE LIMA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR
DE EXTRATOS DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*

Maringá

2022

CLARA BEATRIZ DE LIMA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR
DE EXTRATOS DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

L732a

Lima, Clara Beatriz de

Avaliação *in vitro* do potencial fotoprotetor de extratos das flores de *Pyrostegia venusta* / Clara Beatriz de Lima. -- Maringá, PR, 2022.
69 f.: il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

1. Fotoproteção. 2. Antioxidantes. 3. UV-B radiação. 4. *Bignoniaceae*. 5. *Pyrostegia venusta*. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Araújo, Daniela Cristina de Medeiros, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. IV. Título.

CDD 23.ed. 615.31

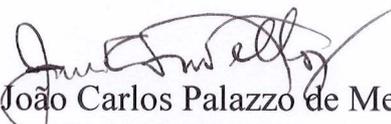
CLARA BEATRIZ DE LIMA

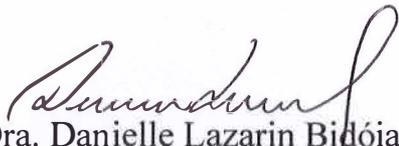
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DE
EXTRATOS DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta***

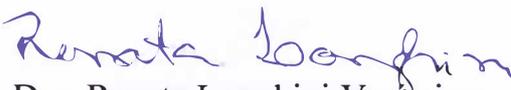
320^a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 30 de setembro de 2022

BANCA EXAMINADORA


Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Dra. Danielle Lazzarin Bidóia
Universidade Estadual de Londrina


Dra. Renata Longhini Veríssimo
Secretaria de Saúde de Maringá

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica - PALAFITO - Blocos K80, e T22, Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) - Bloco B08, e no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos - Bloco B08, da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá/PR.

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus, que me deu saúde e forças para superar todos os momentos difíceis a que me deparei ao longo da pós graduação, ao meu pai José Roberto, e minha mãe Sandra, por serem essenciais na minha vida e ao meu namorado.

Agradecimento

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, minha força nos momentos difíceis e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais José Roberto e Sandra, por todo o esforço investido na minha educação, por me incentivar e me apoiar em todas minhas decisões.

Ao meu namorado Alex, pela compreensão e paciência demonstrada durante esse período. Esteve presente, me ajudou e me acompanhou em toda trajetória.

As minhas irmãs Ana Caroline e Júlia, a minha sobrinha Isabela, a minha tia Inês e a Simone que sempre me apoiaram.

Aos meus amigos e amigas, antigos e novos que a pós graduação me presenteou, por todo o companheirismo, apoio, paciência e por compartilharem momentos incríveis comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello e minha coorientadora Profa. Dra. Daniela Cristina de Medeiros Araújo, que acompanharam meu percurso ao longo dos últimos anos, eu deixo uma palavra sincera de gratidão, porque sem essa paciência e sabedoria eu jamais seria esta pessoa tão realizada.

A todos colegas do laboratório Palafito: Ana Carolina Guidi, Ana Vitória, Admir Arantes, Danielly Chierrito, Eloisa Lorenzi, Larissa Valone, Mariana Nascimento de Paula, Emilly Teodoro, Naiara Gancedo, Raquel Isolani, Sharize Galende e Thalita Prates, que me apoiaram e me ajudaram diretamente e indiretamente para a conclusão deste trabalho, marcando a finalização de uma fase em minha vida.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, a Karine Nunes e ao Rodolfo Balbinot do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, pela colaboração neste trabalho.

Aos técnicos do COMCAP (Complexo de centrais de apoio a pesquisa) sempre dispostos a ajudar.

A Francisca Helena Mesquita de Carvalho, secretaria do programa de Pós-graduação em ciências farmacêuticas, por todo carinho e atenção.

E ao apoio financeiro oferecidos pelos órgãos de fomento CAPES e ao CNPQ.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

Albert Einstein

BIOGRAFIA



Clara Beatriz de Lima, nasceu em Maringá, PR, em 10 de outubro de 1994. cursou o ensino fundamental na Escola Municipal Odete Ribaroli Gomes de Castro e o médio no Colégio Estadual Alberto Jackson Byington Júnior, onde concluiu em 2011. No ano de 2015 ingressou no curso de Farmácia na Universidade Estadual de Maringá. Na graduação realizou estágio no Departamento de Ciências da Saúde no Laboratório de Parasitologia estudando a doença de Chagas concluindo em abril de 2016 sob a orientação da Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo. Participou de palestras e cursos, auxiliou na conclusão do projeto de Avaliação morfoanatômica das folhas e cascas caulinares de *Croton floribundus*, em 2017 no Laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAFITO) sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Iniciou o projeto de Controle de Qualidade da casca caulinar de *Croton floribundus* com término em 2018, dando início ao projeto intitulado como Controle de Qualidade e Desenvolvimento de Xampu contendo extrato de *Guazuma ulmifolia* tendo finalizado em 2019, sob a orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Atualmente realiza seu trabalho de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (2020), orientada pelo Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Realizou apresentações em congressos, seminários, realização de curso e colaboração em artigos publicados.

LIMA, C. B. 2022 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL FOTOPROTETOR DE EXTRATOS DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 69p.

RESUMO

A radiação ultravioleta (UV) é dividida em: UVA, UVB e UVC, sendo a UVB a mais intensa podendo causar queimadura solares graves, além da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam danos celulares e ao DNA. As espécies reativas geradas pela exposição aos raios UV podem ser neutralizadas por substâncias antioxidantes, prevenindo, reduzindo ou reparando o dano induzido. Substâncias que tem o objetivo de combater a EROs e devido à grande busca de substâncias de origem natural, a *Pyrostegia venusta*, Bignoniaceae, popularmente conhecida como flor de São João, seria uma alternativa. Essa espécie é encontrada em várias regiões do Brasil e suas flores, folhas, caules e raízes são utilizados popularmente para tratamento de diversas doenças. Os metabólitos presentes nessa espécie podem possuir a capacidade de fotoproteção. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro*, a capacidade fotoprotetora de diferentes extratos e frações das flores de *P. venusta*. As técnicas utilizadas foram: avaliação antioxidante, e viabilidade celular em fibroblastos L929 irradiado com UVB, geração de EROs e ensaio de migração celular em fibroblastos L929 (cicatrização de ferida). Os resultados demonstraram que os extratos e frações das flores *P. venusta* possuem atividade antioxidante, principalmente a fração acetato de etila:*n*-butanol (6:1) que se destacou nos ensaios antioxidantes de DPPH e XO. Com a metodologia validada por cromatografia líquida de alta eficiência foi possível verificar a separação das substâncias majoritárias, acteosídeo e β -OH-acteosídeo, nos extratos e frações. Além disso, foi possível determinar do teor dessas substâncias, nas frações AcEt:*n*-But (6:1), (3:1) e (1:1), no extrato bruto (EB) e no EB com 10% da fração AcEt:*n*-But (6:1). Essas amostras apresentaram teor de acteosídeo + β -OH-acteosídeo (Act+ β -OH-Act) de 50,02; 34,68; 28,44; 8,12 e 13,34%, respectivamente. As frações não apresentaram citotoxicidade em fibroblastos L929, abaixo de 50 μ g/mL, exceto a fração (6:1) em concentração abaixo de 25 μ g/mL e, os extratos não apresentaram citotoxicidade em concentrações abaixo de 200 μ g/mL. Foi possível confirmar que a fração AcEt:*n*-But (6:1), o Act+ β -OH-Act e o EB, protegeram as linhagem celular L929 frente aos raios UVB, bem como diminuíram as EROs geradas. Na técnica de migração celular foi observado que, nas concentrações utilizadas da fração AcEt:*n*-But (6:1) e do Act+ β -OH-Act não houve crescimento significativo em relação ao controle, demonstrando que a amostra não apresentou capacidade em regenerar a ferida artificial. Com os resultados obtidos pode-se

afirmar que a fração AcEt:*n*-But (6:1) e a substância isolada apresentam potencial para proteção solar.

Palavras-chave: Fotoproteção; antioxidantes; UVB; Bignoniaceae.

LIMA, C. B. 2022 IN VITRO EVALUATION OF THE PHOTOPROTECTIVE POTENTIAL OF EXTRACTS FROM THE FLOWERS OF *Pyrostegia venusta*. Master's dissertation, Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 69p.

ABSTRACT

Ultraviolet radiation (UV) is divided into: UVA, UVB and UVC, with UVB being the most intense, which can cause severe sunburn, in addition to the formation of reactive oxygen species (ROS) that cause cell and DNA damage. The reactive species generated by exposure to UV rays can be neutralized by antioxidant substances, preventing, reducing or repairing the induced damage. Substances that aim to combat ROS and due to the great search for substances of natural origin, *Pyrostegia venusta*, Bignoniaceae, popularly known as “São João flower”, would be an alternative. This species is found in several regions of Brazil and its flowers, leaves, stems and roots are popularly used to treat various diseases. The metabolites present in this species may have photoprotective capacity. Thus, the objective of this work was to evaluate, in vitro, the photoprotective capacity of different extracts and fractions of *P. venusta* flowers. The techniques used were: antioxidant evaluation, and cell viability in L929 fibroblasts irradiated with UVB, generation of ROS and cell migration assay in L929 fibroblasts (wound healing). The results showed that the extracts and fractions of the *P. venusta* flowers have antioxidant activity, especially the ethyl acetate:*n*-butanol (6:1) fraction, which stood out in the antioxidant assays of DPPH and XO. With the methodology validated by high performance liquid chromatography, it was possible to verify the separation of the major substances, acteoside and β -OH-acteoside, in the extracts and fractions. Furthermore, it was possible to determine the content of these substances in the AcEt:*n*-But fractions (6:1), (3:1) and (1:1), in the crude extract (EB) and in the EB with 10% of the fraction AcEt:*n*-But (6:1). These samples had an acteoside + β -OH-acteoside (Act+ β -OH-Act) content of 50.02; 34.68; 28.44; 8.12 and 13.34%, respectively. The fractions did not show cytotoxicity in L929 fibroblasts, below 50 μ g/mL, except for the fraction (6:1) in concentrations below 25 μ g/mL, and the extracts did not show cytotoxicity in concentrations below 200 μ g/mL. It was possible to confirm that the AcEt:*n*-But fraction (6:1), the Act+ β -OH-Act and the EB, protected the L929 cell line against UVB rays, as well as decreased the generated ROS. In the cell migration technique, it was observed that, in the concentrations used of the AcEt:*n*-But fraction (6:1) and of the Act+ β -OH-Act, there was no significant growth in relation to the control, demonstrating that the sample did not have the ability to regenerate the artificial wound. With the results obtained, it can be stated that the AcEt:*n*-But fraction (6:1) and the isolated substance have potential for sun protection.

Keywords: Photoprotection; antioxidants; UVB; Bignoniaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Detalhe das flores da <i>Pyrostegia venusta</i>	16
Figura 2 - Ilustração da pele, mostrando a epiderme e a derme	19
Figura 3 - Estrutura química do acteosídeo.....	21
Figura 4 - Fluxograma das metodologias realizada com as flores de <i>Pyrostegia venusta</i>	33
Figura 5 – Reação química da redução do radical DPPH alterando a coloração de violeta para amarela.	35
Figura 6 - Reação química da redução do radical ABTS	35
Figura 7 - Reação química da redução férrica.....	36
Figura 8 - Reação química da xantina oxidase.....	36
Figura 9 - Cromatogramas (A) padrão de Act+ β -OH-Act e (B) fração acetato de etila- <i>n</i> -butanol (6:1)	38
Figura 10 - Cromatogramas (A) fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1) e (B) fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1) adicionado padrão de Act+ β -OH-Act.....	39
Figura 11 - Curva de análise do Act+ β -OH-Act obtida por CLAE.....	40
Figura 12 - Cromatogramas (A) fração AcEt: <i>n</i> -But (3:1) (B) fração AcEt: <i>n</i> -But (1:1) (C) extrato bruto (EB) e (D) EB com 10% da fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1)	45
Figura 13. Avaliação da viabilidade com a linhagem celular de fibroblastos L929, quando em contato com frações, Act+ β -OH-Act, extrato bruto e extrato bruto com a fração 6:1 a 10%.....	47
Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade irradiada celular da fração 6.1, do Act+ β -OH-Act, e do extrato bruto, na linhagem celular de fibroblastos L929	49
Figura 15 - Avaliação da proteção da fração 6.1, do Act+ β -OH-Act, e do extrato bruto na diminuição das EROs, na linhagem celular de fibroblastos L929.....	50
Figura 16- Avaliação da migração celular do Act+ β -OH-Act e fração 6:1 na linhagem celular de fibroblastos L929	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições para análise cromatográfica.	27
Tabela 2. Parâmetros de variações na análise de robustez do método.	30
Tabela 3. Análise da capacidade antioxidante das amostras em diferentes métodos, com as frações 6:1, 3:1 e 1:1, com o extrato bruto (EB), com extrato bruto misturado com a fração 6:1 a 10% (6:1EB), com o acteosídeo e β -OH-acteosídeo (Act+ β -OH-Act) e com a quercetina (QUE).....	37
Tabela 4. Análise das médias das áreas, desvios padrão e coeficiente de variação (CV%) da curva analítica da soma do acteosídeo e β -OH-acteosídeo.....	40
Tabela 5. Resultados da ANOVA para a análise da regressão e da falta de ajuste.	41
Tabela 6. Avaliação da repetibilidade, precisão intermediária, em dias diferentes, e analista diferentes da fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1).	42
Tabela 7. Avaliação da exatidão da determinação do teor de Act+ β -OH-Act na fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1) pelo método de adição de padrão.....	43
Tabela 8. Avaliação da robustez do método para a separação das substâncias da fração AcEt: <i>n</i> -But (6:1).....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

P. venusta: *Pyrostegia venusta*

UV: Ultravioleta

UVA: Radiação ultravioleta A

UVB: Radiação ultravioleta B

UVC: Radiação ultravioleta C

EROs: Espécies reativas de oxigênio

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado

PG: Patrimônio genético

EB: Extrato bruto

ACT: Acteosídeo

QUE: Quercetina

FPS: Fator de proteção solar

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

TEAC: Capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox

XO: Xantina oxidase

mL: Mililitro

mg: Miligrama

L: Litro

nm: Nanometro

mmol: Milimolar

kg: Quilograma

μL: Microlitro

μg: Micrograma

VN: Vermelho neutro

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CLAE-DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com detector de arranjo de diodos

r^2 : Coeficiente de determinação

r: Coeficiente de correlação

ANOVA: Análise de variância

CV: Coeficiente de variação

DP: Desvio padrão

AcEt-*n*-But: Acetato de etila: *n*-butanol

Act+ β -OH-Act: Acteosídeo + β -OH-Acteosídeo

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Biodiversidade	14
2.2 Família - Bignoniaceae Juss.	15
2.3 Gênero - <i>Pyrostegia</i> C. Presl	15
2.4 Espécie - <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker Gawl.) Miers	15
2.5 Radiação ultravioleta e espécies reativas de oxigênio.....	17
2.6 Fisiologia e danos causados por raios UVB na pele.....	18
2.7 Protetores solares.....	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivos gerais	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Equipamentos e acessórios	23
4.2 Droga vegetal.....	23
4.2.1 Coletas	23
4.2.2 Secagem e estabilização	23
4.2.3 Autorizações	23
4.3 Preparação do Extrato.....	24
4.3.1 Preparação do extrato bruto.....	24
4.3.2 Preparação das frações.....	24
4.4 Análise da atividade antioxidante.....	24
4.4.1 ABTS	24
4.4.2 Método DPPH em microplacas	25
4.4.3 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).....	25
4.4.4 Sistema xantina/luminol/xantina oxidase	26
4.5 Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	26
4.6 Validação do método de doseamento	27
4.6.1 Seletividade	28
4.6.2 Linearidade	28
4.6.3 Sensibilidade.....	28
4.6.4 Precisão.....	29
4.6.5 Exatidão.....	29

4.6.6 Robustez	30
4.7 Potencial fotoprotetor <i>in vitro</i>	30
4.7.1 Cultura de células	30
4.7.2 Ensaio de citotoxicidade celular	30
4.7.3 Ensaio de citotoxicidade irradiada.....	31
4.7.4 Determinação de EROs intracelular	31
4.7.5 Ensaio de migração celular.....	32
4.8 Análise estatística	32
4.9 Fluxograma das metodologias	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Rendimento dos extratos e frações	34
5.2. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e frações de <i>P. venusta</i>	34
5.3. Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)	37
5.4. Validação	38
5.4.1 Seletividade	38
5.4.2 Linearidade	40
5.4.3 Limite de Detecção e Quantificação.....	41
5.4.4 Precisão.....	41
5.4.5 Exatidão	42
5.4.6 Robustez	43
5.4.7 Doseamento dos extratos e frações.....	44
5.5. Potencial fotoprotetor <i>in vitro</i>	45
5.5.1 Ensaio de citotoxicidade celular	45
5.5.2 Ensaio de citotoxicidade irradiada.....	48
5.5.3 Determinação de EROS intracelular.....	49
5.5.4 Ensaio de migração celular.....	51
5.6 Fração das flores de <i>P. venusta</i> para fotoproteção	53
6 CONCLUSÃO.....	54
7 EQUIPE EXECUTORA E LOCAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	55
7.1 Equipe executora	55
7.2 Locais de realização de experimento.....	55
REFERÊNCIAS	56
Apêndice A	60

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a tendência mundial é a utilização de substâncias de origem natural em cosméticos, não só por apelo aos produtos ecologicamente corretos, mas também devido ao grande benefício que as substâncias de origem vegetal podem oferecer. Como exemplo, a *Pyrostegia venusta* (Ker. Gawl) Miers (Bignoniaceae) popularmente conhecida como flor de São João, possui atividade comprovada para leucoderma, vitiligo e potente atividade para cicatrização de feridas, e acredita-se que essas atividades podem estar relacionadas ao potencial antioxidante dessa espécie (1, 2).

As flores de *P. venusta* tem uma ampla variedade de metabólitos secundários, que são essenciais para a manutenção da vida da espécie e responsáveis pelos benefícios na utilização na medicina tradicional. Como por exemplo, as antocianinas são responsáveis pela coloração das flores e beneficia-se sendo atrativas para a ação dos polinizadores e manutenção da espécie. Outros metabólitos presentes na espécie são: alcaloides, terpenoides, taninos, flavonoides e fenilpropanoides. Esses grupos químicos podem ser responsáveis pela atividade cicatrizante, leucoderma e atividade antioxidante descrita em diversos estudos (1-3).

O potencial antioxidante da *P. venusta* tem grandes chances de prevenir a produção de radicais livres que são um dos maiores causadores do envelhecimento cutâneo e câncer de pele. Substâncias com objetivo de combater o estresse oxidativo, como os antioxidantes, diminui a chance de doenças relacionadas à exposição ao sol e retardam o envelhecimento, sendo uma ótima alternativa para uso em proteção solar (3, 4).

A exposição excessiva aos raios ultravioletas (UV) pode causar vários problemas à saúde, sendo um deles, o câncer de pele. A incidência de câncer de pele no Brasil é cerca de 30%, sendo o melanoma o tipo mais grave por causa da grande possibilidade de metástase. No ano de 2020, ocorreram 176.930 casos novos no Brasil, sendo 83.770 homens e 93.160 mulheres. Por isso se torna essencial a utilização de um fotoprotetor, como uma maneira de prevenção não só do câncer de pele, mas também do fotoenvelhecimento, entre outros problemas causados pela exposição solar excessiva (5, 6).

Devido ao potencial antioxidante das flores de *P. venusta* e a busca por novos ativos fotoprotetores de origens naturais, esse trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de proteção dos extratos e frações das flores de *P. venusta* contra a radiação UVB.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biodiversidade

No Brasil existe mais de 46.000 espécies vegetais, distribuídos nos seis biomas terrestres e três grandes ecossistemas marinhos, um país de dimensões continentais e diferentes zonas climáticas. O Brasil tem importância no desenvolvimento de atividades econômicas baseadas na utilização sustentável dos recursos florestais, sendo o segundo país com maior extensão de florestas e o país com a maior extensão de florestas tropicais do planeta (7).

A diversidade de espécies vegetais é utilizada há muitos anos pela população para consumo ou tratamento de enfermidades. A capacidade da planta possuir potencial para tratamento de alguma doença é devido a habilidade de produção de biomoléculas que são responsáveis por diferentes atividades biológicas no organismo humano. Atualmente existem os fitoterápicos, em que as plantas são a base da formulação desses medicamentos, passando por um processo de industrialização, padronização das substâncias, confirmação da eficácia e segurança, além de ser regularizados pela agência de vigilância sanitária (ANVISA). Esses são receitados para tratamento na medicina alopática, na antroposófica, na naturopatia e na medicina tradicional chinesa (8, 9).

As plantas medicinais também são muito utilizadas na indústria cosmética como ativos, tensoativo, perfumante, espessante entre várias outras atividades, tendo em vista o que um extrato vegetal pode oferecer ao produto final. As substâncias presentes nas espécies vegetais são responsáveis por determinar quais ações uma planta pode ter. Por exemplo a *Aloe vera* (L.) Burm.f., conhecido como babosa, tem estudos relatando o uso para melhorar a integridade da pele, cicatrização, processo inflamatório e utilizada na fabricação de sabonetes, xampu e cremes corporais (10).

A diversidade de espécies vegetais é fundamental para o ser humano, fornecendo insumos para alimentação, fabricação de cosméticos e medicamentos. Sendo essencial o estudo aprofundado sobre cada espécie, principalmente as que tenha potencial industrial. Com a riqueza de espécies no Brasil existem muitas plantas que ainda não foram totalmente elucidadas, sendo importante para o desenvolvimento da pesquisa e industrial deste País (11).

2.2 Família - Bignoniaceae Juss.

Bignoniaceae Juss. é uma família de grande diversidade, com 82 gêneros aceitos e 992 espécies (12), podendo se apresentar como árvores, arbustos ou trepadeiras. Morfologicamente essa família pode apresentar diferentes estruturas como: pseudoestípulas, folhas pecioladas, inflorescências terminais ou axilares, tendo a possibilidade de ser fasciculadas ou reduzidas a uma única flor, as flores são bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas, com bordo truncado, denteado, lobado, bilabiado ou espatáceo (13, 14).

As folhas, flores, caules e raízes pertencentes a essa família têm uma ampla classe de metabólitos, sendo os iridoides, flavonoides e quinonas relatados em alguns trabalhos (15, 16). Além disso, algumas espécies pertencentes a essa família, apresentam grande potencial antioxidante e antimicrobiano como *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G.Lohmann, *Tanaecium sello* (Spreng.) L.G.Lohmann e *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. O gênero *Pyrostegia* é o destaque nesse trabalho, principalmente por seu potencial em sequestrar os radicais livres devido aos compostos fenólicos presentes nesse gênero (17, 18).

2.3 Gênero - *Pyrostegia* C. Presl

Pyrostegia C. Presl é um gênero pequeno com duas espécies com nomes aceitos (*P. millingtonioides* Sandwith e *P. venusta*) e duas ainda não totalmente elucidadas. O gênero é nativo da América do Sul e suas espécies são lianas com o folheto terminal e suas folhas compostas, geralmente modificadas como uma gavinha (12, 19, 20).

A *P. venusta*, muito conhecida pelas suas substâncias antioxidantes, são geralmente polinizadas por beija-flores por se tratar de flores inodoras e a corola geralmente vermelho-alaranjada brilhante, de textura bastante espessa, com tubo estreito e boca mais larga, e mais ou menos glabra internamente, enquanto as flores aromáticas de *P. millingtonioides* são possivelmente polinizadas por traças e tem a corola branca, estreita, tubular e de textura espessa (20, 21).

2.4 Espécie - *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers

P. venusta apresenta caule interpeciolar com crista, sua flor tem coloração laranja, oblonga, tubo longo e estames com 2,5 cm comprimento (Figura 1). Essa espécie está localizada

em regiões fitogeográficas como: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (20).



FIGURA 1 - Detalhe das flores da *Pyrostegia venusta*. FONTE: ALEX RUBIN LEME, 2020.

As flores, folhas, caules e raízes dessa planta são utilizados na medicina tradicional brasileira com objetivo de atenuar ou melhorar ações inflamatórias, metabólicas, para tratar diarreias, tosse, resfriados, gripes, bronquite e vitiligo, além de apresentar propriedade tônica (1, 22).

Estudos *in vitro* avaliaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos das flores e raízes da *P. venusta*, mostrando que ambos extratos teve boa capacidade antioxidante, comparando com padrões como: ácido ascórbico e BHT (17).

O extrato aquoso de *P. venusta* também pode possuir efeito anti-inflamatório, pois diminuiu o número de células inflamatórias em ratos Balb/C do lavado broncoalvelar, além de aumentar a capacidade antioxidante do tecido pulmonar depois do tratamento. Mostrando relação da atividade antioxidante do extrato com a diminuição da inflamação nos pulmões, sendo um potencial no tratamento da asma (23).

Outros estudos realizados por Moreira e colaboradores (2012, 2015) (24, 25) relatam que o extrato etanólico de *P. venusta* apresenta resultados *in vitro* e *in vivo* em relação a

melanogênese. O extrato produzido conseguiu diminuir a infiltração celular, níveis de citocinas inflamatórias, estresse oxidativo e aumentar a melanina, evidenciando a melhora no tratamento do vitiligo, ou outras doenças que estão relacionadas à despigmentação da pele.

A utilização terapêutica dessa espécie em algumas doenças é devido às diferentes classes de metabólitos secundários, entre elas: alcaloides, terpenoides, taninos e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos são substâncias antioxidantes naturais, prevenindo os danos oxidativos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem ser formadas devido a exposição aos raios ultravioletas ou ação inflamatória (3, 4).

2.5 Radiação ultravioleta e espécies reativas de oxigênio

A radiação UV é dividida em três categorias de comprimento de onda: UVC (100–280 nm), UVB (280–315 nm), e UVA (315–400 nm) definida pelo CIE (International Commission on Illumination). Os raios UVC são absorvidos completamente pela camada de ozônio, com isso não chega a terra. Já a radiação UVB é representada por 4-5% dos raios UV totais, é a radiação solar mais intensa, que pode causar queimaduras na pele induzindo a respostas de citocinas e formação de espécies reativas, sendo o principal agente que pode causar danos ao DNA. Os raios UVA representam a maior parte da radiação UV total, penetra mais profundamente na derme provocando a geração das EROs, a exposição crônica dessa radiação também pode causar o fotoenvelhecimento (26-29).

As espécies reativas geradas pela exposição aos raios UV podem ser neutralizadas por substâncias antioxidantes, que podem prevenir, reduzir ou reparar o dano induzido. Os seres humanos possuem uma série de defesas antioxidantes, e essas substâncias podem ser ingeridas por meio de suplementação, além de poder serem utilizadas topicamente (30, 31).

A geração de EROs pode acontecer a partir de fontes endógenas, como nas mitocôndrias, e também de fontes exógenas, como radiação e poluentes do ar. Os níveis de EROs em um sistema biológico são determinados não apenas pelas taxas de sua produção, mas também pela presença e atividades das defesas antioxidantes celulares (31).

As EROs produzidas em alguns processos oxidativos, podem estar relacionadas ao desenvolvimento de processos fisiológicos e fisiopatológicos, nas concentrações mais baixas regulam a sinalização intracelular e a homeostase do corpo, porém quando estão em concentrações altas podem ocasionar dano nas proteínas, lipídios e DNA (32).

Os antioxidantes podem ser utilizados para diminuir os níveis de EROs ou inibir o dano oxidativo, podendo trazer benefícios ao equilíbrio das EROs no corpo humano, pois o seu desequilíbrio pode aumentar as chances de câncer de pele (31, 33).

2.6 Fisiologia e danos causados por raios UVB na pele

A pele é dividida em duas camadas (Figura 2), uma externa chamada de epiderme e uma interna, a derme. A epiderme é constituída por queratinócitos, que são as células em maior número nesse epitélio, e apresenta mais três tipos celulares: os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel. A epiderme atua como uma barreira contra microrganismos e controla a saída e entrada de substâncias, é formada por cinco estratos, que são: germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (34-37).

A camada logo abaixo da epiderme é a derme, sendo responsável pelo suporte e elasticidade, possui tecido conjuntivo, estruturas vasculonervosas e glândulas. As principais células do tecido conjuntivo são os fibroblastos, característicos por serem células com formato fusiforme, alongado e afilado, sendo os responsáveis pela síntese de fibras colágenas e elásticas (34-37).

A pele quando exposta regularmente aos raios UV tem o aumento da produção de melanina na camada basal, com o objetivo de proteger esta pele dos raios UV. A produção excedente de melanina pode causar manchas na pele (hiperpigmentação). Os danos causados na pele devido a exposição excessiva aos raios UV sem proteção é o principal fator para o desenvolvimento do câncer de pele, provocando alterações celulares (38).

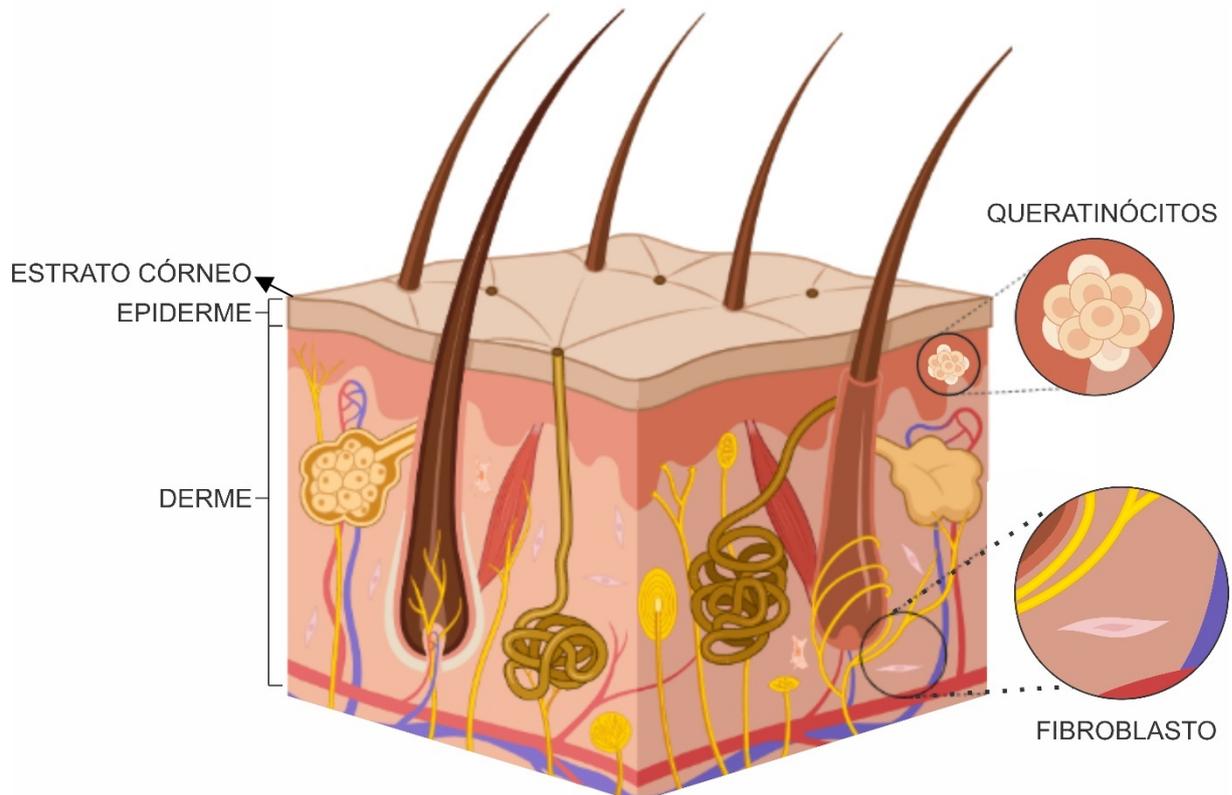


FIGURA 2 - Ilustração da pele, mostrando a epiderme e a derme. FONTE: Biorender.com modificações.

A maioria dos tipos de câncer de pele é causada por uma combinação de fatores de risco, como exemplo do fator ambiental mais comum, a frequente exposição à radiação UV. Os fatores genéticos também são de grande influência para o risco de câncer de pele, como por exemplo: história familiar, tom de pele e olhos claro, cabelo loiro ou ruivo, nevos displásicos ou muitas manchas comuns e a facilidade de queimar a pele quando exposta a luz solar (39, 40). Então, com à exposição prolongada e sem proteção aos raios UV, pode ocorrer danos as células e ao DNA, sendo que as exposições mais intensas podem resultar em queimaduras solares, indicando morte celular (41).

Existem dois tipos de câncer de pele, o melanoma e o não melanoma. O melanoma tem como células precursoras os melanócitos, os quais são as células responsáveis pela produção de melanina. Esse é o tipo de câncer de pele mais grave pois, pode ocorrer metástase, mas baixo percentual de chances de acontecer. Já o câncer de pele não melanoma tem uma maior frequência, porém com índices baixos de mortalidade, pode apresentar diferentes tipos de tumores como: carcinoma basocelular e o carcinoma epidermoide, podendo deixar cicatrizes nas pessoas acometidas com esse tipo de neoplasia (6).

2.7 Protetores solares

Devido aos problemas causados pela exposição excessiva aos raios UV se torna essencial a utilização de um fotoprotetor, como uma maneira de prevenção não só do câncer de pele mas também do fotoenvelhecimento, entre outros problemas causados pela exposição solar excessiva (5, 6).

Os filtros solares são divididos em: filtros químicos (orgânicos) e filtros físicos. Os filtros químicos atuam absorvendo os raios UV, como exemplo: os antioxidantes, osmolíticos e enzimas de reparo de DNA. Já os filtros físicos são bloqueadores que atuam bloqueando e dispersando os raios UV, sendo o dióxido de titânio um exemplo (42, 43).

Os metabólitos secundários produzidos por plantas são uma resposta às ações do ambiente, e aquelas expostas diretamente a radiação desenvolvem meios para se adaptar, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários antioxidantes para absorção de UV. Alguns dos metabólitos secundários que atuam na absorção de UV são os flavonoides, polifenóis, terpenoides e aminoácidos semelhantes a micosporina. Esses metabólitos tem a capacidade de absorção da radiação UV que ajuda na diminuição da inflamação, estresse oxidativo e ações prejudiciais ao DNA, além da prevenção da penetração da radiação na pele (44, 45).

As substâncias de origem vegetal que tem propriedade de proteção contra os raios UV são conhecidos, como os compostos fenólicos presente em grande quantidade nas flores de *P. venusta* (17). Um metabólito que se sobressai nessa espécie, é o acteosídeo que também pode ser denominado como verbascosídeo, o qual foi isolado e caracterizado das flores da espécie por Leite (46) (Figura 3.). O acteosídeo se destaca em relação a proteção solar principalmente por sua capacidade antioxidante, descrita por Roy (2011) (17), que realizou testes *in vitro* conseguindo confirmar esse potencial, além de estudo com relatos promissores sobre sua proteção aos raios UV (47).

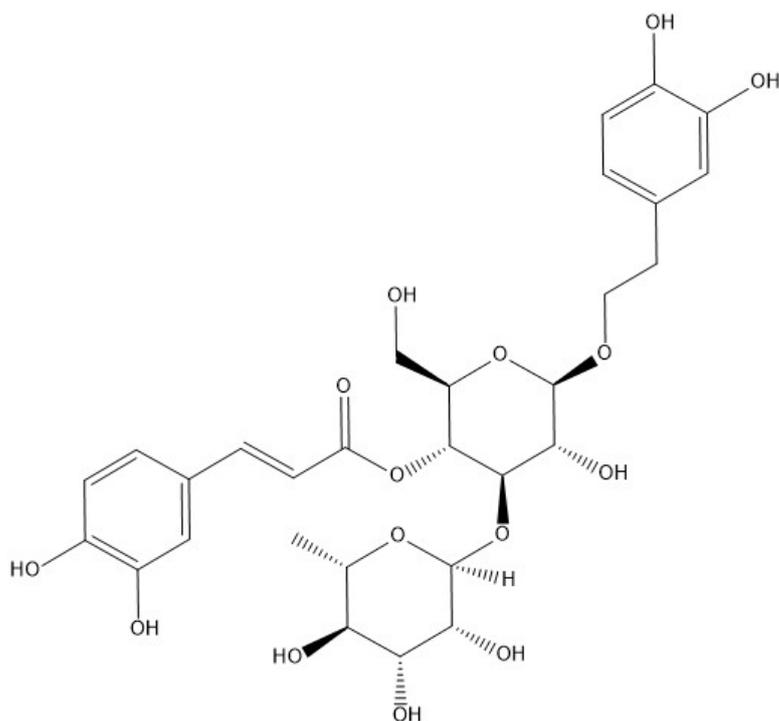


FIGURA 3 - Estrutura química do acteosídeo (ChemDraw16.0).

Alguns estudos evidenciam que o acteosídeo é um metabólito que pode atuar em diversas situações, como: agente antiviral, ação anti-inflamatória, proteção de raios X, eliminando EROs, ação antioxidante comprovada por várias técnicas, como, DPPH, FRAP, ABTS e ânion superóxido. Também pode apresentar efeitos terapêuticos para doença de Alzheimer e atenuar o déficit neurológico da esclerose múltipla (48-53).

Por se tratar de uma substância com potencial para proteção aos raios UV e as flores da *P. venusta* apresentar quantidade significativa desse metabólito, seria importante um estudo sobre as características fitoquímicas dessas flores além de ensaios comprovando a possível proteção dos extratos das flores de *P. venusta*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O trabalho teve por objetivo avaliar a atividade biológica do extrato bruto (EB) e das frações acetato de etila: *n*-butanol das flores de *Pyrostegia venusta* em linhagem de fibroblasto L929 irradiados com UVB e avaliar a capacidade fotoprotetora.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extrato e frações.
- Desenvolver método analítico para doseamento em UHPLC-DAD.
- Analisar o teor das substâncias majoritárias de todas as amostras.
- Avaliar *in vitro* o efeito citotóxico de extrato e frações da *P. venusta* em linhagem celular de fibroblasto L929.
- Avaliar o potencial citoprotetor de extrato e frações da *P. venusta* em linhagem celular de fibroblasto L929, sob radiação UVB.
- Avaliar as EROs produzidas sob radiação UVB com a proteção de extrato e frações da *P. venusta*.
- Avaliar a migração celular de fibroblastos L929 expostos a fração AcEt:*n*-But (6:1) e do acteosídeo + β -OH-acteosídeo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos e acessórios

Autoclave; Balança analítica; Balão volumétrico; Banho-maria; Capela de Biossegurança; Centrífuga; Dessecador; Destilador de água; Estufa de secagem; Estufa incubadora de CO₂; Evaporador; Freezer; Funil de Büchner; Geladeira; Leitor de microplacas; Liofilizador; Medidor de pH; Microscópio invertido; Microscópio óptico; Rotaevaporador; Sistema de água ultrapura Milli Q Milipore; Vortex.

4.2 Droga vegetal

4.2.1 Coletas

As flores de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoceaceae, foram coletadas em julho de 2020, em Cianorte, Paraná (S23°39'32.592" W52°38'19.59", h=547 m) e uma exsicata foi preparada, identificada e depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá sob o número HUEM 36.183.

4.2.2 Secagem e estabilização

Coletaram-se 10,641 kg de flores de *P. venusta*, e este material foi seco em temperatura ambiente e em estufa de circulação forçada de ar à 36 °C até não haver variação de peso.

4.2.3 Autorizações

A coleta do material vegetal está registrada no sistema SISBIO/IBAMA n° 11995-3, de 2 de novembro de 2010, com código de autenticação, 463676133, sob a responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. Acesso ao material botânico está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado - SisGen sob número A2C637E.

4.3 Preparação do Extrato

4.3.1 Preparação do extrato bruto

O extrato foi produzido com 1,500 kg de flores secas, sem pedúnculo floral de *P. venusta*, utilizando álcool 50 °GL como líquido extrator, por turbólise, durante 15 min na proporção de 20% (p/v) de droga vegetal e líquido extrator. Após, o extrato foi concentrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura de 40 °C, até eliminação completa do solvente orgânico, congelado, em nitrogênio líquido e liofilizado. O extrato bruto (EB) foi acondicionado e armazenado em freezer a -20 °C.

4.3.2 Preparação das frações

Para obter cada fração foi pesado 30 g de EB, solubilizado em 500 mL de água destilada e particionado com 500 mL da mistura de acetato de etila e *n*-butanol (saturado com 14,6 mL de água; 8 vezes) na proporção de 6:1, 3:1 e 1:1. As fases orgânicas foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, à temperatura de 40 °C, até eliminação completa do solvente orgânico, congelada, em nitrogênio líquido e liofilizada, para fornecer as frações. Com a fração acetato de etila e *n*-butanol (6:1) obtida, foi utilizado 1 g desta e misturada com 9 g do EB em gral de porcelana, adicionado água destilada e liofilizado novamente, obtendo o extrato 6:1EB. Além das frações, foram realizados testes com a mistura das substâncias acteosídeo + β -OH-acteosídeo (Act+ β -OH-Act), isoladas e caracterizadas em trabalho anterior (46).

4.4 Análise da atividade antioxidante

4.4.1 ABTS

A solução estoque de ABTS 8 mmol/L foi preparada dissolvendo-se 10 mg de ABTS, em 2,43 mL de água destilada. Um volume de 2,27 mL da solução estoque de ABTS foi adicionado a 11,5 mL de uma solução de persulfato de potássio 3 mmol/L. A mistura foi protegida da luz para formação do radical ABTS, e posteriormente foi avaliada pela adição de álcool etílico, até obter uma absorbância de 0,70 nm \pm 0,05 nm a 734 nm (54, 55).

Em seguida, foram adicionados 7 μ L dos extratos e frações nas concentrações de 1,5625, 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 μ g/mL (em etanol) ou do padrão Trolox à 200 μ L da solução de

ABTS• + diluída. Após 6 min de reação, foi realizada leitura em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2) a 734 nm. O equipamento foi zerado com um branco para descontar uma possível turbidez da amostra (7 µL de amostra e 200 µL de álcool etílico) (54, 55).

Para determinação da atividade antioxidante total das amostras foi realizado a curva de calibração do Trolox (40 a 1000 µM) e equação da reta obtida a partir das absorvâncias das diferentes diluições das amostras. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox (TEAC) (54, 55).

4.4.2 Método DPPH em microplacas

O método DPPH em microplacas foi baseado na metodologia de Blois (1958) (56) e Brand-Williams (1995) (57), adaptada de Rufino (2006) (54) e Sousa (200) (58).

Soluções na concentração de 2 mg/mL foram preparadas a partir dos EB e frações em metanol (solução mãe). A partir da solução mãe de cada amostra, foram preparadas as diluições nas concentrações de 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL.

Após, foram adicionadas alíquotas de 100 µL de cada diluição seriada do extrato nos poços da microplaca em triplicata e adicionados 100 µL da solução de DPPH 130 µM recém preparada. Foram realizados os seguintes controles: controle negativo (metanol e DPPH); branco (metanol); controle positivo (quercetina (1,5625 a 100 µg/mL)).

Por fim, a placa foi incubada à temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min e foi realizado a leitura em 517 nm com ajuda do leitor de microplacas.

Para determinação da atividade antioxidante total das amostras foi realizada curva linear das absorvâncias das diferentes diluições dos extratos e frações (1,5625 µg/mL a 100 µg/mL) e obtendo a equação da reta. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante dos extratos em reduzir 50% do radical DPPH (IC50).

4.4.3 FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro)

Foi utilizado etanol para diluição do padrão (Trolox) e também para o preparo dos extratos e frações nas concentrações de 1,5625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O reagente FRAP foi preparado misturando-se 2,5 mL da solução de 2,4,6-tripiridil-s- triazina (TPTZ), 2,5 mL da solução de cloreto de ferro hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) 20 mM e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM. Essa solução foi incubada a 37 °C em banho-maria (BM) por 30 min.

Em seguida, foram adicionados a 150 μL do reagente FRAP, uma alíquota de 30 μL de diferentes concentrações do padrão Trolox ou dos extratos. Essa mistura foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro de microplacas a 595 nm, após incubação por 30 min em BM a 37 °C. O equipamento foi zerado com um branco da amostra para descontar uma possível turbidez. Para isto, foram utilizados 150 μL do veículo FRAP (solução igual ao reagente FRAP exceto pela solução de TPTZ) e 30 μL da amostra (59).

Para determinação da atividade antioxidante total dos extratos foi realizada curva de calibração do Trolox (20 μM a 600 μM) e equação da reta obtida a partir das absorbâncias das diferentes diluições dos extratos e frações. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante dos extratos equivalente ao Trolox (Teac) (59).

4.4.4 Sistema xantina/luminol/xantina oxidase

O teste foi realizado de acordo com Zulueta (2009) (60). Os extratos e frações de *P. venusta* foram diluídos em etanol 50% de forma seriada, nas concentrações finais de 14,93 a 0,02916 $\mu\text{g/mL}$, utilizando um total de seis concentrações. Para o preparo de 560 μL de volume de reação foram utilizados: 400 μL de tampão glicina (750,7 mg de glicina, 37,224 mg EDTA, q.s.p. 100 mL), 150 μL de xantina (11,4 mg de xantina, 12 mL de tampão glicina) e 10 μL luminol (2,65 mg de luminol, 5 mL de DMSO).

Foram adicionados 10 μL de cada concentração dos extratos, previamente preparada de forma seriada, a 560 μL de volume de reação em tubos do tipo eppendorf. Dessa solução 80 μL foram adicionados em microplacas, para adição posterior de 20 μL da solução de xantina oxidase (11 μL de xantina oxidase e 5 mL de tampão glicina).

A adição de enzima, mantida sempre resfriada, foi realizada de forma manual e lida pelo equipamento luminômetro (Spectra max L1- Channel –Molecular Devices). Foram utilizados: branco (etanol 50%), controle negativo e controle positivo (quercetina (1,5625 a 100 $\mu\text{g/mL}$)).

4.5 Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

A análise das frações foi realizada utilizando o cromatógrafo líquido UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) com a coluna Phenomenex® Onix Monolithic C18, com fluxo de 0,5 mL/min. Foi utilizado 2 fases móveis, a fase A (acetonitrila com ácido fosfórico a 0,1%) e fase B (água com ácido fosfórico a 0,1%), empregando-se o seguinte sistema gradiente de eluição:

0–10 min, 20-40% da fase A e de 10-20 min 40-30% da fase A, sendo os 5 min finais destinados à reconstituição da coluna para a próxima análise.

TABELA 1. Condições para análise cromatográfica.

Condições cromatográficas	
Coluna	C-18 (10 cm x 4.6 cm; 130 Å)
Pré coluna	Phenomenex
Fluxo	0,5 mL/min
Temperatura	25 °C
Comprimento de onda	332 nm
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	20 min
Tempo de retenção	5 min

Preparo da amostra: Foi pesado 4 mg da amostra e foi diluído com metanol em balão volumétrico de 10 ml (solução-mãe – 400 µg/mL). Com pipeta volumétrica, foi alíquotado 610 µL da solução-mãe e adicionou 390 µL de metanol, homogeneizou para injetar no equipamento (solução leitura da amostra (244 µg/mL)).

Preparo da solução de referência: Foi pesado 2 mg do padrão Act+β-OH-Act e foi diluído com metanol em balão volumétrico de 10 mL (solução-mãe). Com pipeta volumétrica, foi diluído a solução para obter, pelo menos, 5 pontos de concentrações entre 6,25 a 200 µg/mL. Foi definido a equação da reta, onde y é a soma das áreas dos picos de Act+β-OH-Act e x é a concentração (µg/mL) de Act+β-OH-Act na solução leitura.

Cálculo do teor de Act+β-OH-Act (%) na fração acetato de etila:*n*-butanol (6.1): pela equação da reta, foi calculado a concentração (µg/mL) de Act+β-OH-Act na solução leitura e então foi aplicado na fórmula:

$$\text{Teor (\%)} = (\text{concentração na solução leitura}/244) \times 100$$

4.6 Validação do método de doseamento

O método analítico desenvolvido para determinação do teor de Act+β-OH-Act em fração AcEt:*n*-But (6:1) em UHPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) foi validado de acordo

com a resolução RDC nº166 de (2017) (61). Seguindo os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão, robustez e exatidão.

4.6.1 Seletividade

Soluções de 200 µg/mL da amostra (fração AcEt:*n*-But (6.1)) foi injetada no cromatógrafo e a seletividade foi determinada avaliando a pureza do pico, do espectro UV-VIS e também por meio da adição do padrão utilizado, Act+β-OH-Act.

4.6.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada com 7 concentrações do padrão. Foi preparada em triplicata, com 7 soluções mãe do padrão (Act+β-OH-Act) em uma concentração de 200 µg/mL. A partir da solução de padrão foi realizada as diluições necessárias para a curva linear utilizando a faixa de 6,25-200 µg/mL. Foi realizada a representação gráfica das áreas dos picos em função da concentração do analito, obtendo assim a equação da reta de regressão e os coeficientes de correlação e determinação.

4.6.3 Sensibilidade

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados com os parâmetros obtidos da curva linear, calculados com as seguintes equações:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

Sendo, σ o desvio padrão e IC a inclinação da curva linear.

4.6.4 Precisão

A precisão foi determinada pela repetibilidade e precisão intermediária. Para a análise de repetibilidade foram preparadas três replicatas das soluções-mãe da fração 6:1 na concentração de 400 µg/mL e foi realizada a diluição em três diferentes níveis, no mesmo dia. Nível baixo (NB): 305 µL da solução-mãe e foram adicionados 695 µL de metanol (122 µg/mL).

Nível médio (NM): 610 µL da solução-mãe e foram adicionados 390 µL de metanol (244 µg/mL).

Nível alto (NA): 915 µL da solução-mãe e foram adicionados 85 µL de metanol (366 µg/mL).

Na precisão intermediária foram preparadas três replicatas das soluções-mãe da fração AcEt:*n*-But 6:1 na concentração de 400 µg/mL e diluídas nas mesmas concentrações do teste de repetibilidade, em dias e analistas diferentes.

4.6.5 Exatidão

A exatidão foi determinada por meio da porcentagem de recuperação entre a concentração determinada experimentalmente e a concentração teórica. Essa análise foi realizada por meio da adição de diferentes volumes de uma solução mãe do padrão (acteosídeo e β-OH-acteosídeo a 500 µg/mL). A fim de manter a análise de exatidão dentro da faixa linear estabelecida para o método, a solução mãe da fração AcEt:*n*-But (6:1) foi preparada a partir de 1 mg da amostra, que foi transferida para balão volumétrico de 10 mL. Com auxílio de pipeta volumétrica, foram adicionadas alíquotas de 820, 2458 e 4098 µL de solução mãe padrão a 500 µg/mL para avaliar os níveis baixos, médio e alto, respectivamente, completando-se o volume com metanol. Em seguida, alíquotas de 610 µL de cada solução foram diluídas com 390 µL de metanol e homogeneizadas (solução leitura). Essa análise foi realizada usando 3 níveis em triplicata e a porcentagem de recuperação calculada conforme a fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

As concentrações de acteosídeo + β-OH-acteosídeo nas soluções leitura referente à adição de padrão é 25,010 µg/mL (NB), 74,969 µg/mL (NM) e 124,989 µg/mL (NA).

4.6.6 Robustez

Para determinação da robustez do método, foram realizadas variações nos parâmetros de: comprimento de onda, fluxo e temperatura. As análises foram realizadas em triplicatas e em três níveis de concentração (baixo, médio e alto). As amostras foram preparadas conforme descrito na repetibilidade.

TABELA 2. Parâmetros de variações na análise de robustez do método.

Parâmetros	Variações
Comprimento de onda	330 e 334 nm
Temperatura	24 e 26 °C
Fluxo	0,4 e 0,6 mL/min

4.7 Potencial fotoprotetor *in vitro*

4.7.1 Cultura de células

Os experimentos *in vitro* foram realizados com fibroblastos da linhagem celular clone L929 (ATCC[®] CCL1[™]). As células foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 1% (v/v) de uma mistura de antibióticos (100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina) e incubadas em estufa a 37,0 °C com tensão de 5,0% de CO₂ e 95% de umidade (62). As células foram observadas diariamente em microscópio invertido (Olympus[®], modelo CKX 41), e realizados subcultivos periódicos após formação da monocamada (80-90% de confluência celular), a cada dois ou três dias. Então o meio foi aspirado e a monocamada celular lavada uma vez com solução tampão fosfato-salina (PBS), e para o descolamento da monocamada utilizou-se a solução de tripsina. Aliquotas retiradas de cada passagem foram utilizadas para a realização dos experimentos.

4.7.2 Ensaio de citotoxicidade celular

As células foram plaqueadas ($2,5 \times 10^5$ células/mL) em microplaca de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 h, até a formação da monocamada. Logo após, o meio foi removido e diferentes concentrações das amostras foram adicionadas (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µg/mL para frações e 400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL para extratos em uma concentração máxima de 0,5% de DMSO no DMEM sem soro). A toxicidade

celular devido às amostras foi avaliada usando o ensaio de vermelho neutro (VN). As monocamadas foram lavadas após 24 h com PBS e adicionado a solução de VN (40 µg/mL). O sobrenadante foi removido após 3 h e as células foram fixadas com uma solução aquosa de formaldeído a 2% e CaCl₂ a 1% e adicionados 200 µL da solução de leitura contendo ácido acético a 1% e etanol a 50%. A leitura foi realizada após 15 min de agitação a 540 nm.

4.7.3 Ensaio de citotoxicidade irradiada

As células foram plaqueadas ($2,0 \times 10^5$ células/mL) em microplaca de 24 poços em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 h, até a formação da monocamada. Logo após, o meio foi removido e diferentes concentrações das amostras foram adicionados (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 µg/mL para frações e 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL para extratos em uma concentração máxima de 0,5% de DMSO no DMEM sem soro). Depois de 1 h de tratamento a monocamada foi lavada 2 vezes com PBS e colocada solução de HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) para a irradiação UVB até a intensidade de 600 mJ/cm², depois a solução foi trocada por DEMEM e aguardou-se 24 h. A proteção celular das amostras contra a radiação UVB, foi avaliada usando o ensaio de vermelho neutro (VN). As monocamadas foram lavadas após 24 h com PBS e adicionado à solução de VN (40 µg/mL). O sobrenadante foi removido após 3 h e as células foram fixadas com uma solução aquosa de formaldeído a 2% e CaCl₂ a 1% e adicionados 200 µL da solução de leitura contendo ácido acético a 1% e etanol a 50%. A leitura foi realizada em leitor de microplaca após 15 min de agitação a 540 nm.

4.7.4 Determinação de EROs intracelular

Para avaliar a geração de EROs, fibroblastos L929 cultivados em placas pretas de 96 poços por 24 h ($2,5 \times 10^5$ células/mL) foram submetidos a duas lavagens com PBS e tratadas por 1 h nas concentrações de 6,25, 3,125 e 1,5625 µg/mL para a fração e o padrão e 25, 12,5 e 6,25 µg/mL para o extrato. Após foi incubado com H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate) (10 µM) por 45 min a 37,0 °C. Posteriormente, as células foram expostas ao UVB (600 mJ/cm²) e as medições foram realizadas imediatamente. A fluorescência foi avaliada imediatamente em um leitor de microplaca em λ_{exc} 488 nm e λ_{em} 525 nm. As concentrações de proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (63, 64).

4.7.5 Ensaio de migração celular

As células foram plaqueadas em placa de 24 poços ($2,5 \times 10^5$ células/mL) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB por 24 h, até a formação da monocamada. Logo após, as células foram lavadas com PBS e realizado a ferida artificial com a ponta da ponteira de 200 μ L, depois as células foram tratadas com a fração AcEt:*n*-But (6:1) em uma concentração de 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL. Cada poço foi analisado com microscópio Olympus modelo: CKX41 e programa: *Olympus cell sens entry* e análise da abertura da ferida realizada por ImageJ.

4.8 Análise estatística

Os dados serão expressos como média \pm desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Diferenças significativas entre os valores foram analisadas pela análise de variância (ANOVA) *one-way* ou *two-way*, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey ou Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

4.9 Fluxograma das metodologias

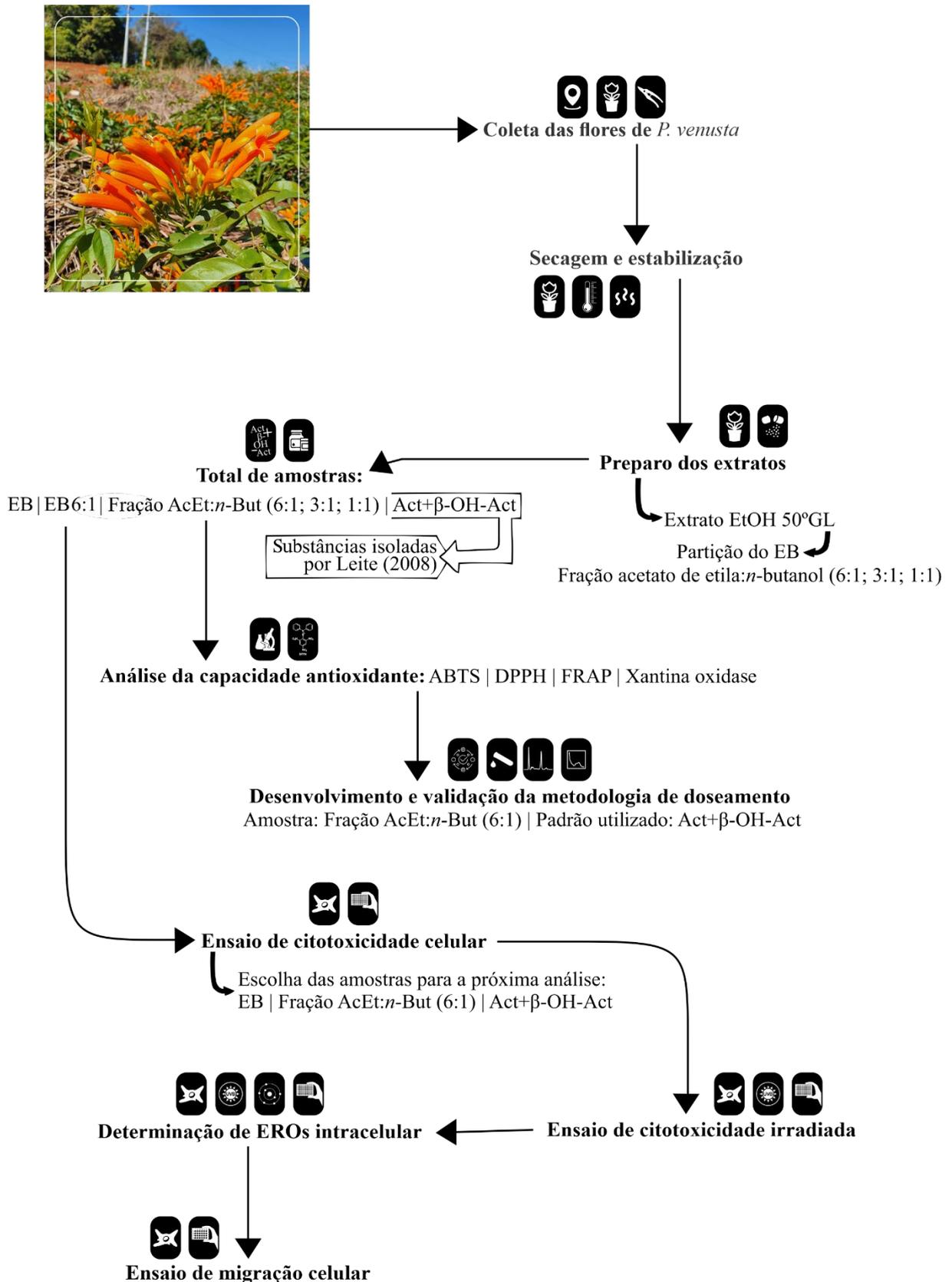


FIGURA 4 - Fluxograma das metodologias realizada com as flores de *Pyrostegia venusta*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento dos extratos e frações

De um total de 1,826 kg de flores de *P. venusta* secas, 1,500 kg foram submetidas ao processo de extração por turbólise com etanol 50 °GL, obtendo um total de 650,943 g de EB, com um rendimento de 51,26%, já descontado a umidade residual das flores que foi de 15,34%.

A partir do EB foi realizado o particionamento do extrato com acetato de etila e *n*-butanol (previamente saturado em água) em diferentes proporções (6:1, 3:1, 1:1), obtendo um rendimento de 9,29; 11,75 e 13,75%, respectivamente. Depois foi realizado o processo de mistura do extrato bruto com 10% da fração AcEt:*n*-But (6:1) como desenvolvido e descrito por Leite (46).

5.2. Avaliação do potencial antioxidante dos extratos e frações de *P. venusta*

Todos os resultados da avaliação do potencial antioxidantes estão apresentados na Tabela 3. As amostras obtidas e o Act+β-OH-Act, foram utilizadas nas análises antioxidantes, para avaliar quais tem a melhor atividade e a melhor concentração para os demais testes.

A técnica de DPPH fundamenta-se na transferência de elétrons, em que o radical DPPH é reduzido por um antioxidante ou espécie radicalar, formando difenil-picril-hidrazina, passando da cor púrpura para a coloração amarelada, observando um decréscimo na absorbância (Figura 5).

Nessa análise, a fração AcEt:*n*-But (6:1) foi a melhor entre as amostras, conseguindo reduzir 50% do radical DPPH em uma concentração de 6,57 µg/mL ± 0,11, comparando-se com padrão (quercetina) que apresentou IC₅₀ de 2,99 ± 0,15.

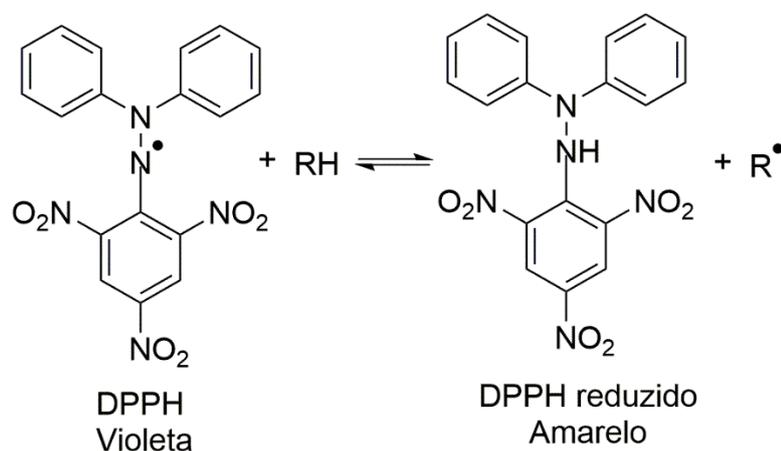


FIGURA 5 – Reação química da redução do radical DPPH alterando a coloração de violeta para amarela.

Com o ensaio ABTS foi possível observar que as frações, o Act+β-OH-Act e a quercetina foram as amostras que apresentaram maior capacidade em sequestrar o ânion radical ABTS^{•+}. O radical ABTS foi oxidado previamente pelo radical peroxil para seu radical cátion, que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante das amostras foram medida pela habilidade que a substância em estudo possui em diminuir a cor reagindo diretamente com o radical ABTS^{•+} (Figura 6) (54, 55).

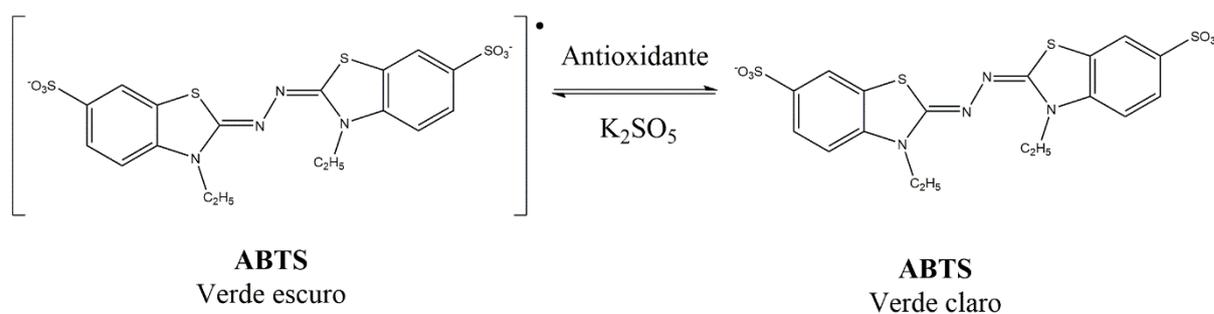


FIGURA 6 - Reação química da redução do radical ABTS alterando a coloração de verde escuro para verde claro.

Na técnica de redução férrica (FRAP), a fração AcEt:*n*-But (6:1) apresentou a maior atividade antioxidante, sendo os valores próximos ao do Act+β-OH-Act. O EB também apresentou atividade, porém menor e com diferença significativa das frações.

O FRAP é uma técnica em que a reação mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido. Essa reação consegue detectar os compostos com potencial redox <0,7 V (potencial redox do Fe⁺³- TPTZ). O poder redutor mostra estar relacionado com o grau de hidroxilação e extensão de conjugação em polifenóis (Figura 7) (65).

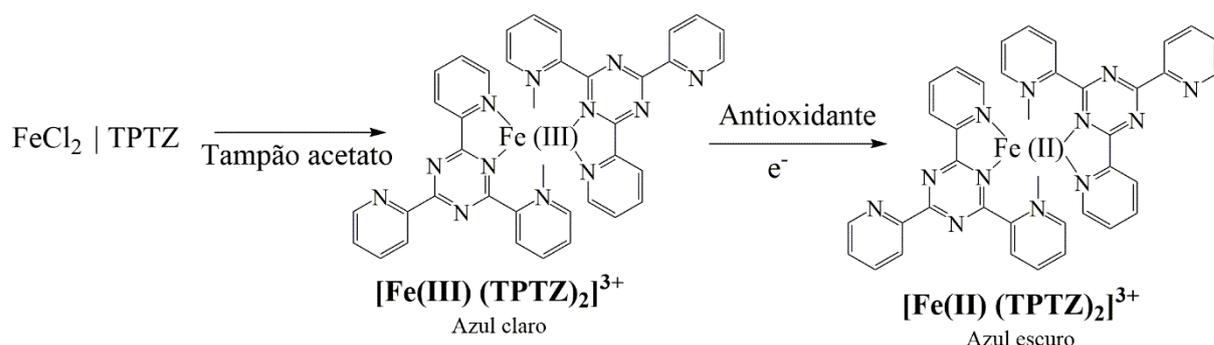


FIGURA 7 - Reação química da redução férrica alterando a coloração de azul claro para azul escuro.

Para a análise da capacidade na inibição da xantina oxidase, a amostra AcEt:*n*-But (6:1) e o Act+β-OH-Act apresentaram a melhor capacidade em inibição da enzima em relação a quercetina, flavonoide conhecido por sua capacidade antioxidante. As frações 3.1, 1.1 e a quercetina não apresentaram diferença significava entre si. Os extratos apresentaram a menor capacidade de inibição enzimática, porém com adição da fração AcEt:*n*-But (6:1) ao EB a amostra apresentou uma melhora na atividade antioxidante. A xantina oxidase é uma enzima desidrogenase que catalisa a reação da transformação da hipoxantina em ácido úrico, sendo que, durante o processo são formados EROS de forma continua no organismo humano. Por se tratar de uma enzima que participa da formação das EROS foi realizado a análise da capacidade de inibição da xantina oxidase (Figura 8) (66).



FIGURA 8 - Reação química da xantina oxidase.

Em todas as análises a fração AcEt:*n*-But (6:1) foi a que apresentou a maior capacidade antioxidante em relação às outras amostras, na técnica de inibição enzimática essa amostra apresentou resultados melhores do que o padrão utilizado. Dessa forma, a fração apresentou potencial na redução de radicais e inibição enzimática.

As flores de *P. venusta* tem comprovado ação antioxidante e anti-inflamatória, sendo os seus metabólitos secundários os responsáveis por esse potencial. Roy (2011) (17) analisou as atividades antioxidantes de um extrato metanólico das flores e raízes dessa espécie, sendo comparada com diferentes padrões (ácido ascórbico, quercetina e BHT), confirmando os resultados obtidos nesse trabalho.

Dessa forma também é possível propor que os extratos e as frações das flores de *P. venusta*, comparado com substâncias antioxidantes padrões, podem ter a habilidade de prevenir, reduzir ou reparar o dano induzido por EROs formados pelos raios UVB, podendo ser uma fonte de antioxidantes naturais.

TABELA 3. Análise da capacidade antioxidante das amostras em diferentes métodos, com as frações 6:1, 3:1 e 1:1, com o extrato bruto (EB), com extrato bruto misturado com a fração 6:1 a 10% (6:1EB), com o acteosídeo e β -OH-acteosídeo (Act+ β -OH-Act) e com a quercetina (QUE).

	ABTS	DPPH	FRAP	XOD
	(mmol TEAC/g)	IC ₅₀ (μ g/mL)	(mmol TEAC/g)	IC ₅₀ (μ g/mL)
6.1	2,36 \pm 0,058 ^a	6,57 \pm 0,11 ^a	3,44 \pm 0,017 ^a	0,13 \pm 0,008 ^a
3.1	1,97 \pm 0,029 ^a	8,44 \pm 0,32 ^b	3,28 \pm 0,18 ^a	0,23 \pm 0,008 ^b
1.1	1,72 \pm 0,036 ^a	8,57 \pm 0,38 ^b	3,13 \pm 0,16 ^a	0,20 \pm 0,004 ^b
6.1 EB	0,73 \pm 0,005 ^b	27,71 \pm 0,97 ^d	1,16 \pm 0,06 ^b	0,42 \pm 0,013 ^c
EB	0,50 \pm 0,003 ^b	39,89 \pm 1,31 ^e	0,98 \pm 0,04 ^b	0,49 \pm 0,049 ^d
Act+β-OH-Act	2,63 \pm 0,10 ^a	3,27 \pm 0,11 ^c	6,09 \pm 0,25 ^c	0,12 \pm 0,002 ^a
QUE	7,15 \pm 0,29 ^c	2,99 \pm 0,15 ^c	15,41 \pm 0,66 ^d	0,23 \pm 0,001 ^b

Resultados obtidos de 3 análises (n=3) realizados de forma independentemente, realizado análise de Tukey. Diferença das letras indica diferença significativa ($p < 0,05$).

5.3. Análise das frações por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD)

Para esclarecer quais são as substâncias majoritárias das frações, foi desenvolvido um método em CLAE-DAD para separação das substâncias das amostras. Esse método apresentou boa resolução dos picos e as substâncias majoritárias nas frações (β -OH-acteosídeo e o acteosídeo), foram confirmadas por comparação do tempo de retenção com os padrões das respectivas substâncias além do perfil no espectro de ultravioleta (Figuras 9A e B). O padrão utilizado foi a mistura de substâncias isolado e caracterizado da mesma espécie por Leite (2008), além de ter sido realizado a análise de espectro de massas novamente para confirmação das substâncias Act+ β -OH-Act (Apêndice A).

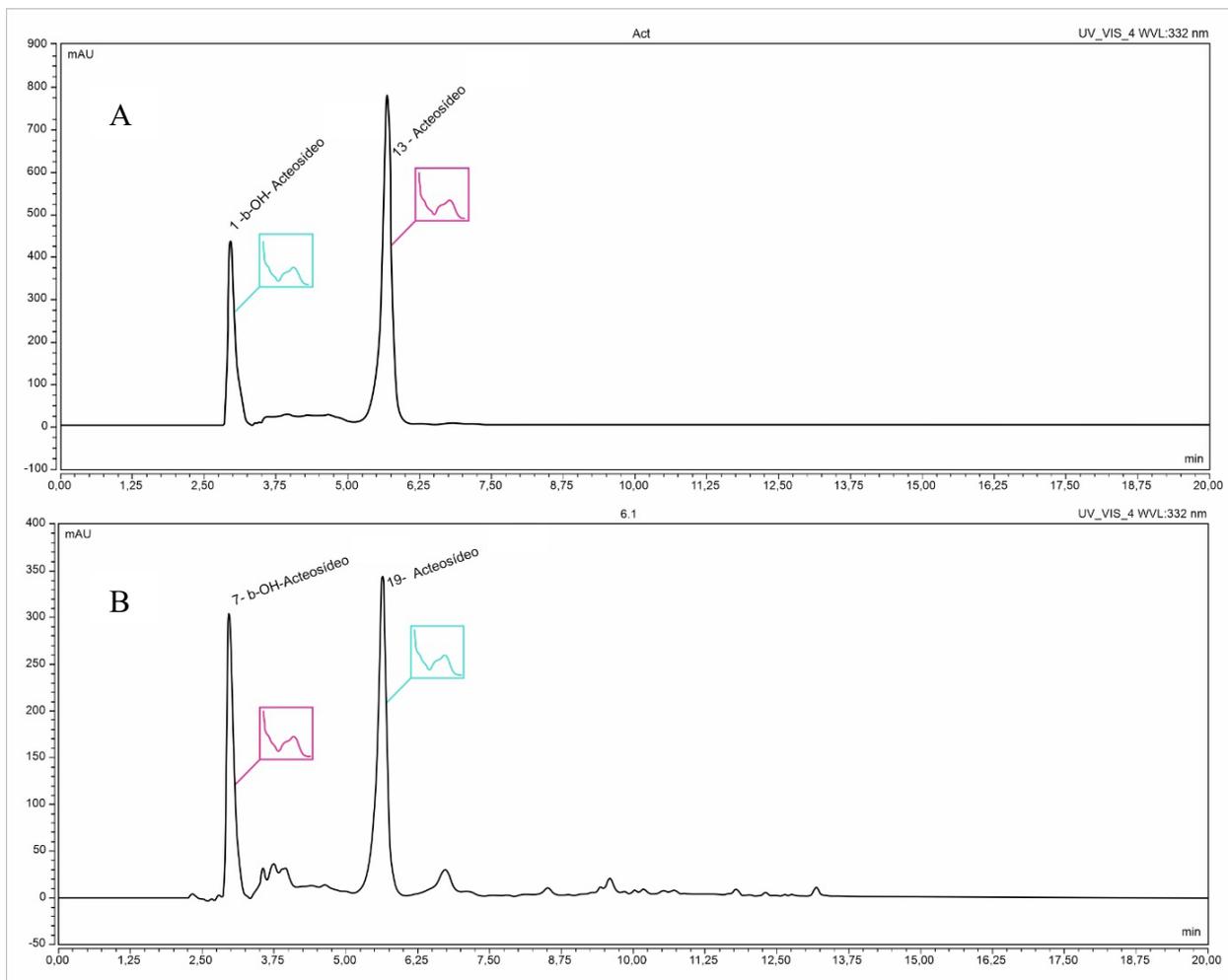


FIGURA 9 - Cromatogramas (A) padrão de Act+ β -OH-Act (tr: 2,967 e 5,690 min) (B) fração acetato de etila-*n*-butanol (6:1) (tr: 2,960 e 5,633min) à 332 nm, fluxo de 0,5mL/min e 25°C. tr: tempo de retenção

5.4. Validação

5.4.1 Seletividade

O método proposto para separação das substâncias Act+ β -OH-Act, demonstrou boa seletividade, uma vez que foi possível identificar e quantificar as substâncias de interesse (61)

Na figura 9A, foi possível analisar o perfil cromatográfico do padrão, o qual apresentou o tempo de retenção de 5,6 min para o acteosídeo e 2,9 min para o β -OH-acteosídeo. Também foi analisado o comportamento do padrão adicionado na fração AcEt:*n*-But (6:1) (figura 10A), aumentando a intensidade dos picos (figuras 10B). A pureza do pico foi avaliada utilizando o software Chromeleon em que o β -OH-acteosídeo apresentou a correspondência máxima do pico

de 948, já o acteosídeo a correspondência máxima de 1.000, ou seja, os valores estão adequados. A correspondência máxima significa que quanto mais próximo de 1.000 mais puro é o pico, então os espectros entre o início do pico e o final correspondem a 100% do espectro no pico máximo.

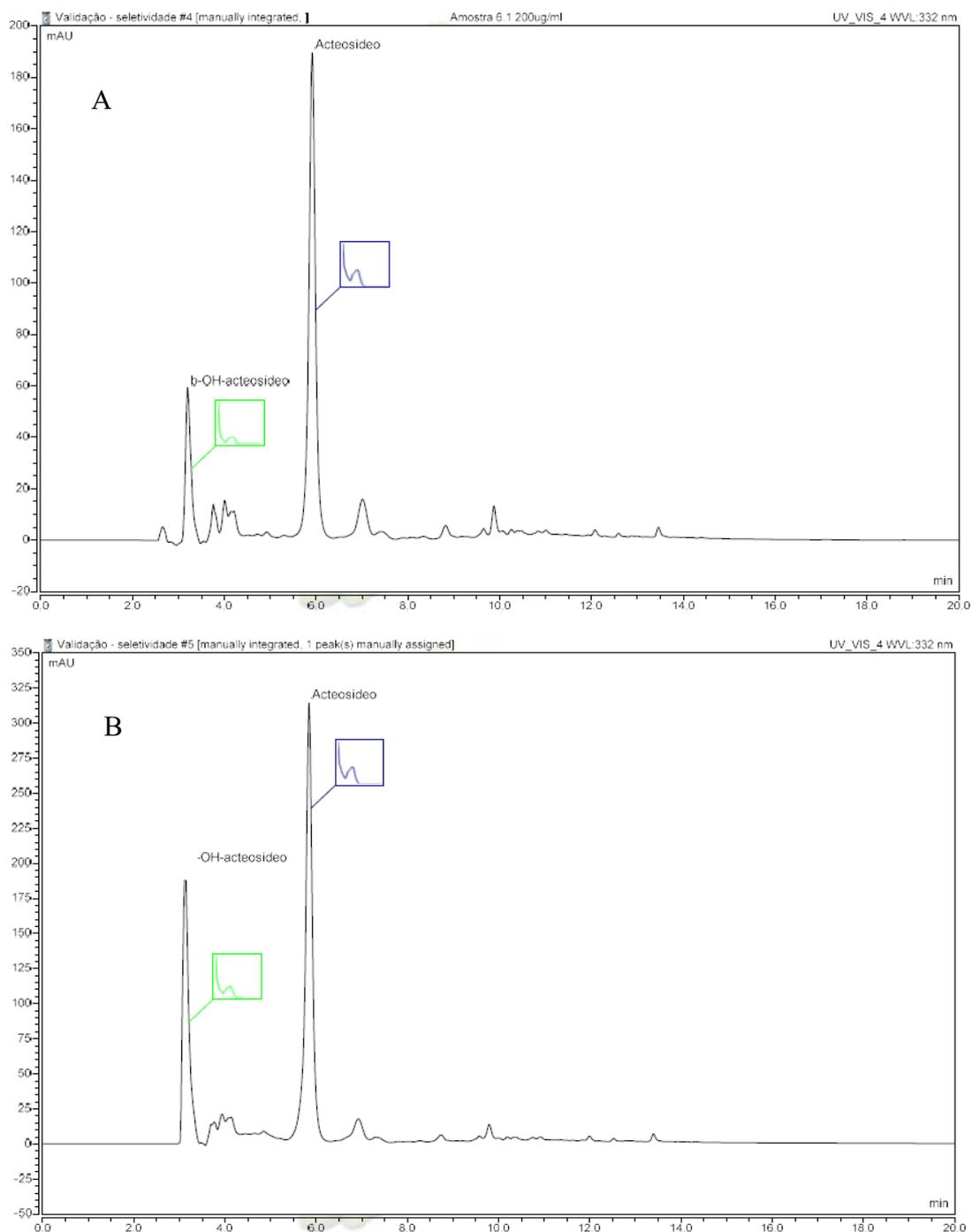


FIGURA 10 - Cromatogramas (A) fração AcEt:*n*-But (6:1) (tr: 3,193 e 5,913min) e (B) fração AcEt:*n*-But (6:1) adicionado padrão de Act+β-OH-Act (tr: 3,130 e 5,843min) a 200 µg/mL à 332 nm. fluxo de 0,5ml/min e 25°C. tr: tempo de retenção

5.4.2 Linearidade

A análise de linearidade foi avaliada por meio da capacidade do método em demonstrar respostas analíticas diretamente proporcional às concentrações da substância analisada. A faixa linear foi realizada com sete concentrações e seis soluções-mãe do padrão (Act+β-OH-Act), na faixa de trabalho de 6,25 à 200 µg/mL, preparadas de forma independente (61).

Foi possível analisar a representação gráfica das respostas em função da concentração, a equação da reta de regressão ($Y = 0,4713x + 1,3759$), o coeficiente de determinação (r^2) (0,996774) e o coeficiente de correlação (r) (0,998385) ($n=6$ de forma independente), estando de acordo com o preconizado na RDC 166 (2017) (61) (Figura 11, Tabela 4).

Os resultados obtidos por meio da análise de variância indicam que a regressão foi significativa, pois o $F_{\text{calculado}}$ possui valor maior que o F_{tabelado} . Além disso, a falta de juste demonstrou não ser significativa (F_{tabelado} maior que o $F_{\text{calculado}}$) (Tabela 5).

TABELA 4. Análise das médias das áreas, desvios padrão e coeficiente de variação (CV%) da curva analítica da soma do acteosídeo e β-OH-acteosídeo.

Concentração (µg/mL)	Média área da soma do Act+β- OH-Act ± DP	CV (%)
6,25	3,05 ± 0,11	3,64
12,5	7,10 ± 0,2	2,87
25	13,66 ± 0,59	4,32
50	25,58 ± 1,02	3,99
100	49,23 ± 1,75	3,56
150	72,53 ± 2,33	3,22
200	94,77 ± 3,80	4,01

DP: Desvio padrão; CV: Coeficiente de variação

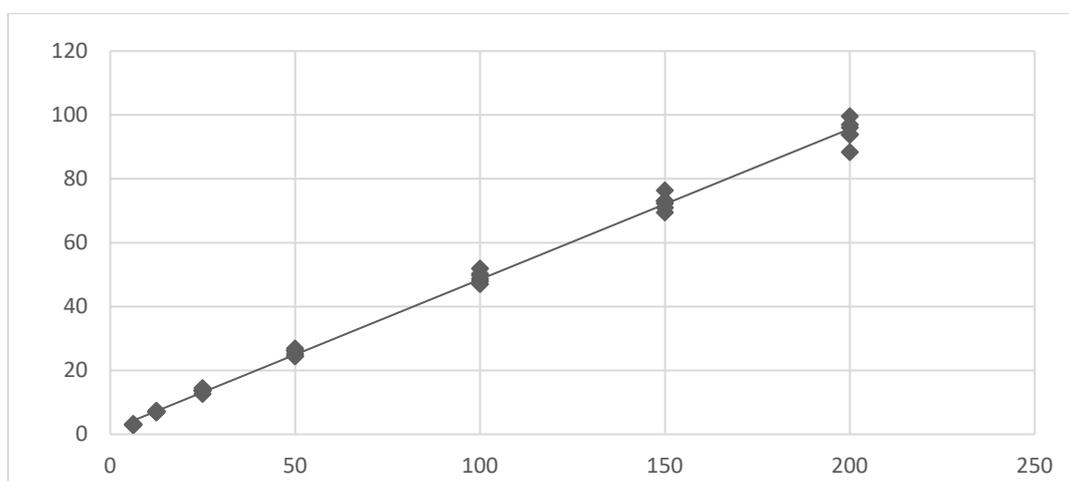


FIGURA 11 - Curva de análise do Act+β-OH-Act obtida por CLAE. Resultado expresso por seis análises realizadas de forma independente.

TABELA 5. Resultados da ANOVA para a análise da regressão e da falta de ajuste.

	Grau de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1	44766,33915	44766,33915	12357,49775	4,084745733
Resíduo	40	144,9042195	3,622605487		
Erro puro	35	122,1826	3,490933		
Falta de ajuste	5	22,7216	4,544314	1,301748	2,485143221

5.4.3 Limite de Detecção e Quantificação

No limite de detecção a análise foi realizada com base na curva analítica apresentando o valor de 3,09 $\mu\text{g/mL}$. Segundo a RDC166 (2017) (61) o limite de detecção é a menor quantidade de analito que é possível ser detectado, porém não necessariamente quantificado.

Já o limite de quantificação foi definido pela mesma RDC como a menor quantidade de uma substância que pode ser quantificada com precisão e exatidão. O valor resultante foi de 9,362 $\mu\text{g/mL}$ para as condições experimentais estabelecidas neste método de separação (61).

O limite de quantificação obtida nos cálculos ficou maior do que o primeiro ponto da curva. No entanto foi possível observar por meio da curva analítica, que é possível quantificar o primeiro ponto de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, pois os cálculos estatísticos mostraram que a regressão foi significava e a falta de ajuste não foi significativo.

5.4.4 Precisão

Os resultados apresentados na tabela 6 mostram que não houve diferença significativa, de acordo com a AOAC (2019) (67) nas concentrações utilizadas o coeficiente de variação está dentro do esperado, principalmente por se tratar de uma matriz complexa em baixa concentração, ou seja, o método apresentado é preciso.

A precisão pode ser realizada em três etapas: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade tem o intuito de avaliar as amostras sob as mesmas condições experimentais, mesmo analista e mesma instrumentação, em uma única corrida analítica. A precisão intermediária avalia a proximidade entre os resultados obtidos da análise

de uma amostra em dias diferentes e operadores distintos. Já a reprodutibilidade é realizada por diferentes laboratórios (61).

TABELA 6. Avaliação da repetibilidade, precisão intermediária, em dias diferentes, e analista diferentes da fração AcEt:*n*-But (6:1).

Repetibilidade		
Níveis	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)¹ \pm DP (CV (%))	Teor (%)² \pm DP (CV (%))
NB	62,07 \pm 1,08 (1,74)	50,9 \pm 0,92 (1,81)
NM	122,39 \pm 1,27 (0,60)	50,2 \pm 0,29 (0,59)
NA	177,51 \pm 2,53 (1,43)	48,5 \pm 0,60 (1,24)
Precisão intermediária em dias diferentes		
Níveis	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)¹ \pm DP (CV (%))	Teor (%)² \pm DP (CV (%))
NB	62,37 \pm 1,5 (2,44)	51,1 \pm 1,25 (2,44)
NM	121,88 \pm 2,34 (1,92)	49,9 \pm 0,96 (1,92)
NA	176,16 \pm 3,7 (2,10)	48,1 \pm 1,01 (2,11)
Precisão intermediária em dias diferentes com analistas diferentes		
Níveis	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)¹ \pm DP (CV (%))	Teor (%)² \pm DP (CV (%))
NB	61,73 \pm 1,68 (2,73)	50,6 \pm 1,38 (2,73)
NM	127,52 \pm 5,74 (4,50)	52,3 \pm 2,35 (4,50)
NA	185,67 \pm 8,65 (4,66)	50,7 \pm 2,36 (4,66)

Resultado expresso em média \pm desvio padrão de três análises (n=3) preparadas em dias diferentes e analistas diferentes, realizadas de forma independente.

¹ Concentração de acteosídeo e β -OH-acteosídeo na solução leitura

² Teor de de acteosídeo e β -OH-acteosídeo na fracção acetato de etila:*n*-butanol (6:1)

5.4.5 Exatidão

Os resultados estão apresentados na tabela 7. A etapa da exatidão deve ser obtida por meio da concordância entre os resultados individuais em relação a um valor aceito como verdadeiro. Esse método foi realizado a partir da contaminação das soluções-mãe com o padrão, observando a porcentagem de recuperação que está dentro do esperado de 80–120%, portanto o método analítico apresenta exatidão (61).

Para cálculo da concentração teórica de Act+ β -OH-Act na solução leitura, foi somado a concentração referente à adição do padrão (25,010; 74,969 e 124,989 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e a concentração proveniente da amostra. Para isso, considerou-se o resultado de teor obtido no

teste de repetibilidade no nível médio, ou seja, o teor de 50,2% de Act+ β -OH-Act na fração AcEt:*n*-But (6:1). Dessa forma, 1 mg de fração AcEt:*n*-But (6:1) contém 502 μ g de Act+ β -OH-Act, que após diluições, representa 30,622 μ g/mL nas soluções leituras.

TABELA 7. Avaliação da exatidão da determinação do teor de Act+ β -OH-Act na fração AcEt:*n*-But (6:1) pelo método de adição de padrão.

Níveis	Concentração teórica de Act+β-OH-Act na solução leitura (μg/mL)	Concentração experimental Act+β-OH-Act na solução leitura (μg/mL) \pm DP (CV%)	Recuperação (%)
NB	55,632	56,27 \pm 2,02 (3,60)	101,1
NM	105,591	113,44 \pm 4,82 (4,25)	107,0
NA	155,611	160,65 \pm 2,54 (1,5)	103,2

Resultados expresso em média \pm desvio padrão de três análises (n=3) realizadas de forma independentemente.

Os resultados da tabela 7 demonstram que a recuperação em 3 níveis diferentes (baixo, médio e alto) foi dentro do critério 80-120%, confirmando que o método analítico tem exatidão adequada para a determinação do teor de Act+ β -OH-Act na fração AcEt:*n*-But (6:1) na faixa de linearidade do método.

5.4.6 Robustez

Neste parâmetro foi realizado a variação controlada do comprimento de onda, temperatura e fluxo. O coeficiente de variação obtidos em um mesmo nível de concentração (baixo, médio e alto) foi menor que 2,2% para variação de temperatura e comprimento de onda, demonstrando que o método é robusto para estas condições (Tabela 8). Apenas na análise da variação do fluxo foi possível observar uma grande variação dos resultados (CV>19%). Dessa forma é necessário o fluxo de 0,5 mL/min para manter a separação ideal e as concentrações corretas.

O parâmetro da robustez é realizado para o desenvolvimento do método analítico pois indica a capacidade do método em resistir a pequenas variações das condições analíticas, mostrando assim, se o método proposto apresenta alguma susceptibilidade nas condições analíticas avaliadas, ou condições analíticas que necessitam de precauções (61).

TABELA 8. Avaliação da robustez do método para a separação das substâncias da fração AcEt:*n*-But (6:1).

Comprimento de onda 330, 332 e 334 nm				
Níveis	Concentração			CV (%)¹
	330 ± DP	332 ± DP	334 ± DP	
NB	63,71 ± 0,49	63,30 ± 0,50	62,69 ± 0,45	1,07
NM	124 ± 0,75	122,97 ± 1,00	121,32 ± 0,92	1,14
NA	177,7 ± 0,58	176,69 ± 0,69	173,97 ± 0,42	0,99
Temperatura 24, 25 e 26 °C				
Níveis	Concentração			CV (%)¹
	24 ± DP	25 ± DP	26 ± DP	
NB	61,33 ± 0,85	63,30 ± 0,50	62,23 ± 1,83	2,16
NM	120,92 ± 0,20	122,97 ± 1,00	124,75 ± 0,33	1,42
NA	174,24 ± 0,58	176,69 ± 0,69	174,84 ± 5,37	1,79
Fluxo 0,4, 0,5 e 0,6 mL/min				
Níveis	Concentração			CV (%)¹
	0,4 ± DP	0,5 ± DP	0,6 ± DP	
NB	82,90 ± 3,07	63,30 ± 0,50	51,57 ± 0,18	20,93
NM	158,89 ± 0,10	122,97 ± 1,00	103,28 ± 1,95	19,04
NA	232,32 ± 5,08	176,69 ± 0,69	148,82 ± 1,14	19,85

Resultado expresso em média ± desvio padrão de nove experimentos realizados independentemente, a cada três análises (n=3) foram lidas em um comprimento de onda, temperaturas e fluxo diferentes.

¹ Coeficiente de variação referente aos nove experimentos de cada condição (comprimento de onda, temperatura e fluxo diferente) e níveis (baixo, médio e alto).

A validação desse método de separação e doseamento foi essencial, para garantir e fornecer evidências que o método possui uma boa separação das substâncias além de quantificar o Act+β-OH-Act. Dessa forma foi possível confirmar e quantificar o teor das substâncias majoritárias da fração AcEt:*n*-But (6:1), sendo de 50,2% de Act+β-OH-Act.

5.4.7 Doseamento dos extratos e frações

Com a metodologia de doseamento validada foi possível quantificar e analisar o perfil cromatográfico de todos os extratos e frações obtidos (Figura 12). As amostras avaliadas foram

as frações AcEt:*n*-But (3:1), (1:1), o EB e EB com 10% da fração (6:1). Essas amostras apresentaram teores de 34,68; 28,44; 8,12 e 13,34% de Act+ β -OH-Act, respectivamente.

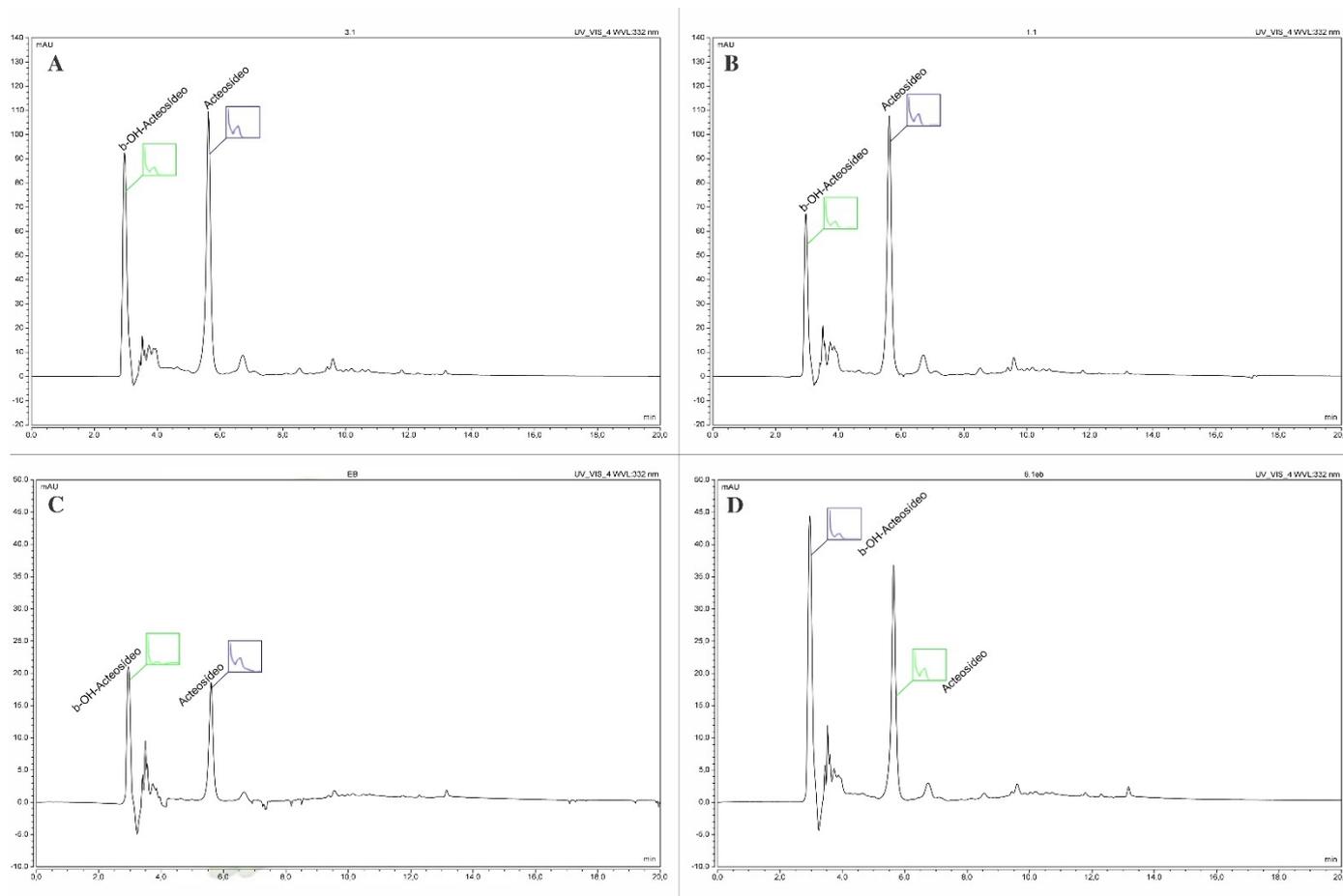


FIGURA 12 - Cromatogramas (A) fração AcEt:*n*-But (3:1) (B) fração AcEt:*n*-But (1:1) (C) extrato bruto (EB) e (D) EB com 10% da fração AcEt:*n*-But (6:1) à 332 nm, fluxo 0,5 mL/min, 25°C.

5.5. Potencial fotoprotetor *in vitro*

5.5.1 Ensaio de citotoxicidade celular

A viabilidade celular realizada pela técnica de vermelho neutro (VN), tem como princípio a entrada do corante catiônico por meio de difusão não iônica na membrana celular, assim acumulando-se nos lisossomas das células vivas, podendo ser observada a intensidade da coloração no leitor de microplaca (68).

Na avaliação da viabilidade celular com as células apenas tratadas (Figura 13), observou-se que as frações AcEt:*n*-But (3:1) e (1:1) não apresentaram efeito citotóxico em L929 até concentração de 50 μ g/mL, porém a fração AcEt:*n*-But (6:1) apresentou citotoxicidade a

partir da concentração de 25 µg/mL. Já o Act+β-OH-Act, exibiu efeito citotóxico apenas na maior concentração testada (100 µg/mL), o qual ainda demonstrou crescimento celular significativo comparado ao controle, podendo indicar uma possível atividade proliferativa.

Ainda avaliando a viabilidade celular dos fibroblastos frente aos tratamentos, o EB e o extrato bruto com 10% de fração AcEt:*n*-But 6:1 (6:1EB) não apresentaram citotoxicidade a partir das concentrações abaixo de 200 µg/mL, sem diferença significativa do controle que não foi submetida ao tratameto com a amostras (Figura 13).

Na literutura foi observado alguns trabalhos que apresentam a análise de viabilidade celular com fibroblasto L929, por meio da técnica de vermelho neutro. Esses trabalhos apresentam objetivos semelhantes ao deste trabalho, selecionar concentrações que não apresentam morte celular significativa. Silva (2021) (69) expôs as células durante 24 h ao 2-acetil fenotiazina e por meio de cálculos estatísticos observou que em concentrações abaixo de 200 µM não houve morte celular diferente do controle.

Oliveira (2018) (70) também realizou a mesma análise com extrato etanólico e fração acetato de etila de *Nectandra hihua* (Ruiz & Pav.) Rohwer, observando que nas concentrações testadas de 10, 15 e 20 µg/mL a linhagem celular de fibroblastos L929 não apresentou morte celular significativamente diferente do controle.

Esses estudos também estão relacionados com a proteção celular aos raios UVB, pois essa análise é fundamental para os experimentos a serem realizados posteriormente. Esses trabalhos demonstram ser essencial utilizar concentrações em que as frações e os extratos não apresentam morte celular significativa.

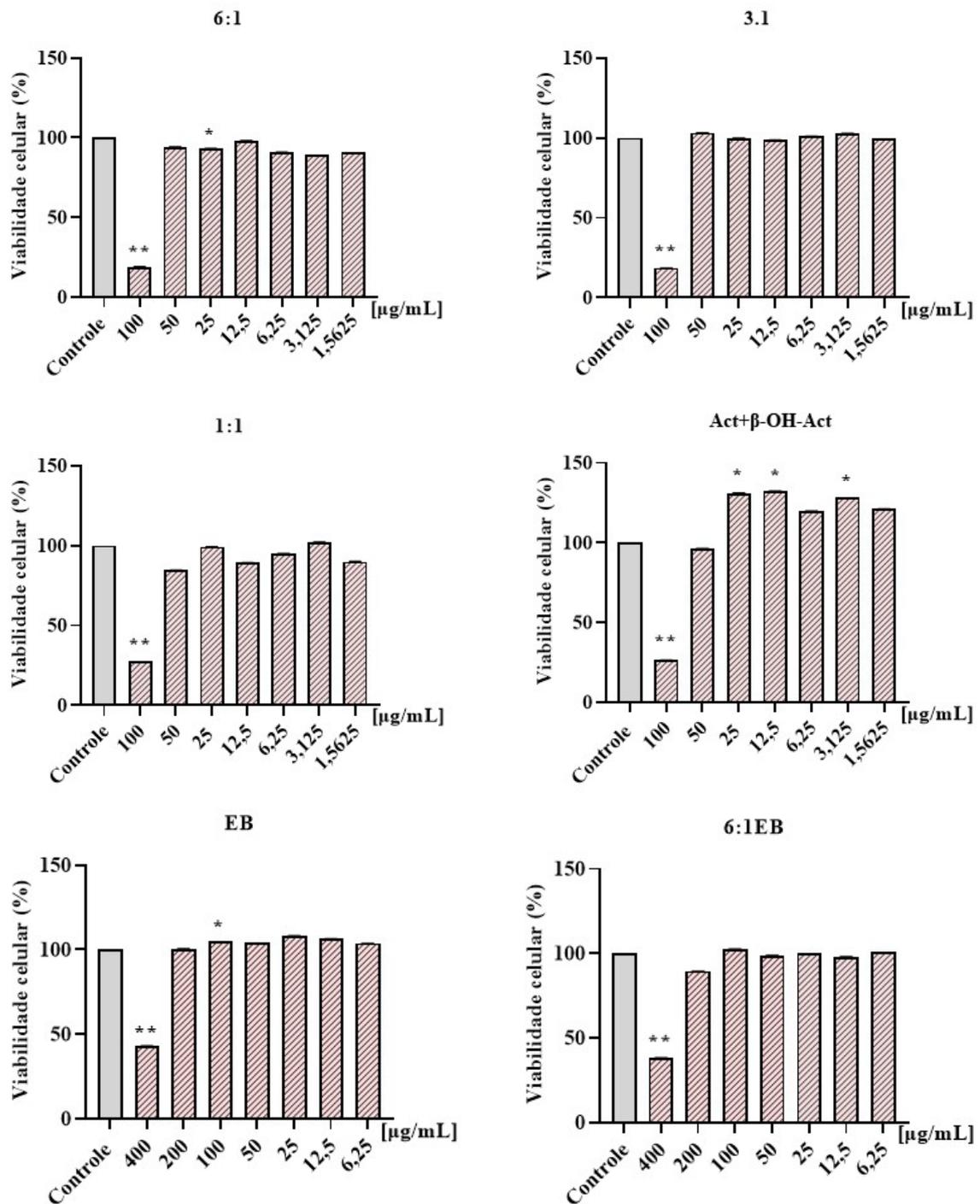


FIGURA 13. Avaliação da viabilidade com a linhagem celular de fibroblastos L929, quando em contato com frações, Act+ β -OH-Act, extrato bruto e extrato bruto com a fração 6:1 a 10%, depois de 24 h de tratamento, analisado por meio da técnica de vermelho neutro (40 $\mu\text{g/mL}$), com a leitura realizada em 540 nm. Controle negativo: células não tratadas com as amostras. Fibroblastos tratados nas concentrações de 1,5625-100 $\mu\text{g/mL}$ para frações e Act+ β -OH-Act e tratados nas concentrações de 6,25-400 $\mu\text{g/mL}$ para os extratos. Em que: ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ apresenta diferença significativa em relação ao grupo controle.

5.5.2 Ensaio de citotoxicidade irradiada

A radiação UVB pode causar a geração de EROs nas células causando danos celulares, como o fotoenvelhecimento e também a modulação de genes, podendo levar ao câncer de pele (71). Assim, avaliou-se o potencial de proteção a radiação UVB e determinado quais amostras seriam analisadas de acordo com a sua capacidade antioxidante e a não toxicidade a célula. O grupo que sofreu irradiação teve diminuição de 45% da viabilidade celular (Figura 14A) quando comparado com o grupo controle (CN) que não sofreu irradiação. A fração AcEt:*n*-But (6.1) apresentou proteção principalmente nas concentrações de 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL apresentando aumento da viabilidade celular de 1,05; 3,69 e 6,19%, respectivamente, enquanto a quercetina mostrou aumento de 3,35%.

Na figura 14B é possível observar a proteção significativa do Act+β-OH-Act aos raios UVB. As células do CN apresentaram uma diminuição de 46,25% quando submetidas a irradiação UVB. O Act+β-OH-Act em todas as concentrações (50 a 1,5625 µg/mL) aumentou a viabilidade de 9,46 a 14,31%, comparando com a quercetina de 16,12%. O EB apresentou diferença significativa em todas as concentrações, porém apenas em concentrações abaixo de 50 µg/mL houve proteção celular, variando de 1,43 a 15,73% e a quercetina apresentou proteção celular de 18,76% (Figura 14C).

Com os resultados obtidos foi possível comprovar que todas as amostras apresentaram proteção celular à radiação UVB, principalmente nas menores concentrações. As substâncias majoritárias na fração e no EB (acteosídeo e β-OH-acteosídeo), tem maior afinidade de absorção no comprimento de onda de 332 nm, porém conseguem absorver radiação em todo o comprimento de onda dos raios UVB (280 a 315 nm) explicando a proteção observada.

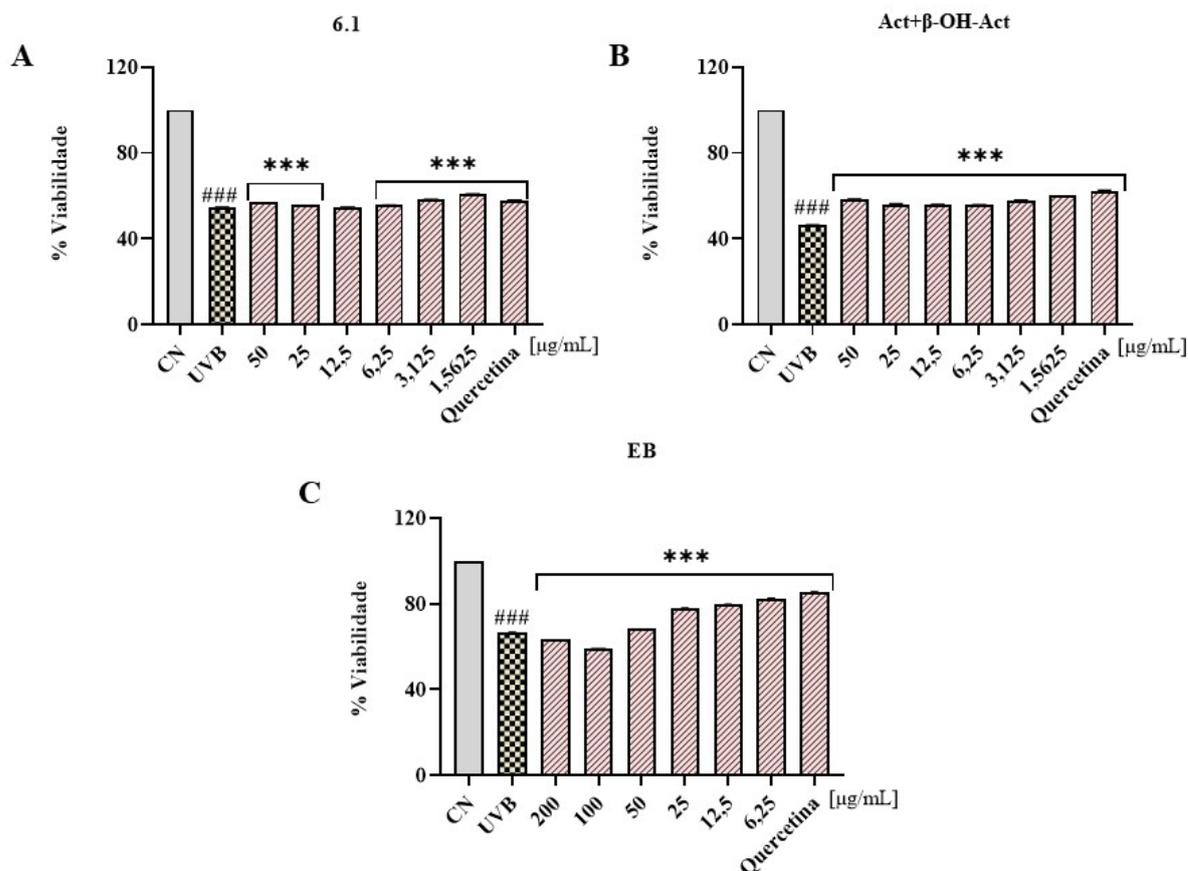


FIGURA 14 - Avaliação da citotoxicidade irradiada celular da fração 6.1, do Act+β-OH-Act, e do extrato bruto, na linhagem celular de fibroblastos L929 depois de 1 h de tratamento em seguida irradiado (600 mJ/cm²) e depois de 24 h analisado por meio da técnica de vermelho neutro (40 µg/mL), com a leitura realizada em 540 nm. CN (controle negativo): células não tratadas e não irradiadas, UVB: Células não tratadas e irradiadas. Fibroblastos tratados nas concentrações de 1,5625-50 µg/mL para fração 6.1 e Act+β-OH-Act, e tratados nas concentrações de 6,25-200 µg/mL para o extrato. Em que: *** $p < 0,001$ apresenta diferença significativa em relação ao grupo UVB e ### $p < 0,001$ apresenta diferença significativa em relação ao grupo CN, análise de ANOVA duas vias com teste de 'Tukey'.

5.5.3 Determinação de EROS intracelular

Com a comprovação que as amostras protegem aos raios UVB, foram determinadas as melhores concentrações para analisar as EROs produzidas a partir da exposição à irradiação UVB. Esse ensaio foi realizado utilizando H₂DCF-DA, quando desacetilado por esterases celulares, reage com os radicais intracelulares, oxida e forma o DCF um produto fluorescente, que é medido com auxílio do fluorímetro (72).

Com esse ensaio, foi possível afirmar que a fração AcEt:*n*-But (6.1) e o Act+β-OH-Act teve capacidade em impedir a formação significativa das EROs a partir da exposição à radiação.

O grupo de células não tratadas (grupo UVB) apresentou aumento da produção das EROs quando irradiadas (Figura 15), as células tratadas com a fração AcEt:*n*-But (6.1) nas

concentrações de 6,25; 3,25 e 1,5625 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram capacidade de redução das EROs de 24,48; 29,60 e 30,27%, respectivamente.

O Act+ β -OH-Act também conseguiu reduzir significativamente as EROs formadas a partir da exposição aos raios UVB, em uma proporção de 18,92; 25,44 e 33,38%, utilizando as mesmas concentrações que a fração. Já o EB em concentrações de 25 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou redução de 5,99 a 11,07%, não sendo uma redução estatisticamente significativa.

Com esses resultados é possível afirmar que a fração AcEt:*n*-But (6.1) e o Act+ β -OH-Act, são amostras que tem um grande potencial de diminuir as EROs formadas por meio da exposição solar. Seria de grande benefício para indústria farmacêutica e cosmética, uma substância de origem natural com capacidade de redução das EROs, evitando o dano ao DNA ou a proteínas celulares, além da baixa toxicidade celular (73).

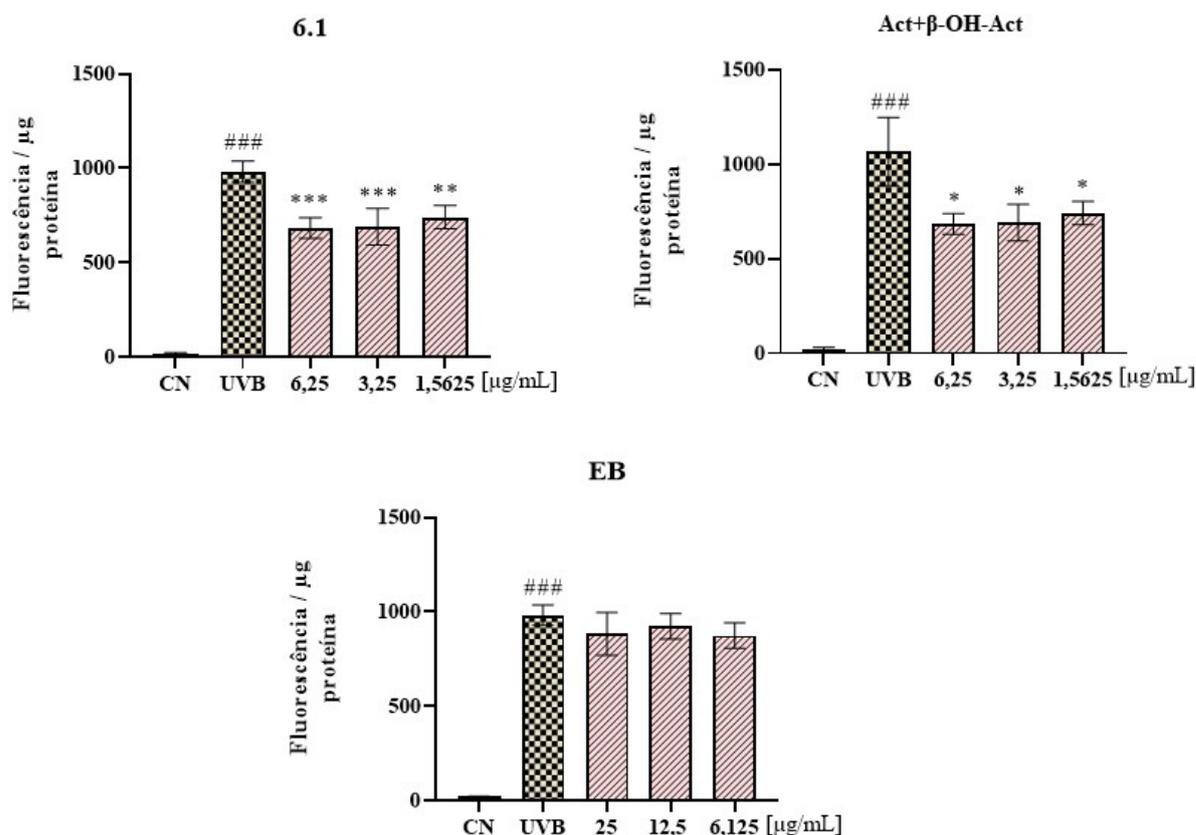


FIGURA 15 - Avaliação da proteção da fração 6.1, do Act+ β -OH-Act, e do extrato bruto na diminuição das EROs, na linhagem celular de fibroblastos L929 depois de 1 h de tratamento em seguida irradiado (600 mJ/cm^2), realizado a leitura da fluorescência e analisado o teor de proteínas em seguida. CN (controle negativo): células não tratadas e não irradiadas, UVB: Células não tratadas e irradiadas. Fibroblastos tratados nas concentrações de 1,5625-50 $\mu\text{g/mL}$ para fração 6.1 e Act+ β -OH-Act, e tratados nas concentrações de 6,25-200 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato. Em que: *** $p < 0,001$ e * $p < 0,05$, apresenta diferença significativa em relação ao grupo UVB e ### $p < 0,001$ apresenta diferença significativa em relação ao grupo CN.

5.5.4 Ensaio de migração celular

A fração AcEt:*n*-But (6:1) e o Act+ β -OH-Act, foram submetidas a análise de migração celular durante 48 h. Pode-se observar que não houve um crescimento celular significativo das células tratadas com diferentes concentrações das amostras, comparadas com às células que não sofreram tratamento. Sugere-se que as amostras podem não envolver a migração de fibroblastos L929 no processo de cicatrização, mas podem envolver outros tipos celulares e também processos moleculares e bioquímicos no processo de migração celular ou cicatrização (74) (Figura 16).

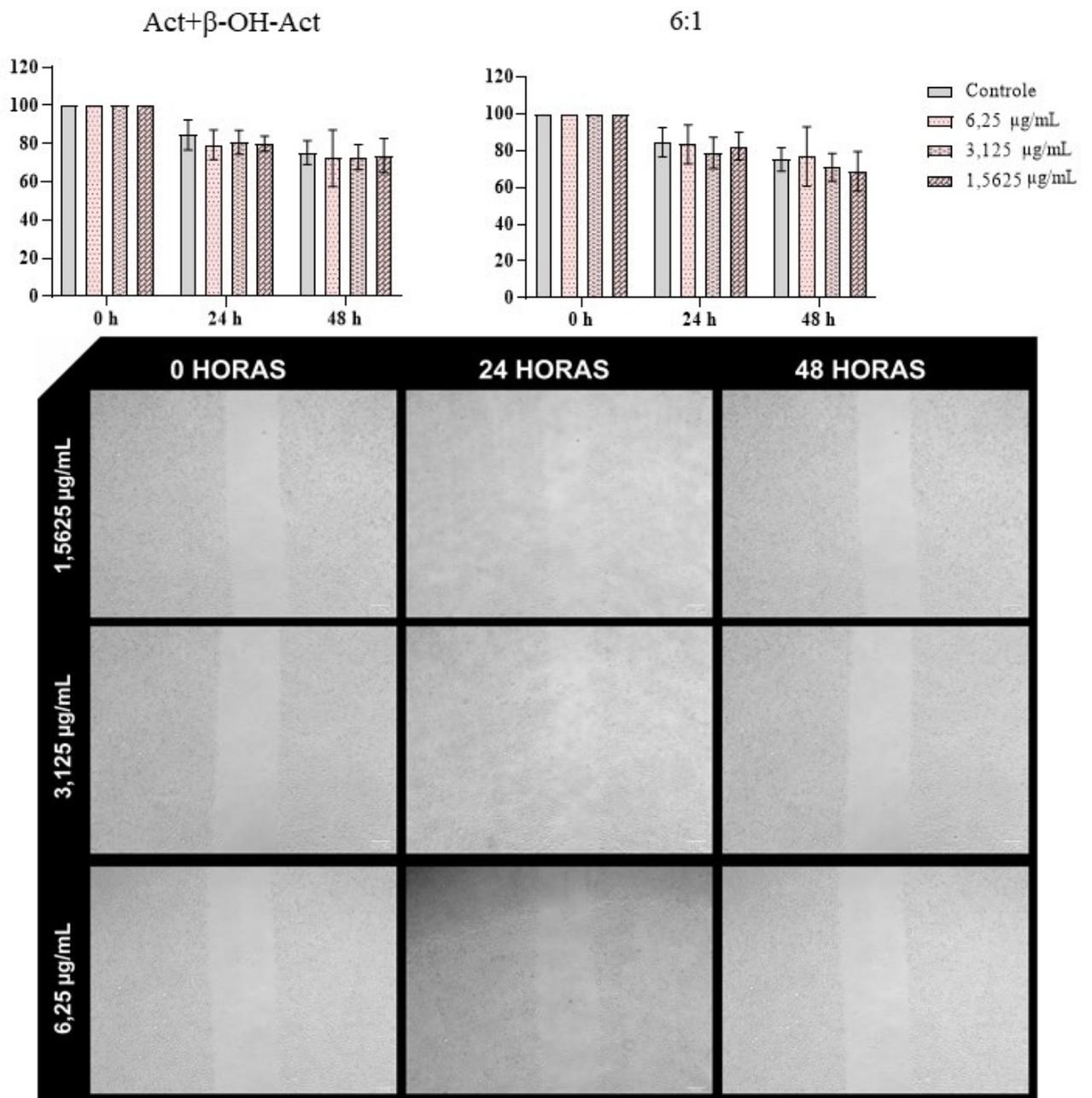


FIGURA 16- Avaliação da migração celular do Act+β-OH-Act e fração 6:1 na linhagem celular de fibroblastos L929 depois de 24 e 48 h de tratamento, analisada em microscópio Olympus modelo: CKX41 e programa: *Olympus cell sens entry*. Controle (controle negativo) células não tratadas. Fibroblastos tratados na concentração de 6,25-25 μg/mL, análise da abertura da ferida realizada por ImageJ e os cálculos estatísticos por Graphpad Prism 9, two way ANOVA.

5.6 Fração das flores de *P. venusta* para fotoproteção

Os raios UVB é a principal radiação que pode causar danos a pele quando exposta sem proteção, as EROs formadas são responsáveis por danos ao DNA das células, podendo provocar modificações e a formação de células tumorais (27). Um ingrediente ativo para proteção de origem natural, como a fração produzida que tem capacidade de proteção aos raios UVB, é uma alternativa para substituição dos ativos sintéticos usados em fotoprotetores atualmente.

Foi possível observar com os resultados obtidos que a fração AcEt:*n*-But 6:1 foi a amostra que apresentou os melhores resultados em todos os testes, mostrando potencial antioxidante e proteção contra os raios UVB, além da diminuição da formação das EROs. A *P. venusta* é uma espécie trepadeira encontrada em todo território nacional, nascendo em cercas e beira de estrada, tratada como pragas em plantações, porque nasce facilmente e se alastra, ou seja, de fácil cultivo para produção em larga escala de extratos.

As substâncias majoritárias encontradas no extrato e na fração de *P. venusta* são o acteosídeo e o β -OH-acteosídeo, fenilpropanoídes, que conseguem absorver radiação em uma longa faixa espectral, podendo ser os metabólitos responsáveis pelos resultados encontrados em todas as amostras, já que também foi realizado as análises com a mistura dessas duas substâncias isoladas e comprovou que elas têm capacidade de proteção contra os raios UVB.

Em razão dos resultados confirmar o potencial fotoprotetor da fração AcEt:*n*-But 6:1 mais estudos ainda são necessários, como a incorporação dessa amostra em uma formulação para analisar o fator de proteção e a estabilidade da mesma.

6 CONCLUSÃO

Todas as amostras apresentaram ótima capacidade antioxidante em diferentes métodos, porém a fração AcEt:*n*-But (6:1) e o Act+ β -OH-Act se destacaram, comparando com a quercetina utilizada com padrão.

A mistura das duas substâncias majoritárias (acteosídeo + β -OH-acteosídeo) presentes em todos extratos e frações analisadas foram confirmadas e quantificadas pela metodologia de doseamento desenvolvida e validada.

As amostras foram submetidas a ensaios de citotoxicidade celular para analisar a faixa de concentração possível para os ensaios de proteção aos raios UVB, sendo de 50 - 1,5625 μ g/mL para as frações e para o Act+ β -OH-Act, exceto para a fração AcEt:*n*-But (6:1) que a faixa de viabilidade é de 25-1,5625 μ g/mL, para os extratos a faixa de viabilidade é 200 - 6,25 μ g/mL.

A fração AcEt:*n*-But (6:1), o Act+ β -OH-Act e o EB, protegeram a linhagem celular de fibroblasto L929 aos raios UVB. E somente a fração AcEt:*n*-But (6:1) e o Act+ β -OH-Act conseguiram reduzir significativamente a formação de EROs a partir da exposição aos raios UVB. Já no ensaio de migração celular as amostras analisadas não apresentaram a capacidade de migração celular ou regeneração da ferida artificial.

Contudo, podemos concluir que a fração AcEt:*n*-But (6:1) e o Act+ β -OH-Act são amostras que tem potencial a proteção contra os raios UVB e ótima capacidade antioxidante, podendo ser utilizada futuramente em cosméticos para auxiliar e aumentar a proteção aos raios UVB, diminuindo a formação de EROs.

7 EQUIPE EXECUTORA E LOCAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

7.1 Equipe executora

- Clara Beatriz de Lima (discente): Responsável por todas as atividades citadas;
- João Carlos Palazzo de Mello (orientador);
- Daniela Cristina de Medeiros Araújo (coorientadora);
- Admir Arantes (auxiliar técnico).

7.2 Locais de realização de experimento

- Laboratório de Biologia Farmacêutica - PALAFITO - Bloco K80: Laboratório de Análise, Controle de Qualidade, Fitoquímica e Desenvolvimento em Fitoterápicos. Controle de qualidade da droga vegetal, obtenção do extrato e testes propostos na metodologia do estudo (UEM);
- Laboratório de Biologia Farmacêutica - PALAFITO - Bloco T22: Laboratório de Analítica e Cultura de Células (UEM);
- Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP) - Bloco B08 (UEM);
- Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos - Bloco B08 (UEM).

REFERÊNCIAS

1. Ferreira DT, Alvares PSM, Houghton PJ, Braz R. Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance. *Química Nova*. 2000;23(1):42-6.
2. Roy P, Amdekar S, Kumar A, Singh R, Sharma P, Singh V. In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *Journal of Ethnopharmacology*. 2012;140(1):186-92.
3. Mostafa N, El-Dahshan O, Singab A. *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers: a botanical, pharmacological and phytochemical review. *Medicinal Aromatic Plants*. 2013;2(3):1-6.
4. Pereira AMS, Hernandez C, Pereira SIV, Bertoni BW, França SC, Pereira PS, et al. Evaluation of anticandidal and antioxidant activities of phenolic compounds from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. *Chemico-Biological Interactions*. 2014;224:136-41.
5. Fourtanier A, Moyala D, Seite S. UVA filters in sun-protection products: regulatory and biological aspects. *Photochemical Photobiological Sciences*. 2002;1(11):81-9.
6. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Taxas de mortalidade por câncer 2022 [07 jan. 2022]. Available from: <https://www.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml#panelResultado>.
7. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Ecossistemas [16 Agosto 2022]. Available from: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1>.
8. Falzon CC, & Balabanova, A. *Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine*. Primary care. 2017;44:217-27.
9. Anvisa. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais 2020 [27 out 2022]. Available from: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterapicos>.
10. Hekmatpou D, Mehrabi, F., Rahzani, K., & Aminiyan, A. The Effect of Aloe Vera Clinical Trials on Prevention and Healing of Skin Wound: A Systematic Review. *Iranian journal of medical sciences*. 2019;44:1-9.
11. Ministério do Meio Ambiente - Serviços Ecossistêmicos [2022]. Available from: <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/ecossistemas-1/conservacao-1/servicos-ecossistemicos/servicos-ecossistemicos>.
12. World flora online. WFO. Bignoniaceae [20 Agosto 2022]. Available from: <http://worldfloraonline.org/search?query=BIGNONIACEAE>.
13. Santos LLd, Santos LLd, Alves ASA, Oliveira LdSDd, Sales MFd. Bignoniaceae Juss. no Parque Nacional Vale do Catimbau, Pernambuco. *Rodriguésia*. 2013;64:479-94.
14. Lohmann LG. Bignoniaceae 2021 [10 dez. 2021]. Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB112305>.
15. Von Poser GL, Schripsema J, Henriques AT, Jensen SR. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochemical Systematics Ecology*. 2000;28(4):351-66.
16. Castillo L, Rossini C. Bignoniaceae metabolites as semiochemicals. *Molecules*. 2010;15(10):7090-105.
17. Roy P, Amdekar S, Kumar A, Singh V. Preliminary study of the antioxidant properties of flowers and roots of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2011;11(1):69.
18. Torres CA, Zamora CMP, Nuñez MB, Gonzalez AM. *In vitro* antioxidant, antilipoxygenase and antimicrobial activities of extracts from seven climbing plants belonging to the Bignoniaceae. *Journal of integrative medicine*. 2018;16(4):255-62.
19. Anjos Dos Santos GM, Laboratory FP, Reading Uo. *Wood Anatomy, Chloroplast DNA, and Flavonoids of the Tribe Bignonieae (bignoniaceae)*: University of Reading; 1995.
20. Lohmann LG. *Pyrostegia in Flora e Funga do Brasil 2022* [Available from: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB113860>].

21. Gentry AH. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. *Memoirs of the New York Botanical Gardens*. 1990;55:118-29.
22. Carvalho Veloso C, de Oliveira MC, da Costa Oliveira C, Rodrigues VG, Giusti-Paiva A, Teixeira MM, et al. Hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers flowers improves inflammatory and metabolic dysfunction induced by high-refined carbohydrate diet. *Journal of ethnopharmacology*. 2014;151(1):722-8.
23. Balestra AC, Sandy CM, Ramalho F, Júnior AAJ, Contini SHT, Crevelin EJ, et al. Aqueous *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers extract attenuates allergen-induced asthma in a mouse model via an antioxidant mechanism. *Journal of Asthma*. 2021;58(6):808-18.
24. Moreira CG, Horinouchi CD, Souza-Filho CS, Campos FR, Barison A, Cabrini DA, et al. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. *Journal of ethnopharmacology*. 2012;141(3):1005-11.
25. Moreira C, Carrenho L, Pawloski P, Soley B, Cabrini D, Otuki M. Pre-clinical evidences of *Pyrostegia venusta* in the treatment of vitiligo. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;168:315-25.
26. Afaq F, Adhami VM, Ahmad N, Mukhtar H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2002;7(4):784-92.
27. Morley N, Curnow A, Salter L, Campbell S, Gould D. N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*. 2003;72(1-3):55-60.
28. Wondrak GT, Jacobson MK, Jacobson EL. Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochemical photobiological sciences*. 2006;5(2):215-37.
29. Wang M, Charareh P, Lei X, Zhong JL. Autophagy: Multiple mechanisms to protect skin from ultraviolet radiation-driven photoaging. *Oxidative medicine cellular longevity*. 2019.
30. Rhodes LE, Belgi G, Parslew R, McLoughlin L, Clough GF, Friedmann PS. Ultraviolet-B-Induced Erythema is Mediated by Nitric Oxide and Prostaglandin E2 in Combination. *Journal of Investigative Dermatology*. 2001;117(4):880-5.
31. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in biology and medicine. *Reactive oxygen species*. 2016;1(1):9.
32. Acharya A, Das I, Chandhok D, Saha T. Redox regulation in cancer: a double-edged sword with therapeutic potential. *Oxidative medicine cellular longevity*. 2010;3(1):23-34.
33. Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, GN J. Mitochondrial Metabolism, Redox Signaling and Fusion... a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 oxygen-sensing pathway at the. 2007.
34. Gould J. Superpowered skin. *Nature*. 2018;563(7732):S84-S.
35. Nascimento-Júnior BJD. *Anatomia humana sistemática básica*. UNIVASF; 2020.
36. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 12a. 2013.
37. Woehl VM, Woehl OM. *Histologia: CED/LANTEC*; 2010.
38. Centro especializado em oncologia: Oswaldo cruz 2022 [06 jan. 2022]. Available from: <https://centrodeoncologia.org.br/noticias-cancer/excesso-de-exposicao-radiacao-solar-e-o-principal-causador-da-doenca/>.
39. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *European journal of cancer*. 2005;41(14):2040-59.
40. Chen T, Fallah M, Kharazmi E, Ji J, Sundquist K, Hemminki K. Effect of a detailed family history of melanoma on risk for other tumors: a cohort study based on the nationwide Swedish Family-Cancer Database. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014;134(4):930-6.

41. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(17):1341-8.
42. Rai R, Shanmuga SC, Srinivas C. Update on photoprotection. *Indian journal of dermatology*. 2012;57(5):335-42.
43. Gabros S, Nessel T, Zito P. *Sunscreens And Photoprotection*. [Updated 2020 Sep 29]. StatPearls Treasure Island : StatPearls Publishing. 2021.
44. Cockell CS, Knowland J. Ultraviolet radiation screening compounds. *Biological Reviews*. 1999;74(3):311-45.
45. Nichols JA, Katiyar SK. Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Archives of dermatological research*. 2010;302(2):71-83.
46. Leite KN. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá. 2008.
47. Kostyuk V, Potapovich A, Albuhaydar AR, Mayer W, De Luca C, Korkina L. Natural substances for prevention of skin photoaging: screening systems in the development of sunscreen and rejuvenation cosmetics. *Rejuvenation Research*. 2018;21(2):91-101.
48. Yang J, Yan Y, Liu H, Wang J, Hu J. Protective effects of acteoside against X-ray-induced damage in human skin fibroblasts. *Molecular Medicine Reports*. 2015;12(2):2301-6.
49. Song X, He J, Xu H, Hu X-P, Wu X-L, Wu H-Q, et al. The antiviral effects of acteoside and the underlying IFN- γ -inducing action. *Food function*. 2016;7(7):3017-30.
50. Shiao YJ, Su MH, Lin HC, Wu CR. Acteoside and isoacteoside protect amyloid β peptide induced cytotoxicity, cognitive deficit and neurochemical disturbances in vitro and in vivo. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(4):895.
51. Li X, Xie Y, Li K, Wu A, Xie H, Guo Q, et al. Antioxidation and cytoprotection of acteoside and its derivatives: comparison and mechanistic chemistry. *Molecules*. 2018;23(2):498.
52. Qiao Z, Tang J, Wu W, Tang J, Liu M. Acteoside inhibits inflammatory response via JAK/STAT signaling pathway in osteoarthritic rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2019;19(1):264.
53. Li W, Deng R, Jing X, Chen J, Yang D, Shen J. Acteoside ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibiting peroxynitrite-mediated mitophagy activation. *Free Radical Biology Medicine*. 2020;146:79-91.
54. Rufino M, Alves RE, de Brito ES, de Moraes SM, Sampaio CdG, Pérez-Jimenez J, et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico*. 2007.
55. Seneviratne KN, Hapuarachchi CD, Ekanayake S. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. *Food Chemistry*. 2009;114(4):1444-9.
56. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199-200.
57. Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *J LWT-Food science Technology*. 1995;28(1):25-30.
58. Sousa CMdM, Silva HR, Ayres MCC, Costa CLSd, Araújo DS, Cavalcante LCD, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*. 2007;30:351-5.
59. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.

60. Zulueta A, Esteve MJ, Frígola A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food chemistry*. 2009;114(1):310-6.
61. ANVISA. Resolução RDC n. 166, de 24 de Julho de 2017. *Diário Oficial União*; 2017.
62. Chierrito D, Villas-Boas CB, Tonin FS, Fernandez-Llimos F, Sanches AC, de Mello JC. Using cell cultures for the investigation of treatments for attention deficit hyperactivity disorder: a systematic review. *Current neuropharmacology*. 2019;17(10):916-25.
63. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72(1):248-54.
64. Mikula-Pietrasik J, Kuczmarska A, Rubis B, Filas V, Murias M, Zieliński P, et al. Resveratrol delays replicative senescence of human mesothelial cells via mobilization of antioxidative and DNA repair mechanisms. *Free Radical Biology Medicine*. 2012;52(11-12):2234-45.
65. Rufino M, ALVES RE, De Brito E, De Morais S, Sampaio CdG, PÉREZ-JIMÉNEZ J, et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico*. 2006.
66. Orhan IE, Deniz FS. Natural Products and Extracts as Xantine Oxidase Inhibitors-A Hope for Gout Disease? *Current Pharmaceutical Design*. 2021;27(2):143-58.
67. AOAC (Official Methods of Analysis). *Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals*. 2019.
68. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology letters*. 1985;24(2-3):119-24.
69. Silva BTA, Peloi KE, Ximenes VF, Nakamura CV, Lautenschlager SdOS. 2-acetylphenothiazine protects L929 fibroblasts against UVB-induced oxidative damage. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*. 2021;216:112130.
70. Oliveira MM, Daré RG, Barizão ÉO, Visentainer JV, Romagnolo MB, Nakamura CV, et al. Photodamage attenuating potential of *Nectandra hihua* against UVB-induced oxidative stress in L929 fibroblasts. *Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology*. 2018;181:127-33.
71. Trautinger F. Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing. *Clinical experimental dermatology*. 2001;26(7):573-7.
72. Wang H-Q, Sun X-B, Xu Y-X, Zhao H, Zhu Q-Y, Zhu C-Q. Astaxanthin upregulates heme oxygenase-1 expression through ERK1/2 pathway and its protective effect against beta-amyloid-induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells. *Brain research*. 2010;1360:159-67.
73. Pattison DI, Davies MJ. Actions of ultraviolet light on cellular structures. *J Cancer: cell structures, carcinogens genomic instability*. 2006:131-57.
74. Vasconcelos CM. Avaliação da migração celular, atividade antiinflamatória e antimicrobiana da *Hyptis pectinata* L. Poit.: estudos in vitro e in vivo com vistas ao tratamento de feridas. 2018.

Apêndice A

1 Análise dos padrões em UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

1.1 Metodologia de UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Cada amostra foi injetada no volume de 5 μ L e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Nexera X2, Japão) acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Impact II, Bruker Daltonics Corporation, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex® Onix Monolithic C18, a um fluxo de 0,5 mL/min. Para a fase móvel, utilizaram-se fase A (acetonitrila com ácido fórmico a 0,1%) e fase B (água com ácido fórmico a 0,1%), empregando-se o seguinte sistema gradiente de eluição: 0–10 min, 20-40% da fase A e de 10-20 min 40-30% da fase A, na temperatura de 25 °C, sendo os 5 min finais destinados à reconstituição da coluna para a próxima análise. O instrumento foi calibrado usando uma solução de formato de sódio (10 mmol/L; isopropanol: água; 1:1; v/v) contendo 50 μ L de ácido fórmico concentrado. A fonte de ionização foi operada no modo de ionização positivo e negativo, e ajustada para 4500 V, com uma extremidade potencial da placa de -500 V. Os parâmetros de gás de secagem foram ajustados para 8 L/min a 200 °C, com uma pressão do gás de nebulização de 4 bar. Os dados foram obtidos na faixa de m/z 50 a 1500 com uma taxa de aquisição de 5 Hz. Os 5 íons mais intensos foram selecionados para fragmentação automática (AutoMS/MS). Os dados foram adquiridos pelo software Hystar Application versão 3.2 e Otof Control (Bruker Daltonics Corporation, Alemanha).

1.2 Resultados e Discussão de UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

Foi necessário a realização da análise de massas das amostras utilizadas como padrão neste trabalho, pois foram substâncias isoladas de uma espécie vegetal. Então, conseguiu-se observar que os fragmentos presentes nos padrões correspondem às quebras geradas dessas substâncias, sendo acteosídeo e do β -OH-acteosídeo (1) (Tabela A1).

Com os resultados obtidos do espectro de massas no modo negativo foi possível observar uma substância com massa molecular de 639 com quebras características em 621, 477, 459, 161 e 151 conforme apresentado, caracterizado e nomeado como β -OH-acteosídeo, por Leite (1) (Figura A1).

A outra substância observada nessa amostra foi o (Iso)acteosídeo com massa molecular de 623, ou seja, com uma hidroxila a menos do que o β -hidróxi-acteosídeo, com fragmentos de

massas característicos em 461 e 161, como apresentado por Leite (1) além de trabalhos como os de Zhang (2, 3). Com a confirmação das substâncias presentes nessa amostra previamente caracterizada foi utilizada como padrão para a validação realizada posteriormente (Figura A2).

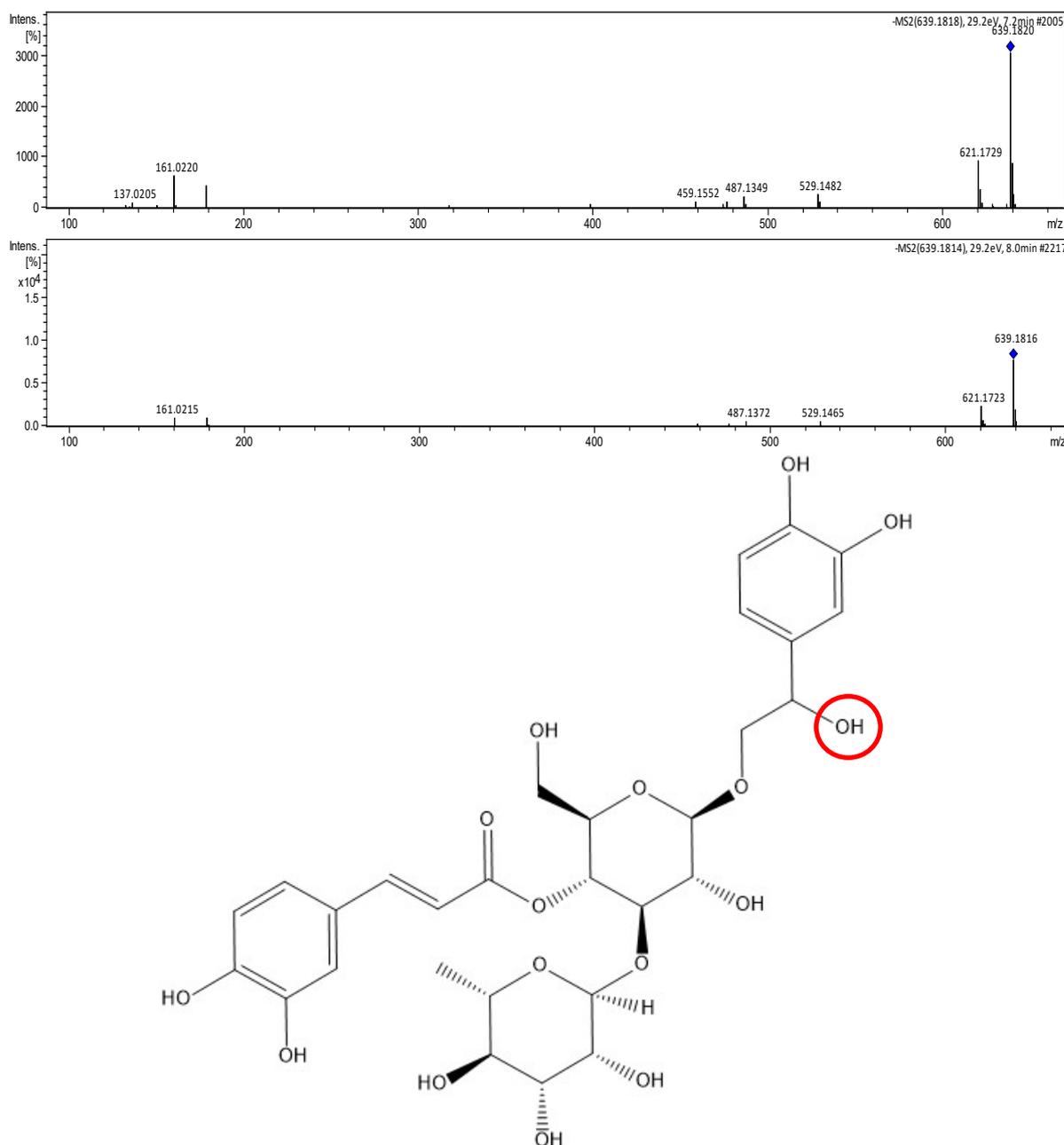


Figura A1 - Espectros de massas de ionização por *electrospray* modo negativo, confirmando a presença de β -OH-acteosídeo na amostra.

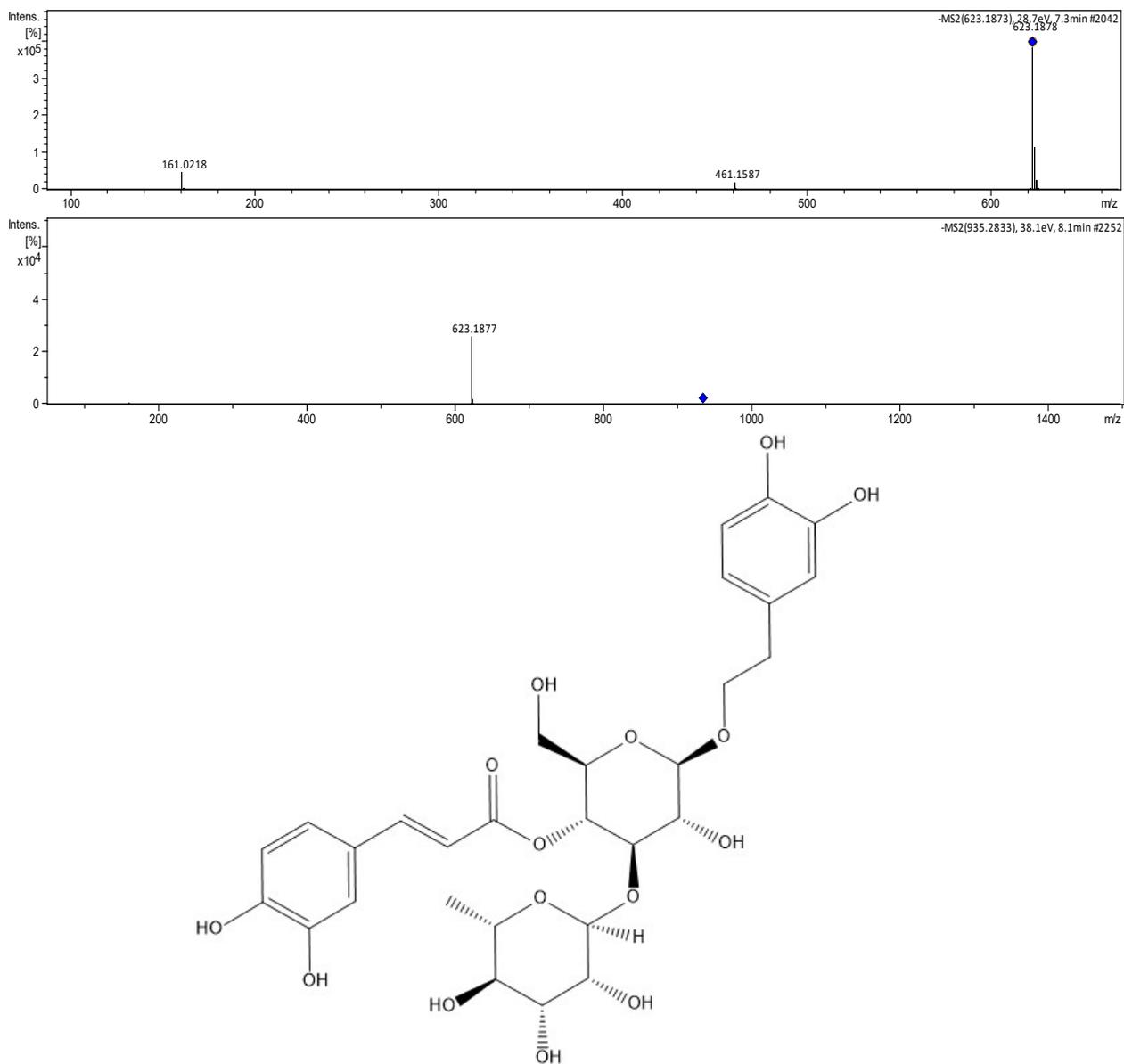


Figura A2- Espectros de massas de ionização por eletrospray modo negativo, confirmando a presença de (Iso)acteosídeo na amostra.

Tabela A2 - Análise do padrão em UHPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS.

Composto	Composto Sugerido	R _t (min)	Fórmula Molecular	[M+H] ⁻ (m/z)	Aduto	MS/MS (m/z)	Erro (ppm)	Literatura
1	β-OH-acteosídeo	7.2	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₆ ⁻	639,1818	[M-H] ⁻	621,1729 477,1537 459,1552 161,0220 151,0350	0,7	LEITE, 2008 ZHANG, 2015.
		8.0	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₆ ⁻	639,1816	[M-H] ⁻	621,1723 477,1352 459,1443 179,0324 161,0215	0,4	
2	(Iso)acteosídeo	7,3	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623,1873	[M-H] ⁻	461,1587 161,0218	1,5	
		8.1	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	1247,379	[2M-H] ⁻	623,1877	-1,3	
				623,1877	[M-H] ⁻	461,1586 161,0219	2,1	
18,3	C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅ ⁻	623,1876	[M-H] ⁻	461,1589 161,0218	1,9			

REFERÊNCIAS

1. Leite KN. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual de Maringá. 2008.
2. Zhang W, Huo SX, Wen YL, Xing H, Zhang Q, Li N, Zhao D, Sun XL, XU J, Yan M, Chen XJ. Pharmacokinetics of acteoside following single dose intragastric and intravenous administrations in dogs. Chinese Journal of Natural Medicines. Ago 2015;13(8):634-40.
3. Zhang J, Li C, Che Y, Wu J, Wang Z, Cai W, Li Y, Ma Z, Tu P. LTQ-Orbitrap-based strategy for traditional Chinese medicine targeted class discovery, identification and herbomics research: a case study on phenylethanoid glycosides in three different species of Herba Cistanches. RSC Advances. 2015;5(98):80816-28.