

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

Fabiana Oliveira dos Santos Camatari

**DETERMINAÇÃO DE CURCUMINOIDES E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E
NITROGÊNIO DE EXTRATOS DE *CURCUMA LONGA* E CONSTITUINTES
ISOLADOS**

MACEIÓ

2017

FABIANA OLIVEIRA DOS SANTOS CAMATARI

**DETERMINAÇÃO DE CURCUMINOIDES E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DE
EXTRATOS DE *CURCUMA LONGA* E CONSTITUINTES ISOLADOS**

**Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Química
e Biotecnologia, como requisito parcial
para obtenção do grau de Doutor(a) em
Química e Biotecnologia**

Orientador(a): Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart

Co-orientador(a): Dra. Júnia Helena Porto Barbosa

MACEIÓ

2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

- C173d Camatari, Fabiana Oliveira dos Santos.
Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de Oxigênio e Nitrogênio de extratos de Curcuma longa e constituintes isolados / Adilson Rodrigues Sabino. – 2017.
147 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.
Coorientadora: Júnia Helena Porto Barbosa.
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação Em Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.
- Bibliografia: f. 130-144.
Anexos: f. 145-147.
1. Curcuma longa. 2. Curcuminóides. 3. Capacidade antioxidante.
4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Espécies reativas de nitrogênio. I. Título.

CDU: 543.066:633.826



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Fabiana Oliveira dos Santos Camatari** intitulada: **“DETERMINAÇÃO DE CURCUMINOIDES E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE CONTRA ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DE EXTRATOS DE *Curcuma longa* E CONSTITUENTES ISOLADOS”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 10 de abril de 2017, às 09h, na Sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA

Marília Oliveira Fonseca Goulart
Prof. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Júnia Helena Porto Barbosa
Prof. Dra. Júnia Helena Porto Barbosa
Coorientadora (Pós-Doc IQB/UFAL)

Francis Soares Gomes
Prof. Dr. Francis Soares Gomes
(PPGQB/IQB/UFAL)

Janaína Heberle Bortoluzzi
Prof. Dra. Janaína Heberle Bortoluzzi
(PPGBQ/IQB/UFAL)

Aldemir Feitosa dos Santos
Prof. Dra. Aldemir Feitosa dos Santos
(UNEAL)

Alane Cabral de Oliveira
Prof. Dra. Alane Cabral de Oliveira
(FANUT/UFAL)

Fabiana Andrea Moura
Prof. Dra. Fabiana Andrea Moura
(FANUT/UFAL)

À Deus, o grande cientista.
Ao Anderson, pelo seu amor, paciência e dedicação.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e pelo cuidado constante em todas as etapas ultrapassadas da vida.

Ao Ms. Anderson, o melhor esposo, serei sempre grata pela sua paciência e impressionante compreensão, suportou distância e tantos momentos difíceis, foi rocha quando eu mais precisei, você é um exemplo de homem e profissional.

Aos meus pais que sacrificaram tantas coisas e dedicaram-me tanto para que eu chegasse até aqui, obrigada por tanto amor.

À minha família, por acreditar no meu potencial sempre, e pela paciência e compreensão em abdicar da minha presença em tantos momentos que não pude estar presente por motivos profissionais, em especial ao meu irmão Fabiano, que chegou até a me acompanhar em finais de semana na UFAL.

À Profa. Dra. Marília Goulart, pela orientação e oportunidade de trabalho, foi uma honra trabalhar com alguém tão importante para a ciência e que me ensinou tanto nesses 4 anos.

À Dra. Júnia Porto, obrigada pela coorientação e amizade, pelos conselhos e consolo, você é um exemplo lindo e único de cientista.

Aos companheiros de laboratório LEQUI e os vizinhos, que fizeram dos dias mais alegres e me ajudaram em todas as etapas, destes se destacam a Ms. Maryana, Jessika Lane, Profa. Dra. Fabiana Moura, Amylly, e em especial a Ms. Jadriane, não tenho palavras para agradecer toda sua ajuda, você é uma pessoa iluminada.

Aos professores do IQB, que sempre estiveram disponíveis para ajudar no que fosse preciso, em especial ao Prof. Dr. Josué Carinhanha e ao Prof. Dr. Euzébio Goulart.

Aos funcionários e técnicos por toda ajuda, em especial ao secretário Anderson, sempre competente, ao Aldir sempre prestativo e ao Cássio, por me socorrer sempre com o CLAE.

A Profa. Dra. Eduarda Fernandes e seu grupo de pesquisa na Universidade do Porto, em especial Dra. Daniela, Dra. Marisa e Ms. Carina, que me acolheram com muito apreço e responsabilidade, serei sempre grata pela oportunidade de trabalhar com o grupo, foi uma experiência rica e singular.

A FANUT-UFAL, em especial à Profa. Dra. Terezinha Ataíde pela orientação no estágio, Profa Dra Maria Cristina Delgado e seu grupo de pesquisa da FANUT-UFAL por ter me recebido no laboratório com tanta afeição e aos responsáveis pelo biotério principalmente a Elenita.

À CAPES e a FAPEAL pela bolsa de estudo concedida.

“Não entre em pânico!”

Douglas Adams

RESUMO

Em sistemas biológicos, diversos fatores metabólicos e ambientais são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Quando a produção é exacerbada ou quando há uma diminuição significativa na eficácia das defesas contra essas espécies, ocorre o desequilíbrio redox, causando danos a macromoléculas biológicas, o que está associado ao surgimento e progressão de várias doenças. Dentre os antioxidantes exógenos, os compostos fenólicos de plantas têm se destacado pela capacidade de sequestrar diversas espécies reativas. Das plantas mais estudadas, a *Curcuma longa* apresenta inúmeras propriedades benéficas para a saúde, que são principalmente associadas aos compostos fenólicos presentes no rizoma, conhecidos como curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina), porém os benefícios são mais particularmente atribuídos à curcumina. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a capacidade antioxidante de extratos de *C. longa* e determinar seus curcuminoides constituintes, investigando a ação antioxidante do extrato e de curcuminoides isolados contra as EROs e ERNs. A identificação e quantificação de curcuminoides, o conteúdo total de fenóis e a capacidade antioxidante, em termos de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]) e pelo método de FRAP (do inglês, *ferric reducing antioxidant power*), foram realizados para os extratos metanólico (CM), metanólico desengordurado (CHM), etanólico (CE), hexânico (CH) e para o extrato comercial (ExtFarC) de *C. longa*. A capacidade de eliminação das EROs e ERNs foi realizada para o CE e para os curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina). Os extratos CM, CHM e CE apresentaram, em suas composições, os três curcuminoides, enquanto o ExtFarC apresentou a curcumina como componente majoritário. O extrato etanólico (CE) e o ExtFarC apresentaram maior conteúdo total de fenóis e atividade antioxidante pelo método de FRAP e menores valores de IC₅₀ frente ao radical DPPH[•]. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detecção espectrofotométrica (DPPH[•]-CLAE-UV) indicou que a curcumina e a desmetoxicurcumina apresentaram maior potencial de captura de DPPH[•], observado pela redução de seus picos em CLAE, em tempos de contato equivalentes. Nos experimentos de capacidade de eliminação das EROs e ERNs, os curcuminoides apresentaram atividade semelhante ao controle positivo (quercetina) frente ao ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (•NO) e peroxinitrito (ONOO⁻), mostrando-se eficientes de forma direta contra essas espécies. O extrato CE, apesar de exibir maiores valores de IC₅₀ para essas espécies, quando comparado aos compostos isolados, apresentou valores de IC₅₀ inferiores, em comparação com extratos de outras plantas estudados pelos mesmos métodos. Apesar de a curcumina ser o alvo de estudos com finalidade terapêutica para inúmeras doenças, os dados evidenciam que os três curcuminoides têm papel potencial contra as EROs e ERNs, desta forma são promissores na prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chaves: *Curcuma longa*. Curcuminoides. Capacidade antioxidante. Espécies reativas de oxigênio. Espécies reativas de nitrogênio.

ABSTRACT

In biological systems, several metabolic and environmental factors are responsible for the production of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species. The exacerbated production of these reactive species or the significant decrease in the effectiveness of the defenses against them causes the redox imbalance, with consequent damage to biological macromolecules, which is associated to the emergence and progression of several diseases. Among the exogenous antioxidants, phenolic compounds of plants have been highlighted by their ability to scavenge various reactive species. Among the most studied plants, *Curcuma longa* has many beneficial properties for health, which are mainly associated with the phenolic compounds present in the rhizome, known as curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin), but the benefits are more particularly attributed to curcumin. Thus, the objective of this study was to investigate the antioxidant capacity of *C. longa* extracts and to determine their contents in curcuminoids, investigating the antioxidant action of the extract and of each isolated curcuminoid against ROS and RNS. The identification and quantification of curcuminoids, the total phenols content analysis and the antioxidant capacity in terms of scavenging of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH[•]) and the FRAP method (ferric reducing antioxidant power) were carried out for methanol (CM), defatted methanol (CHM), ethanol (EC) and hexane (CH) extracts, besides commercial extract (ExtFarC) of *C. longa*. The elimination capacity of ROS and RNS was performed for CE and isolated curcuminoids (curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin). The CM, CHM and CE had shown the three curcuminoids in their compositions, while, for the ExtFarC, curcumin was the predominant compound. The CE and ExtFarC had shown the higher total phenols content and antioxidant activity by the FRAP method, besides the lower IC₅₀ values for to the DPPH[•] radical. The use of high performance liquid chromatography (HPLC) with spectrophotometric detection (DPPH[•]-HPLC-UV) indicated that curcumin and demethoxycurcumin had the greater potential for capture of DPPH[•], as observed by the reduction of their peaks in HPLC, at equivalent contact time. In the experiments related to hypochlorous acid (HOCl), nitric oxide (•NO) and peroxynitrite (ONOO⁻), the curcuminoids had shown a direct efficiency toward their elimination, similarly to the positive control (quercetin). For CE, despite showing higher IC₅₀ values against these species, in comparison to the isolated compounds, it presented lower IC₅₀ values, when compared to other plants' extracts, studied by the same methods. Although curcumin is the target of many therapeutic studies for a number of diseases, the present data show that the three curcuminoids can play essential roles against ROS and RNS, and thus, may be considered promising in the prevention and treatment of diseases related to oxidative stress.

Keywords: *Curcuma longa*. Curcuminoids. Antioxidant capacity. Reactive oxygen species. Reactive nitrogen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Uma visão integrada e simplificada dos estresses oxidativo, nitrosativo e carbonílico: agentes, causas e consequências.....	22
Figura 2 - Principais EROs e ERNs, oriundas da conversão biológica do oxigênio em radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico ($\bullet NO$) (2a); vias de formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (2b); formação do óxido nítrico ($\bullet NO$) a partir de arginina com ação da NOS (óxido nítrico sintase) (2c).....	24
Figura 3 - Representação esquemática da produção de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e HOCl durante a fagocitose de um agente microbiano, onde as NOXs são ativadas na membrana celular.	25
Figura 4 - Produção de $O_2^{\bullet-}$ na cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria.....	26
Figura 5 - Formação de radicais livres na reação de HOCl com o grupo -amino de um aminoácido.	29
Figura 6 - Adição eletrofílica de HOCl a ligações insaturadas de ácidos graxos insaturados e colesterol.....	30
Figura 7 - Diagramas energéticos de orbitais moleculares para o oxigênio molecular (O_2), oxigênio singlete (1O_2) e radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	31
Figura 8 - Mecanismo de peroxidação do ácido linoleico iniciado pelo radical $HO\bullet$	33
Figura 9 - Exemplos de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.	38
Figura 10 - Estabilização de ressonância de radicais antioxidantes fenólicos.	42
Figura 11 - Possibilidades reacionais do DPPH \bullet com composto fenólico (eugenol): reação 1, reatividade de cadeias laterais alquílicas (posição benzílica); reação 2, dimerização com regeneração de fenóis; reação 3, formação de ligação covalente N-C, entre os dois radicais.	44
Figura 12 - Mecanismo de regeneração de um <i>orto</i> -difenoil.	45
Figura 13 - Mecanismo antioxidante do ácido ascórbico com o DPPH \bullet	45
Figura 14 - Mecanismo da atividade de eliminação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela quercetina.....	46
Figura 15 - Atividade quelante de íons metálicos (Cu^{2+}) de antocianina.....	46
Figura 16 - Representação esquemática de abordagens competitivas (a) e não competitivas (b) para a determinação <i>in vitro</i> da capacidade antioxidante.	49
Figura 17 - Reações com DPPH \bullet	50
Figura 18 - Redução do complexo $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ a $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$	51

Figura 19 - Esquema da redução do cloreto de tetrazólio-nitrozul (NBT) a diformazan induzido por $O_2^{\bullet-}$	54
Figura 20 - Reação quimiluminescente para a lucigenina na presença de H_2O_2	55
Figura 21 - Esquema da oxidação da di-hidrorodamina 123 (DHR) à rodamina 123.....	56
Figura 22 - Esquema da decomposição térmica do endoperóxido NDPO ₂ , solúvel em água, produzindo o NDP, oxigênio molecular (O_2) e oxigênio singlete (1O_2).....	56
Figura 23 - Esquema da oxidação da 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) e seu produto de reação triazol fluoresceína (DAF-2T).....	57
Figura 24 - Raiz de <i>C. longa</i> (a); pó seco e moído extraído de rizoma de <i>C. longa</i> (b); flor de <i>C. longa</i> (c).....	58
Figura 25 - Estruturas químicas de fitoquímicos presentes em maior abundância em <i>C. longa</i>	60
Figura 26 - Grupos funcionais na curcumina (A) -dicetona ou seu tautômero ceto-enol; (B) fenol; (C) ligação dupla conjugada.....	61
Figura 27 - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina (A) e reações de transferência de prótons, com respectivos valores de pKa (B).	62
Figura 28 - Metabolismo da curcumina.....	64
Figura 29 - Número de publicações para atividade antioxidante para a <i>C. longa</i> (a) e para a curcumina (b) pelo <i>Web of Science</i> , no período de 1998 a 2017.....	70
Figura 30 - Número de publicações para atividade antioxidante para a desmetoxicurcumina (a) e para a bisdesmetoxicurcumina (b) pelo <i>Web of Science</i> , no período de 1997 a 2017.....	71
Figura 31 - Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pelo fenol (A) e estabilização do radical formado, por ressonância no anel aromático (B).....	72
Figura 32 - Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar no metileno (A) e estabilização do radical formado (B).	73
Figura 33 - Mecanismo proposto para a eliminação de HOCl pela curcumina.....	74
Figura 34 - Mecanismo de atividade de eliminação de $O_2^{\bullet-}$, do complexo curcumina- Cu^{2+} ..	75
Figura 35 - Esquema ilustrando as etapas de extração e análises realizadas na identificação de compostos e obtenção da capacidade antioxidante.....	79
Figura 36 - Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância, $\lambda = 760$ nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico em $\mu g/mL$	83

Figura 37 - Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância, $\lambda = 760$ nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico em $\mu\text{mol/mL}$.	83
Figura 38 - Curva de calibração com o Trolox em $\mu\text{g/mL}$. Medidas em absorvância, $\lambda = 595$ nm.	86
Figura 39 - Curva de calibração com o Trolox em $\mu\text{mol/mL}$. Medidas em absorvância, $\lambda = 595$ nm.	86
Figura 40 - Espectros de absorção no UV-Vis dos extratos de <i>C. longa</i> e da curcumina.	94
Figura 41 - CLAE-UV dos curcuminoides-padrão: a – bisdesmetoxicurcumina, b – desmetoxicurcumina e c – curcumina, em 425 nm.	95
Figura 42 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CM de <i>C. longa</i> . Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	96
Figura 43 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CHM de <i>C. longa</i> . Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	96
Figura 44 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CH de <i>C. longa</i> . Picos correspondem: 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	96
Figura 45 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CE de <i>C. longa</i> . Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.	97
Figura 46 - Cromatograma CLAE-UV do extrato ExtFarC de <i>C. longa</i> . Pico corresponde: 3, curcumina, em 425 nm.	97
Figura 47 - Cromatogramas DPPH [•] -CLAE-UV dos extratos CM, CHM, CH, CE e ExtFarC de <i>C. longa</i> antes e depois da reação com DPPH [•] , por 30 minutos, a 425 nm. Picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina.	103
Figura 48 - Estruturas da curcumina e de antioxidantes utilizados no ensaio comparativo do DPPH [•] .	106
Figura 49 - Comportamento cinético da curcumina, Trolox, ácido cafeico, quercetina, ácido gálico, BHT e ácido ascórbico frente ao DPPH [•] .	107
Figura 50 - Cromatogramas do DPPH [•] , da curcumina e da curcumina+DPPH [•] , após a reação por 30 min, a 425 nm.	110
Figura 51 - Cromatogramas do DPPH [•] , do Trolox e do Trolox+DPPH [•] após a reação, por 30 min, a 281 nm.	111
Figura 52 - Cromatogramas do DPPH [•] , do ácido cafeico e do ácido cafeico + DPPH [•] , após a reação, por 30 min, a 325 nm.	112

Figura 53 - Cromatogramas do DPPH [•] , da quercetina e da quercetina + DPPH [•] após a reação, por 30 min, a 260 nm.....	113
Figura 54 - Cromatogramas do DPPH [•] , do ácido ascórbico e do ácido ascórbico+DPPH [•] após a reação, por 30 min, em 260 nm.	114
Figura 55 - Cromatogramas do DPPH [•] , do ácido gálico e do ácido gálico+DPPH [•] após a reação, por 30 min, a 281 nm.	115
Figura 56 - Cromatogramas do DPPH [•] , do BHT e do BHT+DPPH [•] após a reação, por 30 min, em 281 nm.....	116
Figura 57 - Atividade sequestradora do extrato CE de <i>C. longa</i> , da curcumina e do controle positivo (quercetina) contra o oxigênio singlete (¹ O ₂).	118
Figura 58 - Atividade sequestradora do extrato CE de <i>C. longa</i> , dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ácido hipocloroso (HOCl).	119
Figura 59 - Atividade sequestradora do extrato CE de <i>C. longa</i> , dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o [•] NO.....	121
Figura 60 - Atividade sequestradora do extrato CE de <i>C. longa</i> , dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ONOO ⁻ , sem NaHCO ₃	122
Figura 61 - Atividade sequestradora do extrato CE de <i>C. longa</i> , dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ONOO ⁻ , com NaHCO ₃	122
Figura 62 - Estrutura da bixina.....	125

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Constantes de reações das EROs e ERNs com reagentes e produtos formados. ...	27
Quadro 2 - Reatividade de HOCl.	30
Quadro 3 - Classes de compostos fenólicos.	41
Quadro 4 - Efeitos da curcumina em situações clínicas, em diversos sistemas do organismo.	66
Quadro 5 - Lista de equipamentos, suas descrições e funções.	77
Quadro 6 - Análise microbiológica da <i>C. longa</i> em pó.	91
Quadro 7 - Conteúdo Total de Fenóis (CTF) e DPPH [•] (ASR%) dos extratos de <i>C. longa</i> (média ± DP).	92
Quadro 8 - Rendimento do processo de extração do pó de <i>C. longa</i>	93
Quadro 9 - Quantificação dos extratos de <i>C. longa</i> por CLAE, com detecção a 425 nm.	98
Quadro 10 - Percentual em curcuminoides, em extratos de <i>C. longa</i> , oriundos de diferentes locais.	99
Quadro 11 - Conteúdo total de fenóis (CTF), FRAP e DPPH [•] (ASR% e IC ₅₀) dos extratos de <i>C. longa</i> (média ± DP).	100
Quadro 12 - Conteúdos totais de fenóis (CTF) e DPPH [•] (IC ₅₀) em extratos de <i>C. longa</i> registrados na literatura.	102
Quadro 13 - Percentual de redução dos picos dos curcuminoides, após a reação com DPPH [•] , por CLAE-UV, nos extratos de <i>C. longa</i>	104
Quadro 14 - IC ₅₀ DPPH [•] da curcumina, Trolox, ácido cafeico, quercetina, ácido gálico, BHT e ácido ascórbico (média ± DP).	105
Quadro 15 - Atividade sequestradora de O ₂ ^{•-} , HOCl, ¹ O ₂ e H ₂ O ₂ (IC ₅₀ , média ± SEM) do CE de <i>C. longa</i> , curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina).	118
Quadro 16 - Atividade sequestradora de [•] NO e ONOO ⁻ (com e sem 25 mM NaHCO ₃) (IC ₅₀ , média ± SEM) do CE de <i>C. longa</i> , curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina).	120
Quadro 17 - Comparação entre resultados obtidos em relação à capacidade sequestradora do presente estudo, com dados registrados, a partir dos mesmos métodos.	124

LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS QUÍMICAS E SIGLAS

3-DG	3-desoxiglicosona
9-HODE	Ácido 9-hidroxi-10,12-octadecadienóico
ABTS ^{•+}	2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico
ADP	Difosfato de adenosina
AGEs	<i>Advanced Glycation Endproducts</i> (Produtos finais de glicação avançada)
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ALEs	<i>Advanced Lipoxidation Endproducts</i> (Produtos finais de lipoxidação avançada)
ALRs	Aldeído redutases
ASR	Atividade sequestradora de radical
ATP	Adenosina trifosfato
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> (Fator neurotrófico derivado do cérebro)
BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
BS	Ágar bismuto sulfito
C	Citocromo c
CAT	Catalase
CDAI	Índice de atividade da doença de Crohn
CE	Extrato de <i>Curcuma</i> etanólico
CH	Extrato de <i>Curcuma</i> hexânico
CH6	Extrato de <i>Curcuma</i> hexânico 6 horas
CHM	Extrato de <i>Curcuma</i> fração metanólica
CHM6	Extrato de <i>Curcuma</i> fração metanólica 6 horas
CHML	Extrato de <i>Curcuma</i> fração metanólica até limpidez
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CM	Extrato de <i>Curcuma</i> metanólico
CM6	Extrato de <i>Curcuma</i> metanólico 6 horas
CML	Extrato de <i>Curcuma</i> metanólico até limpidez
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase-2
CTF	Conteúdo total de fenóis
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazol fluoresceína

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DHR	Di-hidrorodamina 123
DP	Desvio padrão
DPPH [•]	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DPPH-H	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EC	<i>Escherichia coli</i>
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ECRs	Espécies carbonílicas reativas
eNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva endotelial
ERCs	Espécies reativas de carbono
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Equivalentes de trolox
ExtFarC	Extrato farmacêutico de <i>Curcuma longa</i>
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> (Capacidade antioxidante redutora de íon férrico)
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GO	Glioxal
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
MDA	Malonaldeído
MG	Metilglioxal
MMI	Membrana mitocondrial interna
MMP-2	Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de matriz 9
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NBT	Cloreto de tetrazólio-nitrozul
NDP	Ácido 3,3'-(1,4-naftaleno) bispropiónico
NDPO ₂	3,3'-(1,4-naftaleno) bispropionato de sódio
NMP	Número Mais Provável
nNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva neuronal
NOC-5	3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno
NOS	Óxido nítrico sintase
NOXs	NADPH oxidases
¹ O ₂	Oxigênio singlete
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidade de absorção do radical oxigênio)
PG	Galato de propila
PMS	Metassulfato de fenazina
RAGEs	Receptores sensíveis a AGEs
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROO [•]	Radical peroxila
RO [•]	Radical alcoxila
SEM	<i>Standard error of mean</i> (Erro padrão da média)
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TBHQ	<i>Terc</i> -butil-hidroquinona
TEAC	<i>Trolox equivalent antioxidant capacity</i> (Capacidade antioxidante equivalente ao trolox)
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
TrX	Tiorredoxina
Ub	Ubiquinona
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível
VB	Verde brilhante
XLD	Ágar xilose lisina
XO	Xantina oxidase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Espécies reativas e desequilíbrio redox	21
2.1.1	Definição e classificação	21
2.1.2	Natureza das espécies reativas	23
2.1.3	Formação e características das espécies reativas	23
2.2	Defesas antioxidantes	37
2.2.1	Definição e classificação	37
2.2.2	Compostos fenólicos	39
2.2.3	Mecanismos de defesa dos antioxidantes contra radicais não biológicos, EROs e ERNs	42
2.3	Métodos de ensaio de atividade antioxidante	47
2.3.1	Ensaio de capacidade de eliminação contra radicais não biológicos estáveis e avaliação da capacidade total de redução	49
2.3.2	Métodos com espécies reativas biologicamente importantes	53
2.4	<i>Curcuma longa</i>	58
2.4.1	Composição da <i>Curcuma longa</i>	59
2.4.2	A química de curcuminoides	61
2.4.3	Metabolismo dos curcuminoides	63
2.4.4	Atividades biológicas de curcuminoides	66
3	OBJETIVOS	76
3.1	Geral	76
3.2	Específicos	76
4	MATERIAIS E MÉTODOS	77
4.1	Equipamentos	77
4.2	Materiais	77
4.3	Métodos	78

4.3.1	Análise microbiológica do pó de <i>Curcuma longa</i>	79
4.3.2	Preparação dos extratos do pó de <i>Curcuma longa</i>	80
4.3.3	Análise dos espectros de absorção dos extratos de <i>Curcuma longa</i>	81
4.3.4	Identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE-UV dos extratos de <i>Curcuma longa</i>	82
4.3.5	Conteúdo total de fenóis e Capacidade frente a radicais não biológicos dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e de curcuminoides	82
4.3.5.1	Conteúdo Total de Fenóis pelo método de Folin-Ciocalteu.....	82
4.3.5.2	Ensaio de capacidade antioxidante pelo método do DPPH [•]	83
4.3.5.3	Experimento DPPH [•] -CLAE-UV	84
4.3.5.4	Ensaio de capacidade antioxidante pelo método de FRAP	85
4.3.6	Ensaio de capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio.....	86
4.3.6.1	Ensaio de eliminação de radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	87
4.3.6.2	Ensaio de eliminação do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	87
4.3.6.3	Ensaio de eliminação do ácido hipocloroso (HOCl).....	88
4.3.6.4	Ensaio de eliminação do oxigênio singlete (¹ O ₂)	88
4.3.6.5	Ensaio de eliminação do óxido nítrico ([•] NO).....	89
4.3.6.6	Ensaio de eliminação de peroxinitrito (ONOO ⁻)	89
4.3.7	Análise estatística	90
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1	Análise microbiológica do pó da <i>Curcuma longa</i>	91
5.2	Definição do tempo de extração para os extratos de <i>Curcuma longa</i>	92
5.3	Rendimento dos extratos definitivos.....	92
5.4	Identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE-UV dos extratos de <i>Curcuma longa</i>	93
5.5	Conteúdo total de fenóis e capacidade antioxidante frente a radicais não biológicos dos extratos de <i>Curcuma longa</i>, curcuminoides e padrões antioxidantes	100

5.6	Ensaio de capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio	117
5.7	Sumário de resultados.....	126
5.8	Obstáculos	127
5.9	Perspectivas.....	128
6	CONCLUSÃO	129
	REFERÊNCIAS	130
	ANEXOS	145

1 INTRODUÇÃO

Em sistemas biológicos, diversos fatores metabólicos e ambientais são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs). Quando a produção é exacerbada ou quando há uma diminuição significativa na eficácia das defesas contra essas espécies, ocorre o desequilíbrio redox, causando a disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle, com consequentes danos a macromoléculas biológicas, sendo, alguns deles, irreversíveis (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; RIBEIRO et al., 2013; SIES, 2015).

O aumento do nível dessas espécies está associado ao surgimento e progressão de várias doenças. A geração desregulada das EROs causa o estresse oxidativo (PRIOR, 2015), enquanto as ERNs podem agir em conjunto com as EROs, danificando células, causando o chamado estresse nitrosativo (WINK; MITCHELL, 1998), e que adicionados ao estresse carbonílico, causado especialmente por metabólitos α -oxaldeídicos gerados no curso de reações do tipo Maillard (BARBOSA et al., 2016), contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças, como diabetes (AOUACHERI et al., 2015), câncer (AGGARWAL et al., 2013), doenças gastrointestinais (MOURA et al., 2015), cardiometabólicas e neurodegenerativas (HUANG; ZHANG; CHEN, 2016), entre outras.

Os antioxidantes são substâncias, que, em baixas concentrações, previnem ou retardam significativamente a oxidação de substratos por agentes oxidantes (SUBRAMANIAN; SUBBRAMANIYAN; RAJ, 2013). Dessa forma, exercem funções importantes na manutenção do equilíbrio orgânico redox e de mecanismos fisiológicos de defesa em combate aos agentes pró-oxidantes, substâncias endógenas ou exógenas, que possuem a capacidade de oxidar moléculas-alvo (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; GARAGUSO; NARDINI, 2015; WU et al., 2015). Os antioxidantes vegetais naturais podem ser obtidos a partir de folhas, sementes, cascas e flores de plantas (WU et al., 2015), sendo exemplos os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanas, taninos e carotenoides, ou podem ser sintetizados, como o butilado de hidroxitolueno (BHT), o butilado de hidroxianisol (BHA), a *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (PG) (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Há, atualmente, grande interesse na identificação de compostos naturais antioxidantes eficazes e não tóxicos. Dentre as plantas mais estudadas e que tem recebido destaque por sua atividade antioxidante está o açafrão-da-terra (*Curcuma longa*). O açafrão-da-terra é um tubérculo muito utilizado como tempero em preparações para conferir cor e sabor aos

alimentos. A literatura atribui à *C. longa* inúmeras propriedades benéficas para a saúde, como ações antibacteriana (PARK et al., 2005), anticarcinogênica (ABDEL-LATEEF et al., 2016), anti-inflamatória (LANTZ et al., 2005) e antioxidante (DALL'ACQUA et al., 2014), atividades essas que são principalmente associadas aos compostos fenólicos, conhecidos como curcuminoides (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina), presentes no rizoma do tubérculo (COUSINS et al., 2007; LIU; NAIR, 2012; THONGCHAI; LIAWRUANGRATH; LIAWRUANGRATH, 2009).

Em relação à atividade antioxidante, a *C. longa* tem sido descrita como um produto vegetal biologicamente ativo, devido à sua capacidade de sequestrar radical peroxila (ROO^\bullet) (BARCLAY et al., 2000), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHLY et al., 1998), óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) (XU et al., 2015), bem como radicais não biológicos tais como o DPPH^\bullet (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (CAMATARI et al., 2016). Entretanto, apesar de vários estudos sugerirem as propriedades terapêuticas da *C. longa*, particularmente ligada aos curcuminoides presentes nos rizomas, a atividade antioxidante dos três curcuminoides de forma direta frente às EROs e ERNs não está completamente esclarecida.

Diante do papel que compostos antioxidantes podem desempenhar frente ao surgimento e ao tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo/nitrosativo/carbonílico, é de grande importância o desenvolvimento de estudos que indiquem e estabeleçam substâncias com potencial antioxidante relevante, de ocorrência natural e que sejam seguras para a utilização humana. Sendo a *C. longa* fonte de compostos fenólicos com grande potencial terapêutico, e, devido à possível variabilidade química, em vista de fatores ambientais, torna-se relevante a investigação da atividade antioxidante do açafrão oriundo do Centroeste Brasileiro, e de seus extratos, com esclarecimento sobre ação dos curcuminoides contra as EROs e ERNs, espécies envolvidas na etiologia de doenças ligadas ao desequilíbrio redox.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies reativas e desequilíbrio redox

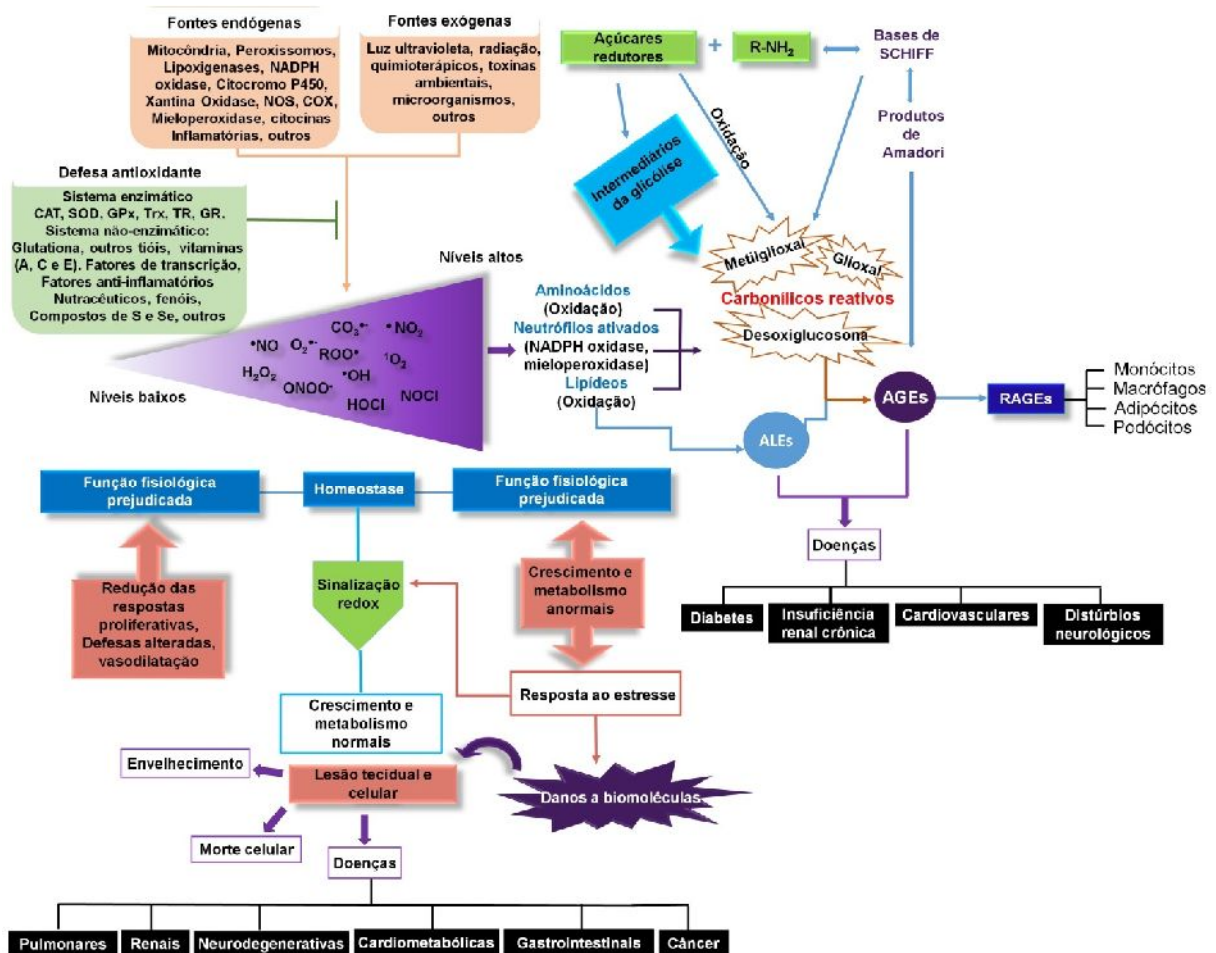
2.1.1 Definição e classificação

As EROs e as ERNs formadas *in vivo* são espécies químicas que apresentam comportamento fisiológico duplo (“*Janus faced*”), sendo benéficas e nocivas, a depender de sua concentração, do local e finalidade de sua geração. Elas são continuamente produzidas no corpo humano, pois desempenham papéis importantes em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos e são essenciais para o fornecimento de energia, desintoxicação, sinalização química e função imunológica (ALI et al., 2008; WANG, 2016). Entretanto, podem também causar danos e morte celular, por meio do chamado estresse oxidativo, um desequilíbrio entre espécies químicas reativas oxidantes e agentes antioxidantes, responsável direta e indiretamente por distúrbios na sinalização redox e nos mecanismos de controle, com consequentes danos a macromoléculas biológicas (SIES, 2015).

A Figura 1 representa um esquema geral, envolvendo a geração, as estruturas das espécies reativas biológicas mais relevantes, seus papéis fisiológicos e as consequências de suas presenças em restrição e excesso no organismo. As espécies reativas podem ser formadas a partir do metabolismo mitocondrial, por meio de reações enzimáticas ou não, ou por meio da ação de citocinas; bem como em decorrência de estímulos e fontes exógenas, sendo formadas, principalmente, EROs, ERNs, espécies reativas de Cl, de carbono (ERCs), mistas e ainda espécies reativas advindas da reação do tipo Maillard, as denominadas espécies carbonílicas reativas (ECRs), as quais também podem ter origem endógena ou exógena. Além da formação endógena, favorecida em condições de maior disponibilidade de substratos, como no diabetes (maiores concentrações de glicose), as ECRs podem ser absorvidas a partir da dieta, dos poluentes ambientais e de produtos farmacêuticos (medicamentos e cosméticos). Para o controle biológico frente a todas essas espécies existem as defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não, e também podem ser obtidas de fontes exógenas ou endógenas. Os níveis dessas espécies devem ser controlados de forma a manter um equilíbrio no organismo (a homeostase), pois níveis baixos prejudicam muitas funções fisiológicas, resultando em problemas nas respostas proliferativas, disfunção no sistema imunológico e defeito na vasodilatação, ocasionando alterações como a doença granulomatosa crônica e algumas doenças auto-imunes (WANG, 2016). Porém, se houver falha nas defesas e/ou

produção exacerbada dessas espécies, danos a biomoléculas podem ocorrer, com consequente lesão local em células, tecidos e sistemas.

Figura 1 - Uma visão integrada e simplificada dos estresses oxidativo, nitrosativo e carbonílico: agentes, causas e consequências.



Fonte: adaptado de Barbosa et al. (2016); Finkel; Holbrook (2000); Kalyanaraman (2013); Wondrak et al. (2002).

Legenda: AGEs = do inglês *Advanced Glycation Endproducts*, ALEs = do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*, CAT = catalase, COX = Ciclooxigenase, GPx = glutaciona peroxidase, GR = glutaciona redutase, NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NOS = óxido nítrico sintase, R-NH₂= grupo amina de aminoácidos, RAGEs = Receptores sensíveis a AGEs, SOD = superóxido dismutase, TrX = tioredoxina.

2.1.2 Natureza das espécies reativas

Dentre as EROs podem ser destacados: o radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (HO^{\bullet}), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2) e o ácido hipocloroso ($HOCl$), além dos radicais peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}). Dentre as ERNs, destacam-se o monóxido de nitrogênio, mais conhecido como óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), entretanto há também muitas outras ERNs advindas de rearranjo ou decomposição dessas, como trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), dióxido de nitrogênio e ânion nitrito ($^{\bullet}NO_2$, NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Além das EROs e ERNs, são relevantes fisiologicamente, ECRs (ex. glioxal, metilglioxal e outras), espécies reativas de carbono (ERCs), enxofre, halogenadas, mistas e outras (Figuras 1 e 2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LUSHCHAK, 2014).

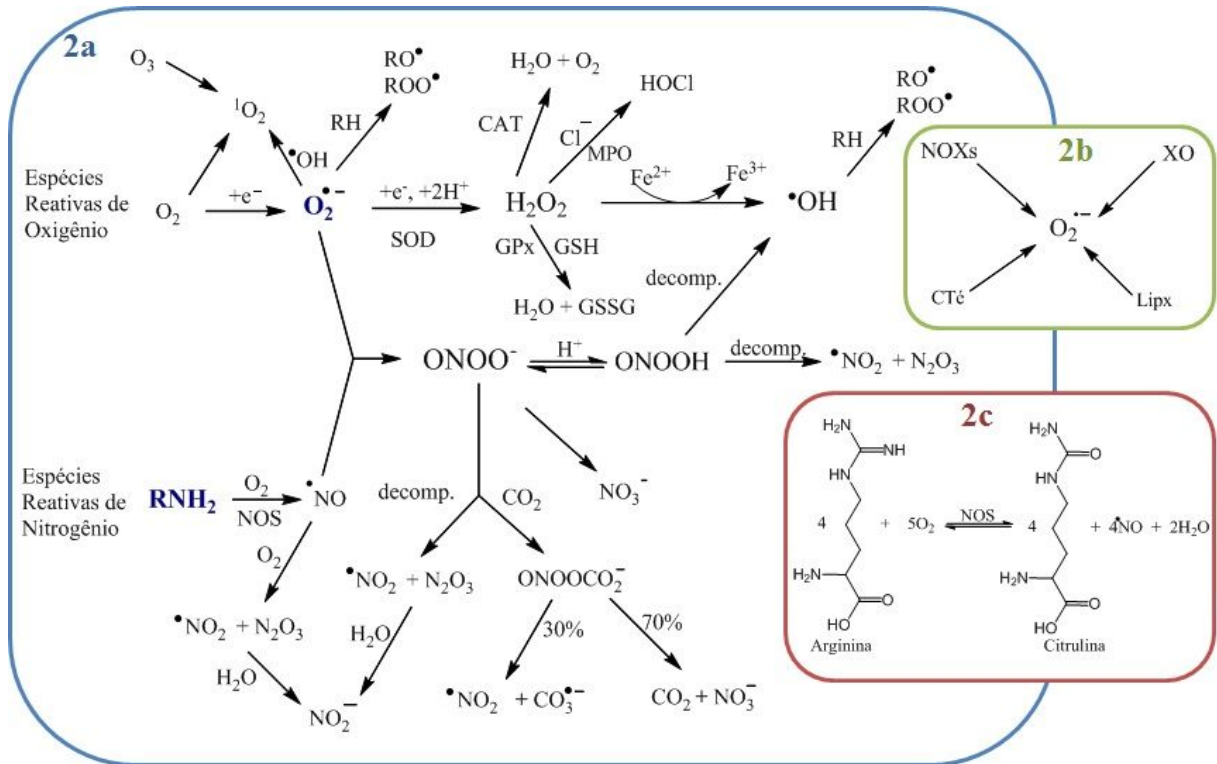
As espécies reativas podem ser radicalares e não radicalares. Dentre as formas radicalares incluem-se: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , RO^{\bullet} , $^{\bullet}NO$ e $^{\bullet}NO_2$, enquanto as não radicalares são H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, $ONOO^-$, N_2O_3 , HNO_2 , NO_2^- e NO_3^- . A forma radicalar é definida como uma espécie atômica ou molecular que contém um ou mais elétrons não emparelhados em um dos seus orbitais moleculares. As formas não radicalares não apresentam elétrons desemparelhados, mas são moléculas que podem ser tão reativas ou mais que os radicais (KRUMOVA; COSA, 2016; THANNICKAL; FANBURG, 2000).

2.1.3 Formação e características das espécies reativas

A Figura 2 esquematiza, em particular, a formação das EROs e das ERNs.

O $O_2^{\bullet-}$ é o precursor da maioria das EROs e é formado a partir do oxigênio. Em organismos aeróbios, o oxigênio molecular (O_2) é um co-fator essencial em muitas oxidações biológicas e no metabolismo de fármacos catalisado por monoxigenases ou oxidases de função mista (citocromo P450). No entanto, durante o processo, moléculas de $O_2^{\bullet-}$ são produzidas, e em condições fisiopatológicas ou durante a disfunção mitocondrial, essa produção torna-se exacerbada (KALYANARAMAN, 2013; TURRENS, 2003).

Figura 2 - Principais EROs e ERNs, oriundas da conversão biológica do oxigênio em radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico ($\bullet NO$) (2a); vias de formação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (2b); formação do óxido nítrico ($\bullet NO$) a partir de arginina com ação da NOS (óxido nítrico sintase) (2c).



Fonte: adaptado de Amatore; Arbault (2007); Freitas; Lima; Fernandes (2009); Peteu; Boukherroub; Szunerits (2014); Wang (2016).

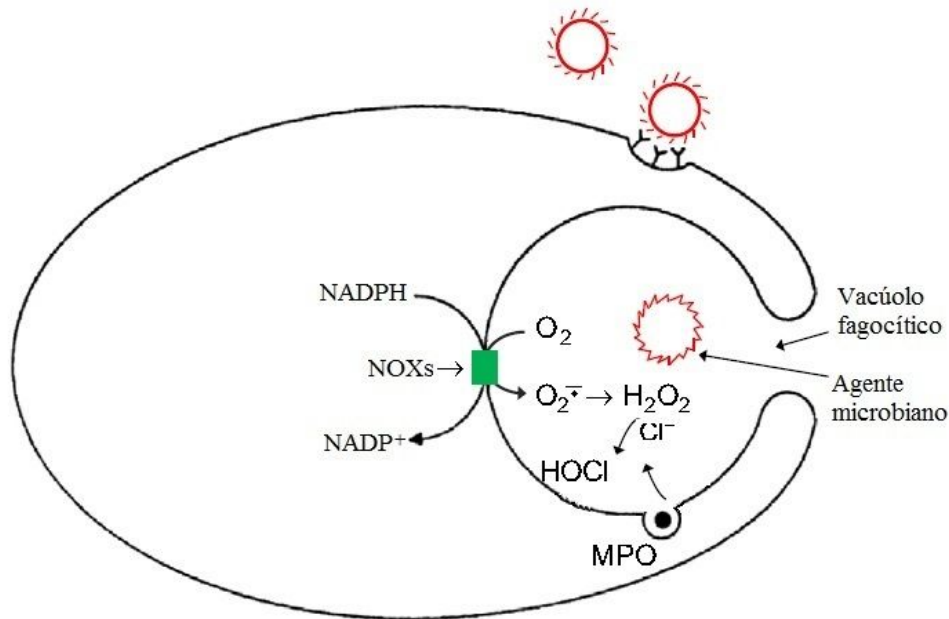
Legenda: CTé = cadeia transportadora de elétrons, CAT = catalase, GPx = glutiona peroxidase, GSH = glutiona reduzida, GSSG = glutiona oxidada, Lipx = Lipoxigenases, MPO = mieloperoxidase, NOS = óxido nítrico sintase, NOXs = NADPH oxidases, R-NH₂ = grupo amina de aminoácidos, RH = grupo carboxila de ácido graxo ou cadeias lipídicas, RO[•] = radical alcóxila, ROO[•] = radical peróxila, SOD = superóxido dismutase, XO = xantina oxidase.

O $O_2^{\bullet-}$ é formado a partir das NADPH oxidases (NOXs), xantina oxidase (XO), lipoxigenases (Lipx) e na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (CTé) (Figura 2) (WANG, 2016). Os processos principais geradores de $O_2^{\bullet-}$ são a partir da ação das NOXs na membrana plasmática durante a fagocitose de agentes microbianos e a partir da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (KALYANARAMAN, 2013).

Durante o processo de defesa realizado pelo sistema imunológico, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos fagocitam o agente microbiano, de modo a degradar e eliminar o xenobiótico, no organismo. Durante a fagocitose, é formado o vacúolo fagocítico, onde os agentes são englobados pelas células de defesa e na membrana plasmática, e $O_2^{\bullet-}$ é

produzido pelas NOXs, a fim de iniciar o processo de degradação dos componentes dos agentes invasores (Figura 3) (KALYANARAMAN, 2013).

Figura 3 - Representação esquemática da produção de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 e $HOCl$ durante a fagocitose de um agente microbiano, onde as NOXs são ativadas na membrana celular.

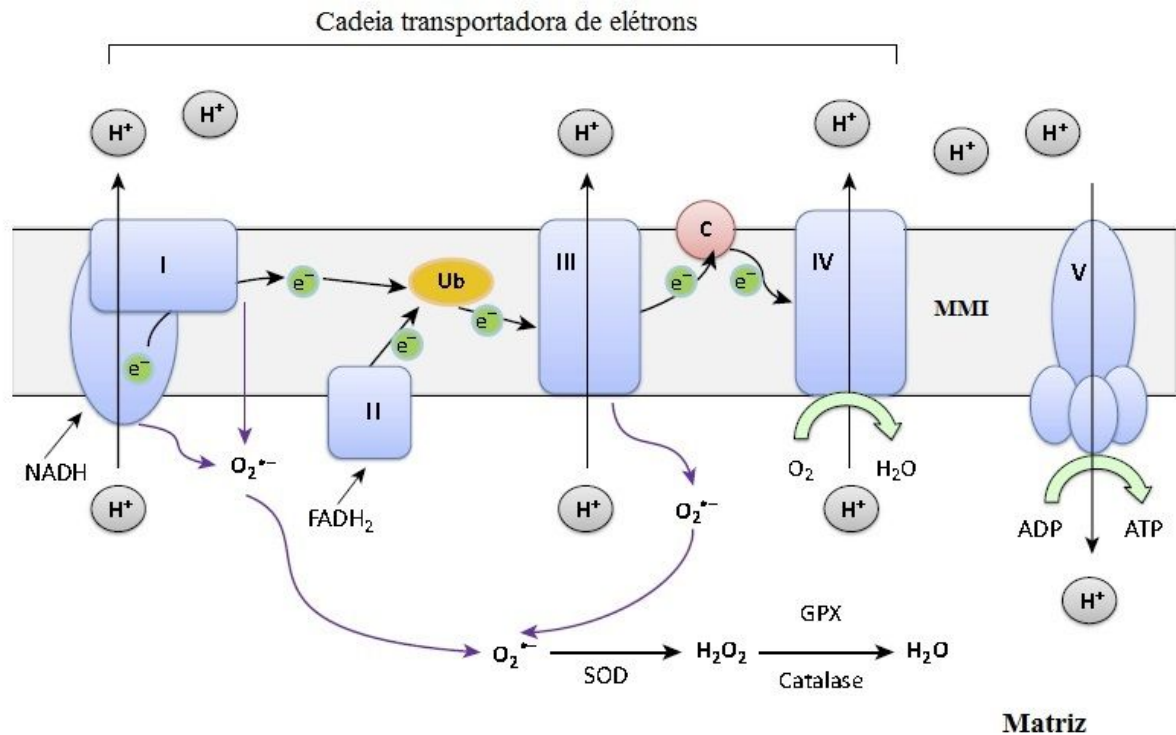


Fonte: Kalyanaraman (2013).

Legenda: MPO = mieloperoxidase, NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NADP⁺ = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado, NOXs = NADPH oxidases.

A cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria é, no entanto, a fonte primária de $O_2^{\bullet-}$ nos sistemas biológicos, espécie que, em seguida, dará origem a outras espécies reativas (LI et al., 2016). A cadeia de transporte de elétrons recebe elétrons de NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido) e $FADH_2$ (dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido) e medeia a transferência de elétrons do complexo I para o complexo IV, via ubiquinona (Ub) e citocromo c (C). À medida que os elétrons são transportados, um gradiente de prótons (H^+) é criado através da membrana mitocondrial interna (MMI) e o complexo V usa este gradiente para converter ADP (adenosina difosfato) em ATP (adenosina trifosfato). Entretanto, como subproduto da cadeia respiratória são geradas as espécies reativas, sendo o $O_2^{\bullet-}$ formado nos complexos I e III (Figura 4) (BARBOSA et al., 2014; NELSON; COX, 2011; YU; BENNETT, 2014).

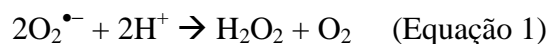
Figura 4 - Produção de $O_2^{\bullet-}$ na cadeia transportadora de elétrons na membrana interna da mitocôndria.



Fonte: adaptado de Yu; Bennet (2014).

Legenda: ADP = adenosina difosfato, ATP = adenosina trifosfato, C = citocromo c, e^- = elétron, $FADH_2$ = dinucleótido de flavina e adenina reduzido, GPx = glutationa peroxidase, H^+ = próton, I = complexo I, II = complexo II, III = complexo III, IV = complexo IV, MMI = membrana mitocondrial interna, NADH = dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido, SOD = superóxido dismutase, Ub = ubiquinona.

O $O_2^{\bullet-}$ é uma espécie considerada causadora de sérios danos a biomoléculas e sofre dismutação espontânea ou é catalisada por sistemas especializados. O organismo dispõe de sistemas enzimáticos localizados em diferentes partes das células (SOD, superóxido dismutase) - membranas plasmáticas das células de defesa ou na MMI - os quais rapidamente convertem $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 (Figuras 3 e 4; Equação 1) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; GOMES et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013; NELSON; COX, 2011; YU; BENNETT, 2014).



A reação de conversão de $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 tem uma constante de velocidade de $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, em pH 7,0. A SOD acelera esta reação 10^4 vezes, com constante de velocidade

$2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo essa enzima, importante antioxidante na dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Quadro 1) (AMATORE; ARBAULT, 2007; THANNICKAL; FANBURG, 2000).

Quadro 1 - Constantes de reações das EROs e ERNs com reagentes e produtos formados.

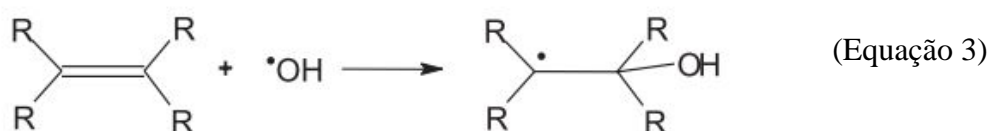
Espécie	Reagente/Enzima	Produto	Constante de velocidade	Referência
$\text{O}_2^{\bullet-}$	H^+	H_2O_2	$2,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Kalyanaraman (2013)
	SOD	H_2O_2	$2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Amatore; Arbault (2007)
	$\bullet\text{NO}$	ONOO^-	$1,9 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Amatore; Arbault (2007)
H_2O_2	GPx	H_2O	$2,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Ng et al. (2007)
	CAT	$\text{H}_2\text{O}, \text{O}_2$	$6,6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Jones; Suggett (1968)
	Fe^{2+}	HO^\bullet	$10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Kalyanaraman (2013)
	MPO, Cl^-	HOCl	$2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Furtmüller et al. (2000)
HO^\bullet	AGPI	ROO^\bullet	$10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Kalyanaraman (2013)
$\bullet\text{NO}$	$\text{O}_2, \text{H}_2\text{O}$	NO_2^-	$2,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Amatore; Arbault (2007)
ONOO^-	CO_2	$\bullet\text{NO}_2, \text{CO}_3^{\bullet-}$	$3\text{-}6,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	Gomes et al. (2007)

Legenda: AGPI = ácido graxo poli-insaturado, CAT = catalase, GPx = glutationa peroxidase, MPO = mieloperoxidase, ROO^\bullet = radical peroxila, SOD = superóxido dismutase.

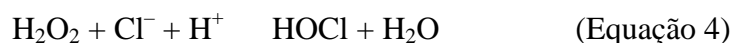
O H_2O_2 gerado pode então ser reduzido à água (H_2O) por ação da catalase (CAT) ou da Glutaciona peroxidase (GPx) (Figuras 2 e 4), sendo a CAT mais rápida e efetiva na conversão e eliminação do H_2O_2 (Quadro 1). Entretanto, devido a eliminação por tais enzimas ter baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). O H_2O_2 é pouco reativo quando comparado a outras espécies reativas frente às moléculas orgânicas, no entanto, é capaz de transpor as membranas celulares e reagir lentamente com tióis, com sais de ferro e cobre reduzidos, com proteínas heme e peroxidases, para iniciar reações radicalares e peroxidações lipídicas; podem sofrer homólise por radiação UV na ligação oxigênio-oxigênio ou interagir com íons de metais de transição, formando HO^\bullet , principalmente com Fe^{2+} pela reação de Fenton, com constante de velocidade de $10^3\text{-}10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, não superando as constantes da CAT e da GPx (Figura 2; Quadro 1; Equação 2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; GOMES et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013; NOGUEIRA et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007).



O HO• é uma das mais importantes e potentes espécies oxidantes, especialmente no processo de eliminação de agentes estranhos pelo processo de fagocitose. Sua capacidade degenerativa é agravada pelo fato do organismo humano não dispor de mecanismo de defesa contra essa ERO. Produz danos severos a moléculas e é capaz de reagir de forma não seletiva e instantânea com os compostos químicos circundantes (GLIGOROVSKI et al., 2015), além de causar modificações, como alteração das bases e quebras das fitas, no DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*), levando a consequências genotóxicas, danos às estruturas proteicas nativas e inativação enzimática, podendo ainda dar início à peroxidação lipídica (GOMES et al., 2007; KALYANARAMAN, 2013; VASCONCELOS et al., 2007). A reatividade do HO• com ácidos graxos poli-insaturados acontece por adição radicalar em duplas ligações, resultando na formação de radicais orgânicos, os ROO•, com constante de velocidade de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Quadro 1), conforme mostrado na Equação 3 (NOGUEIRA et al., 2007).



Para a formação do HOCl, a enzima mieloperoxidase (MPO), encontrada, especificamente, em leucócitos, incluindo neutrófilos, monócitos, basófilos e eosinófilos, catalisa a reação de íons cloreto com H₂O₂ (Figuras 2 e 3; Equação 4) (GOMES et al., 2007). Essa reação também apresenta constante de velocidade de reação que não supera a das enzimas antioxidantes ($2,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), CAT e GPx, mas supera a constante de formação do HO• sendo HOCl prioritariamente formado, em presença de metais (Quadro 1).



O HOCl é o mais importante e poderoso agente bactericida, porém é aproximadamente 100-1000 vezes mais tóxico do que O₂•⁻ e H₂O₂, sendo membrana-permeável e capaz de oxidar um grande número de compostos biológicos como proteínas, DNA e lipídeos, sendo as proteínas os principais alvos dentro de uma célula devido à sua abundância e elevada reatividade com HOCl (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2003). O HOCl reage tanto com o grupo -amino como com alguns grupos funcionais nas cadeias laterais dos aminoácidos,

ele ataca tióis e tioéteres, fenóis, ligações insaturadas e aminas, ou seja, com a maioria dos aminoácidos das proteínas com exceção da glicina, alanina, valina e serina, onde acontece apenas com o grupo -amino (Equação 5). Sua reação com aminas, origina cloraminas, que são lipossolúveis e mais tóxicas do que o próprio HOCl, e podem gerar uma série de radicais (Figura 5) (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013; VASCONCELOS et al., 2007).

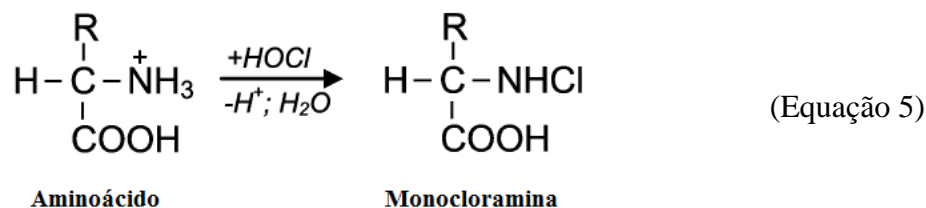
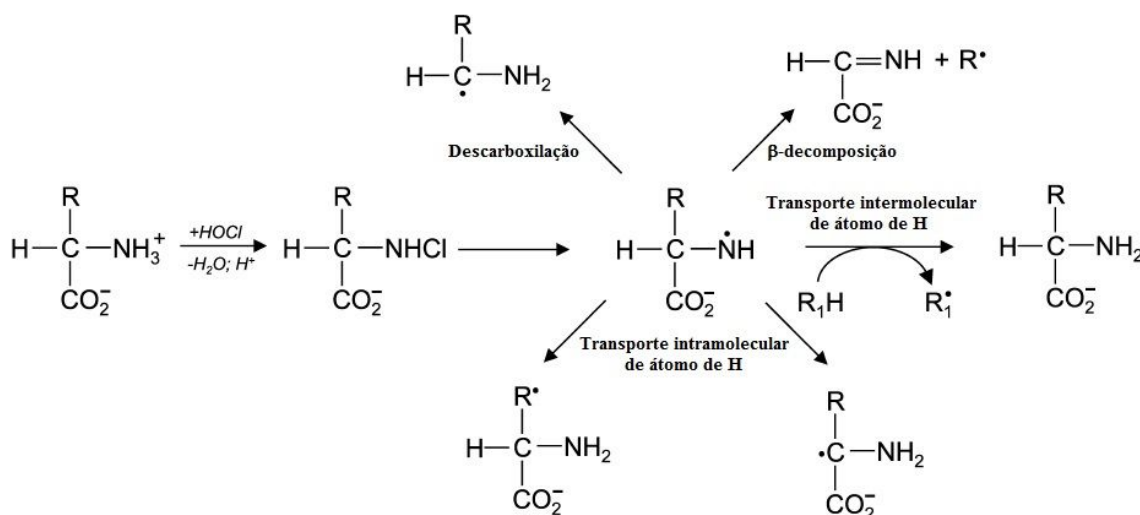


Figura 5 - Formação de radicais livres na reação de HOCl com o grupo -amino de um aminoácido.

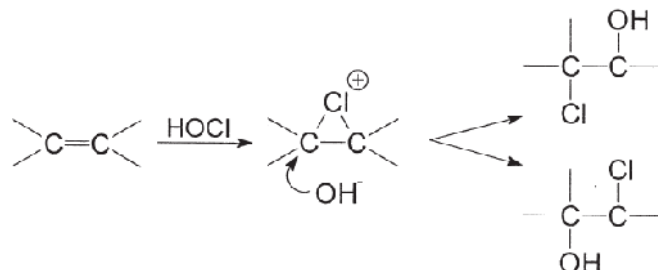


Fonte: adaptado de Panasenکو; Gorudko; Sokolov (2013).

Em relação à oxidação de lipídeos, ela é menos favorecida quando comparada com oxidação de proteínas por HOCl, porém estudo cinético mostrou que a modificação de proteína acontece prioritariamente, mas de forma rápida, enquanto que a peroxidação lipídica acontece por um período prolongado. No ataque aos lipídeos a reação acontece nas ligações insaturadas, dos ácidos graxos insaturados e do colesterol. A adição eletrofílica de HOCl nas ligações insaturadas produz cloridrinas formadas pela adição de HOCl à ligação dupla C=C. O processo ocorre em dois passos, o íon Cl⁺ de HOCl serve como uma espécie eletrofílica, polariza a ligação dupla e é adicionado a um dos átomos de carbono, então o outro átomo de

carbono, positivamente carregado, sofre ataque do OH^- , em segunda etapa (Figura 6) (SPICKETT et al., 2000).

Figura 6 - Adição eletrofilica de HOCl a ligações insaturadas de ácidos graxos insaturados e colesterol.



Fonte: Spickett et al. (2000).

Além do ataque a biomoléculas, o HOCl está envolvido na formação de outras espécies reativas (Quadro 2). A reação com $\text{O}_2^{\bullet-}$ forma o HO^\bullet . Pode estar envolvido em uma das vias de formação do $^1\text{O}_2$ pela reação com H_2O_2 e formação do radical cloro (Cl^\bullet) que pode atacar outras moléculas para se estabilizar. Entretanto, a sua reação com NO_2^- produz a espécie mais estável da família ERN (NO_3^-) (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013).

Quadro 2 - Reatividade de HOCl.

Espécie	Reagente	Espécie formada	Reação
HOCl	$\text{O}_2^{\bullet-}$	HO^\bullet	$\text{HOCl} + \text{O}_2^{\bullet-} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{O}_2 + \text{Cl}^-$
	H_2O_2	$^1\text{O}_2$	$\text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow ^1\text{O}_2 + \text{Cl}^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$
	$\bullet\text{NO}$	Cl^\bullet	$\text{HOCl} + \bullet\text{NO} \rightarrow \text{Cl}^\bullet + \text{HNO}_2$
	NO_2^-	NO_3^-	$\text{HOCl} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{H}^+ + \text{NO}_3^-$

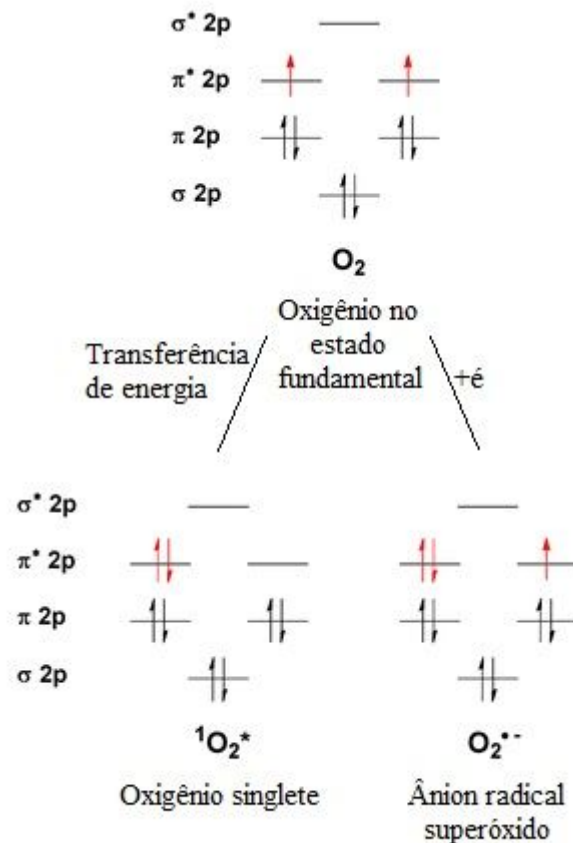
Fonte: Panasenko; Gorudko; Sokolov (2013).

O HOCl é associado a desordens neurodegenerativas causadas pelo estresse clorativo no cérebro; por exemplo, o HOCl clora porções amina e catecol da dopamina e produz derivados clorados, chamados de clorodopamina, esses compostos são tóxicos para os neurônios, pois geram toxinas que matam seletivamente os neurônios dopaminérgicos, associados à doença de Parkinson (JEITNER et al., 2016; KALOGIANNIS; DELIKATNY;

JEITNER, 2016). Além disso, Ismael et al. (2015) indicaram que a oxidação de LDL pelo HOCl leva à progressão da aterosclerose, principalmente pela oxidação do colesterol que resulta na formação de hidroperóxidos de lipídeos, ácido 9-hidroxi-10,12-octadecadienóico (9-HODE) e F2-isoprostanos.

A produção do $^1\text{O}_2$ *in vivo* pode ocorrer pela reação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ com o HO^\bullet , por reações envolvendo o ozônio ou durante a peroxidação lipídica (Figura 2) (GOMES et al., 2007). O $^1\text{O}_2$ é uma forma altamente reativa de O_2 . O O_2 está no estado tripleto, é um birradical com dois elétrons ocupando separadamente orbitais π^* com spins paralelos (Figura 7) (KRUMOVA; COSA, 2016).

Figura 7 - Diagramas energéticos de orbitais moleculares para o oxigênio molecular (O_2), oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$).



Fonte: adaptado de Krumova; Cosa (2016).

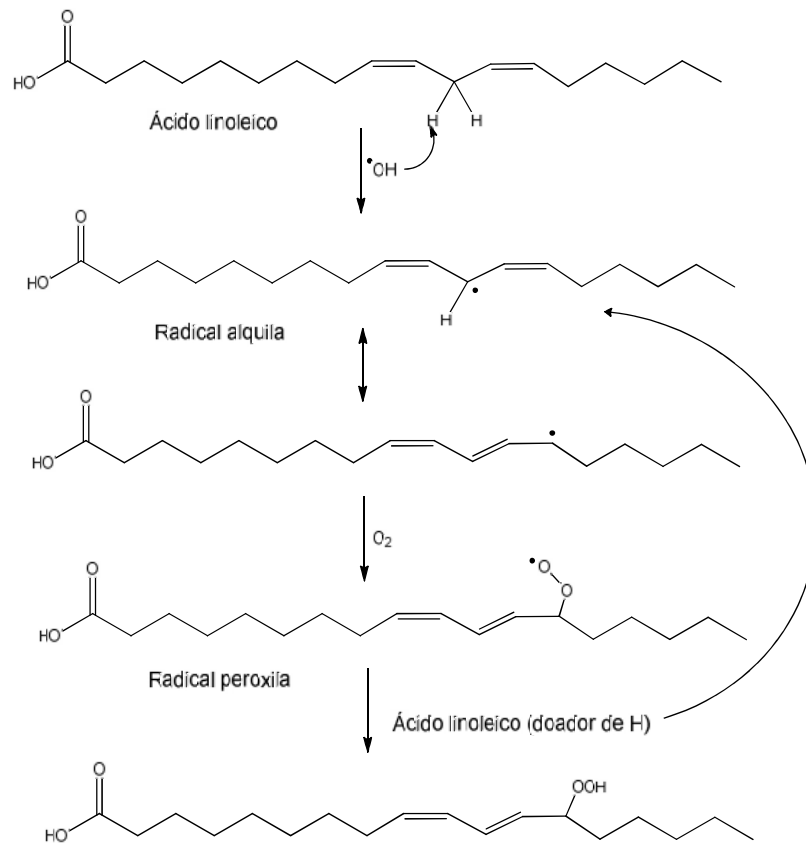
Há restrição de rotação para o O_2 participar em reações redox com outros átomos ou moléculas, uma vez que o compartilhamento, a partir do redutor, de um par de elétrons, um deles com o mesmo spin, em orbitais π^* , é proibido. Assim, o O_2 é incapaz de oxidar

eficazmente biomoléculas via, por exemplo, reações de adição, mas pode reagir rapidamente com outros radicais por transferência de um único elétron ou com outras espécies que contenham elétrons não emparelhados (como metais de transição); a redução monoelétrica do O_2 resulta na formação do $O_2^{\bullet-}$. Alternativamente, o O_2 pode ser convertido em forma mais reativa, o 1O_2 , uma molécula eletronicamente excitada, com pares de elétrons com spins opostos e ambos ocupando o mesmo orbital molecular, deixando um orbital vazio para reação com outras moléculas. Assim, a restrição de rotação é removida, aumentando a capacidade de oxidação em comparação com o O_2 (Figura 7) (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; KALYANARAMAN, 2013; KRUMOVA; COSA, 2016; VASCONCELOS et al., 2007).

Sugere-se que o 1O_2 seja responsável por alguns dos danos infligidos pelos fagócitos nos seus locais-alvo, uma vez que reage com várias moléculas biológicas, incluindo lipídeos de membranas (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; KALYANARAMAN, 2013; VASCONCELOS et al., 2007). O 1O_2 interage com ligações insaturadas de lipídeos 1500 vezes mais rápido do que o O_2 , com formação de hidroperóxidos lipídicos, o que leva ao início da peroxidação lipídica (PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013).

Os radicais ROO^\bullet e RO^\bullet são advindos da peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica refere-se à deterioração oxidativa de lipídeos contendo ligações duplas carbono-carbono, como ácidos graxos insaturados, fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol. EROs podem atacar os ácidos graxos insaturados que contêm múltiplas ligações duplas e grupos metileno, e iniciar reações em cadeia de peroxidação radical (Figura 8) (LÜ et al., 2010); além do ataque por EROs, a presença de lipoxigenases também acarreta a formação de ROO^\bullet e RO^\bullet (BRASH, 1999). A peroxidação lipídica está associada a uma variedade de problemas crônicos de saúde, principalmente aterosclerose (LÜ et al., 2010).

Figura 8 - Mecanismo de peroxidação do ácido linoleico iniciado pelo radical HO•.



Fonte: Lü et al. (2010).

O desequilíbrio redox não está ligado apenas à ação das EROs, mas também a perturbações na biossíntese e no metabolismo das ERNs (KRASUSKA et al., 2016). As ERNs estão interligadas através de uma série de reações, cujo início se dá a partir da geração de •NO.

O •NO é produzido no organismo por diferentes tipos de células, incluindo células endoteliais e macrófagos, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir de *L*-arginina, oxigênio e NADPH, gerando NADP⁺, *L*-citrulina e •NO (Figura 2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; NELSON; COX, 2011; NIJVELDT et al., 2001; OLMOS; GINER; MÁÑEZ, 2007; ZAGO; ZANESCO, 2006). A enzima NOS existe em três isoformas distintas: constitutiva neuronal (nNOS ou NOS1) e constitutiva endotelial (eNOS ou NOS3), que produzem baixos níveis de •NO e a induzida (iNOS ou NOS2), responsável por maiores níveis de •NO produzidos em neutrófilos estimulados. O •NO age em uma variedade de processos biológicos, incluindo relaxamento muscular, neurotransmissão e regulação imune, sendo reconhecido inicialmente como potente vasodilatador, envolvido na regulação da pressão arterial. Embora o •NO seja um radical, não é tão reativo como geralmente sugerido.

Porém, ele se difunde em células, sem alteração, e reage rapidamente com moléculas circundantes, particularmente com espécies que possuam elétrons desemparelhados, como, por exemplo, o O_2 (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; VASCONCELOS et al., 2007; OLMOS et al., 2007).

O $\bullet NO$ reage com $O_2^{\bullet -}$, em reação quimicamente irreversível, com velocidade de reação de $1,9 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$, sendo assim uma das poucas biomoléculas capazes de superar a SOD na conversão de $O_2^{\bullet -}$ para H_2O_2 (Quadro 1). A partir dessa reação é gerado o $ONOO^-$, uma espécie muito citotóxica e mutagênica, similar em reatividade ao HO^\bullet , e prontamente danifica biomoléculas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009). Apesar do seu tempo de vida curto (10-20 ms), causa danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos S-H das proteínas e provoca hidroxilação e nitração de compostos aromáticos. É capaz de formar HO^\bullet independentemente da presença de metais de transição (Figura 2) (SADOWSKA-BARTOSZ; ADAMCZYK; BARTOSZ, 2014; VASCONCELOS et al., 2007).

Uma das reações mais rápidas conhecidas para $ONOO^-$ é a interação com gás carbônico/bicarbonato (CO_2/HCO_3^-), apresentando uma constante de velocidade muito rápida ($3-6 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$) (Quadro 1) (GOMES et al., 2007). O $ONOO^-$ após protonação ($ONOOH$) rearranja-se para NO_3^- e interage com bicarbonato, formando o peroxicarboxilato nitroso ($ONOOCO_2^-$). Sua decomposição leva então à formação de CO_2 e NO_3^- (cerca de 70%) e também ao $\bullet NO_2$ e ânion radical carbonato ($CO_3^{\bullet -}$) (cerca de 30%) (Figura 2). O $CO_3^{\bullet -}$ formado é mediador de diversas reações de oxidação e nitração (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; VASCONCELOS et al., 2007).

O $ONOO^-$ oxida moléculas por meio de dois mecanismos diferentes; o primeiro diz respeito à própria molécula e sua forma protonada, que podem exercer modificações oxidativas diretas de outros compostos através de processos de oxidação de um ou dois elétrons. Apenas alguns grupos químicos reagem diretamente com o $ONOO^-$, o que favorece reações seletivas, e como mencionado principalmente em partes específicas de proteínas. O segundo mecanismo envolve reações de oxidação indiretas, promovidas pela decomposição de $ONOO^-$ em radicais altamente reativos: HO^\bullet e $\bullet NO_2$ (SADOWSKA-BARTOSZ; ADAMCZYK; BARTOSZ, 2014).

Há ainda a formação de NO_2^- advindo principalmente do $\bullet NO$, que reage com O_2 e H_2O e como produto final da decomposição do $ONOO^-$, sendo considerado um metabólito estável final (Figura 2). A taxa de velocidade do $\bullet NO$ na formação de NO_2^- é de $2 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$

¹ (Quadro 1). Apesar de não superar a constante de formação do ONOO^- pela reação do $\bullet\text{NO}$ com $\text{O}_2^{\bullet-}$, o NO_2^- formado deve ser levado em consideração, pois, embora seja considerado um produto estável, ele pode ser transformado em $\bullet\text{NO}_2$ na presença de peróxidos, hemoproteínas, ou mesmo heme livre, e retornar ao grupo de ERNs (OLMOS; GINER; MÁÑEZ, 2007).

Associam-se às EROs e às ERNs, que causam os estresses oxidativo e nitrosativo, respectivamente, as ECRs, ocasionando o chamado estresse carbonílico. As ECRs são geradas no curso das reações de glicação ou de lipoxidação, sendo intermediários na formação dos produtos de glicação (AGEs, do inglês *Advanced Glycation Endproducts*) e de lipoxidação (ALEs, do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*) avançados (BARBOSA et al., 2016).

O estresse carbonílico é caracterizado pelo acúmulo anormal de metabólitos contendo grupamentos carbonílicos eletrofílicos (as ECRs), capazes de “atacar” regiões nucleofílicas de biomoléculas, causando modificações conformacionais em proteínas, RNA (do inglês *ribonucleic acid*) ou DNA, levando, em interrelação com o estresse oxidativo e nitrosativo, a disfunções celulares e teciduais observadas no curso natural do envelhecimento e, especialmente, em inúmeras patologias (LOPACHIN; GAVIN, 2014). Dentre as principais ECRs responsáveis pelo estresse carbonílico *in vivo* estão o metilglioxal (MG), o glioxal (GO) e a 3-deoxiglicosona (3-DG) (Figura 1). Concentrações típicas de GO e MG em plasma humano são de 50 e 15 nM, respectivamente (KALAPOPOS, 1999). Quando as concentrações de ECRs aumentam *in vivo*, há também o aumento do potencial de disfunções fisiológicas e o consequente desenvolvimento de doenças. O escurecimento das lentes oculares (catarata), a progressão das complicações macro e microvasculares do diabetes e a hiperúremia característica de portadores de insuficiência renal são exemplos de fenômenos claramente associados ao estresse carbonílico (SEMCHYSHYN, 2014).

Dentre os mecanismos de defesa contra o acúmulo de ECRs nos sistemas biológicos, se destaca o sistema enzimático mediado pelas glioxalases I e II presentes no citoplasma celular, o qual exerce a função de manter as concentrações de metabólitos carbonílicos em concentrações toleráveis, merecendo ainda destaque como supressores de estresse carbonílico as famílias de enzimas oxido-redutases (ALR1, ALR2 e ARL3, denominadas aldeído redutases (ALRs); EC.1.1.1.2, denominada álcool:NADP⁺ oxido-redutase; EC.1.1.1.21, denominada alditol: NADP⁺ aldose redutase; EC.1.1.1184, denominada carbonil redutase) também presentes no citoplasma das células (KALAPOPOS, 1999).

O estresse carbonílico é causado pelo desequilíbrio entre a formação e a destoxificação enzimática das ECRs, bem como por meio do aumento da exposição às ECRs exógenas. A dieta é considerada uma importante fonte exógena de ECRs, bem como a exposição à poluição ambiental e à química farmacêutica (medicamentos e cosméticos) (RABBANI; XUE; THORNALLEY, 2016).

Em sistemas biológicos, a formação das ECRs pode ocorrer via regulação enzimática, como é o caso da síntese de MG mediada pela metilglicoxal sintase no metabolismo da glicose, ou mediada pela citocromo P450 IIE1 no metabolismo da acetona (a partir dos triacilgliceróis), ou ainda mediada por amino-oxidases que participam do metabolismo proteico. Nesses casos, a formação das ECRs está sujeita ao fino controle metabólico de acordo com a disponibilidade de substratos e cofatores, bem como da disponibilidade de sistemas de destoxificação. No entanto, a formação das ECRs não mediada por enzimas, nas chamadas reações do tipo Maillard ou de glicação não enzimáticas, são consideradas responsáveis por maiores prejuízos fisiológicos, desde que não estão sujeitas ao controle metabólico e podem estar exarcebadas em condições de maior disponibilidade de glicose, como no diabetes, ou em condições de estresse oxidativo e/ou de lipoxidação, comuns a diversos quadros fisiopatológicos (HENNING; GLOMB, 2016; KALAPOUS, 1999; RABBANI; XUE; THORNALLEY, 2016).

Há uma importante interrelação entre o estresse oxidativo e o estresse carbonílico, sendo importante destacar nesse contexto que substâncias capazes de combater o estresse oxidativo podem ser também capazes de inibir a formação de ECRs por meio de algumas vias não-enzimáticas. Um importante exemplo seria o uso de antioxidantes para a prevenção da formação de ECRs como a acroleína, o malondialdeído, o GO e o 4-hidroxi-2-nonenal a partir da peroxidação de lipídeos induzida por EROs (ERGIN, 2013).

Os compostos carbonílicos reativos são capazes de modificar estrutura e função de biomoléculas e comprometem os mecanismos naturais de defesa antioxidante e anti-AGEs/ALEs. Os AGEs também podem causar prejuízos ao metabolismo, por modificação da estrutura nativa de biomoléculas e induzindo a produção de citocinas inflamatórias e de fatores de crescimento por interação com receptores sensíveis a AGEs em células endoteliais, monócitos, macrófagos, adipócitos e podócitos, os RAGEs (Receptores sensíveis a AGEs) (Figura 1). Já os ALEs reagem como proteínas, DNA e aminofosfolipídeos, causando alterações irreversíveis em suas conformações nativas (BARBOSA et al., 2016). Por isso, vários estudos indicam que esses compostos têm um papel essencial no desenvolvimento e progressão de diferentes doenças de base oxidativa, incluindo diabetes, insuficiência renal

crônica, doenças cardiovasculares e distúrbios neurológicos (Figura 1) (VISTOLI et al., 2013).

Em resumo, há impacto significativo da produção excessiva de espécies reativas no funcionamento de biomoléculas. Destaca-se, que, além do DNA, essas espécies reativas também atacam outros componentes celulares como ácidos graxos poli-insaturados de fosfolípídeos, cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de proteínas (ALI et al., 2008) e que esse dano oxidativo pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e à morte celular (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Conforme mostrado na Figura 1, os estresses oxidativo/nitrosativo aliado ao estresse carbonílico, causam esses danos, e induzem ao desequilíbrio redox, envolvido na etiologia de muitas doenças, como aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas, cardiometabólicas, gastrointestinais, câncer, entre outras (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012; GARAGUSO; NARDINI, 2015).

Embora a produção de EROs e ERNs represente mecanismos extremamente importantes principalmente para defesa biológica, há necessidade de equilíbrio na oxidação-antioxidação modulada pelas EROs e ERNs em biosistemas, crucial para a manutenção de funções celulares normais (Figura 1) (WANG, 2016), o que, em parte, é realizado por defesas antioxidantes.

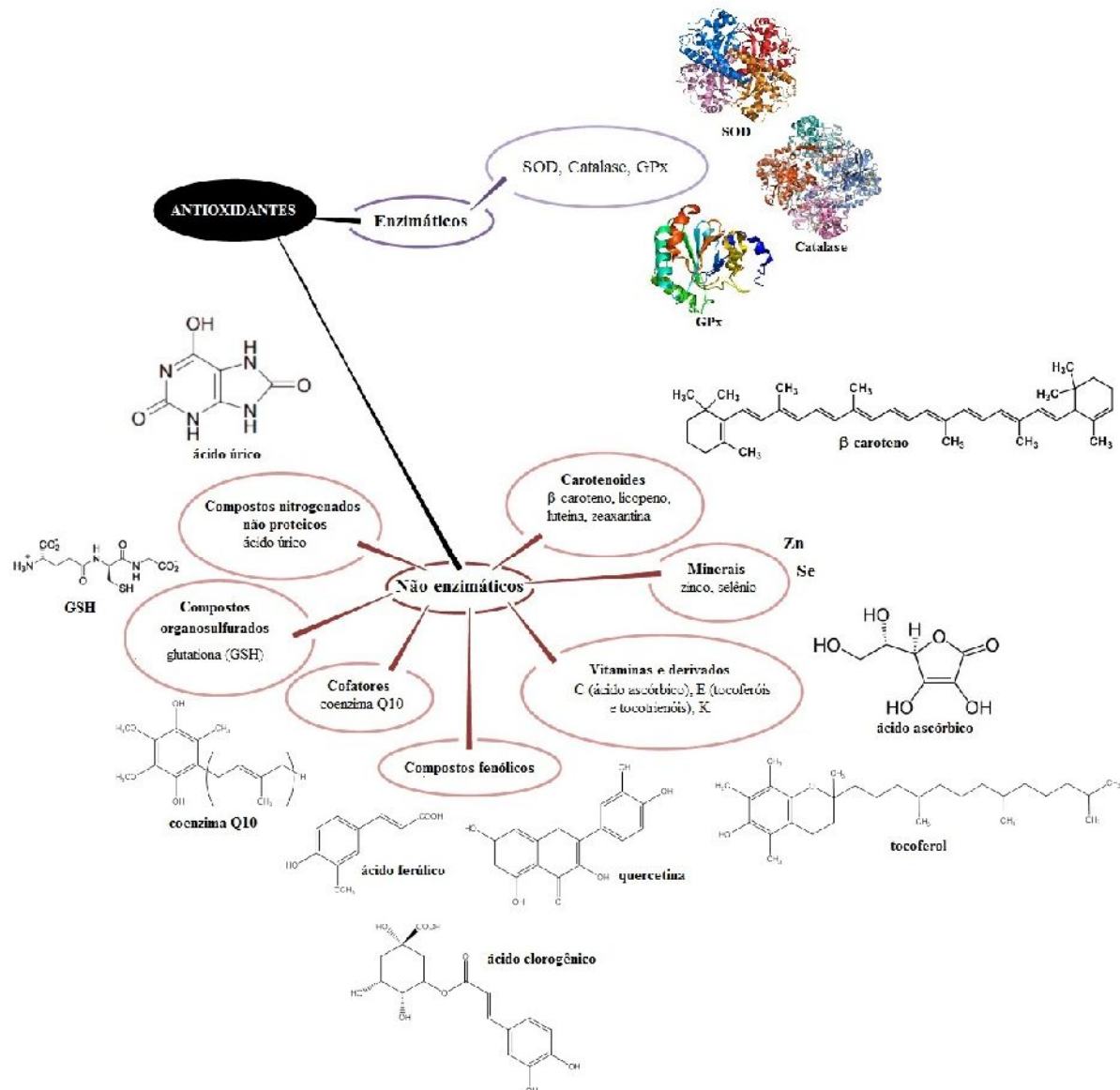
2.2 Defesas antioxidantes

2.2.1 Definição e classificação

Em caso de desequilíbrio redox, há mecanismos de defesa contra os danos induzidos pelas EROs e ERNs. Esses mecanismos atuam em diferentes níveis, como prevenção, eliminação de radicais, reparação e adaptação (ALI et al., 2008; LOBO et al., 2010). Em geral, os antioxidantes atuam por meio de um ou por múltiplos mecanismos, sendo capturadores de radicais, doadores de hidrogênio, doadores de elétrons, decompositores de peróxidos, inibidores de enzimas e quelantes de metais, além de efeitos combinados e sinérgicos (ALI et al., 2008; LOBO et al., 2010; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Os antioxidantes pertencem a diferentes classes químicas, como mostra a Figura 9. Podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos; dentre os enzimáticos destacam-se principalmente as enzimas SOD, GPx e CAT e os não enzimáticos incluem-se em diferentes classes químicas.

Os antioxidantes preventivos estão incluídos na primeira linha de defesa, e suprimem a formação de espécies reativas. As fontes importantes dessa linha são as defesas enzimáticas, que como já citado, incluem a SOD, a GPx, a CAT, dentre outras (Figura 9) (LOBO et al., 2010).

Figura 9 - Exemplos de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos.



Fonte: adaptado de Chavarria (2014).

A segunda linha de defesa são os antioxidantes que eliminam os radicais ativos para suprimir o início da cadeia e/ou interromper as etapas de propagação desta. Eles são hidrofóbicos ou lipofílicos. Desta linha, têm-se antioxidantes enzimáticos, enzimas proteolíticas e peptidases presentes no citoplasma e nas mitocôndrias de células de mamíferos.

Entretanto, destacam-se os antioxidantes não enzimáticos, que podem ter diferentes características estruturais e atuar de diferentes formas. Carotenoides, minerais, vitaminas, cofatores, compostos organosulfurados e nitrogenados não proteicos e os compostos fenólicos são exemplos (Figura 9) (ALI et al., 2008; LOBO et al., 2010).

Na terceira linha, os sistemas de reparo do DNA constituem fortes sistemas de defesa contra danos oxidativo (LOBO et al., 2010).

A quarta linha de defesa inclui a função chamada adaptativa, onde ocorre sinalização direcionada para a produção de espécies reativas que induzem a formação e transporte de antioxidantes apropriados para a função necessária (LOBO et al., 2010).

Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas que podem neutralizar as espécies reativas por meio da captura ou doação de elétrons. Eles podem reagir diretamente com as espécies e destruí-los, enquanto tornam-se espécies que são menos reativas, mais duradouras e menos perigosas do que as espécies que neutralizaram. Eles podem ser neutralizados por outros antioxidantes ou outros mecanismos em etapas de terminação radicalar (LÜ et al., 2010).

Dos antioxidantes não enzimáticos, os antioxidantes derivados de vegetais têm sido considerados muito eficazes e têm mostrado habilidade em reduzir os efeitos das EROs e ERNs (ALI et al., 2008). Dentre estes antioxidantes, os compostos fenólicos são os mais abundantes na maioria das dietas (GARAGUSO; NARDINI, 2015; ALI et al 2008). Eles são amplamente distribuídos nas plantas medicinais, especiarias, legumes, frutas, grãos e sementes, são um importante grupo de antioxidantes naturais com possíveis efeitos benéficos sobre a saúde humana (OLIVEIRA et al., 2009; STRATIL; KLEJDUS; KUBÁ , 2007). Estudos epidemiológicos sugerem fortemente que o consumo a longo prazo de alimentos ricos em compostos fenólicos oferece proteção contra o desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, osteoporose e doenças degenerativas (GARAGUSO; NARDINI, 2015).

2.2.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos ou polifenóis são amplamente distribuídos em plantas. Possuem pelo menos um anel aromático, substituído por um ou mais grupos hidroxila e suas estruturas podem variar de uma molécula fenólica simples até a de um polímero complexo de elevada massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Eles são associados à resistência das plantas contra agentes patogênicos microbianos e animais herbívoros, tais

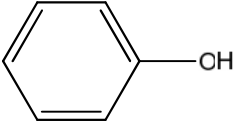
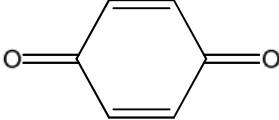
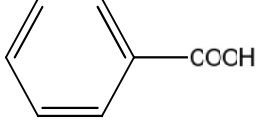
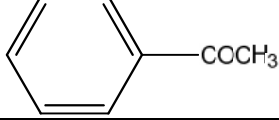
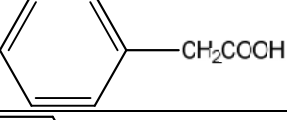
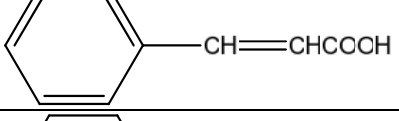
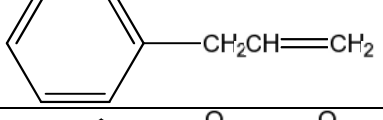
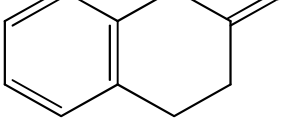
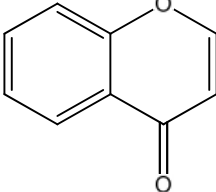
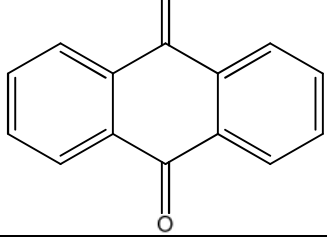
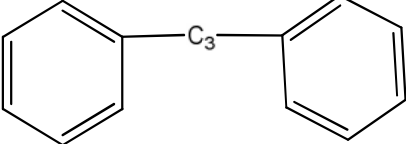
como insetos, e proteção contra a radiação solar. Fenóis merecem uma atenção especial quando se consideram os amplos benefícios que oferecem às plantas e, conseqüentemente, a outros organismos vivos. Os efeitos benéficos derivados dos compostos fenólicos têm sido atribuídos à sua atividade antioxidante. Essa atividade depende da estrutura, em particular do número e posições dos grupos hidroxilas e da natureza das substituições nos anéis aromáticos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; QUIDEAU et al., 2011). A extensão da conjugação, o número de grupos hidroxilas, a presença de grupos metoxi e da função catecol são as principais características que definem sua eficácia antioxidante (CASTELLANO; TENA; TORRENS, 2012; QUIDEAU et al., 2011).

Os compostos fenólicos podem ser classificados de diferentes maneiras porque são constituídos por um grande número de estruturas heterogêneas que variam de moléculas simples a compostos altamente polimerizados. Podem ser classificados de acordo com sua cadeia carbônica, quanto à sua distribuição na natureza, quanto à localização na planta juntamente com a estrutura química destas substâncias. As classes de compostos fenólicos de acordo com sua estrutura são mostradas no Quadro 3 (LEE; KOO; MIN, 2004; REIS GIADA, 2013; SHAHIDI; HO, 2005).

A característica mais pesquisada dos compostos fenólicos das plantas é a sua capacidade de capturar EROs, como: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , H_2O_2 , 1O_2 e $HOCl$, RO^{\bullet} e ROO^{\bullet} . Podem também atuar como antioxidantes por quelação de íons metálicos tais como íons de ferro (II e III) e cobre (I e II), que estão envolvidos na conversão de $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em HO^{\bullet} , que é altamente agressivo. Eles também podem bloquear a ação de algumas enzimas responsáveis pela geração de $O_2^{\bullet-}$, como a XO e a proteína quinase (QUIDEAU et al., 2011; WANG; JÓNSDÓTTIR; ÓLAFSDÓTTIR, 2009).

Além dos compostos fenólicos de ocorrência natural encontrados nas plantas, também são utilizados compostos fenólicos sintéticos com função antioxidante. Entretanto, por serem voláteis e facilmente degradados em altas temperaturas, são um inconveniente que limita seu uso como antioxidante na indústria alimentícia, estudos demonstraram que antioxidantes sintéticos como o BHT e BHA, podem apresentar riscos à saúde quando consumidos de forma crônica, tendo efeitos colaterais, sendo potencialmente cancerígenos (ANDREO; JORGE, 2006; BRANEN, 1975; ITO et al., 1983; WANG; JÓNSDÓTTIR; ÓLAFSDÓTTIR, 2009). Em função disto, nos últimos anos, o uso de antioxidantes naturais presentes em alimentos e outros materiais biológicos tem atraído um interesse considerável devido à sua presumida segurança, valor nutricional e terapêutico (ALI et al., 2008).

Quadro 3 - Classes de compostos fenólicos.

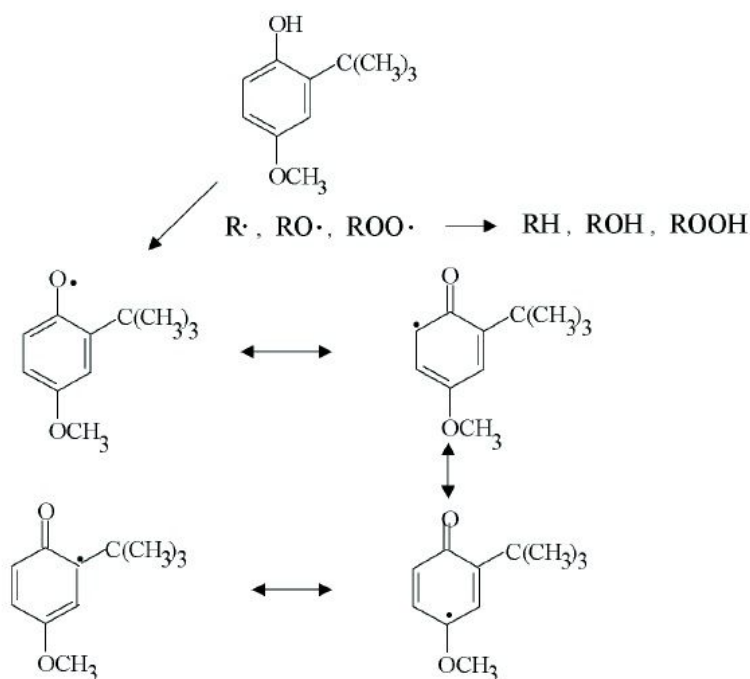
Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenóis simples	C ₆	
Benzoquinonas	C ₆	
Ácidos fenólicos	C ₆ -C ₁	
Acetofenona	C ₆ -C ₂	
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	
Ácidos hidroxicinâmicos	C ₆ -C ₃	
Fenilpropenos	C ₆ -C ₃	
Cumarinas	C ₆ -C ₃	
Cromonas	C ₆ -C ₃	
Antraquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆	
Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	

Fonte: Lee; Koo; Min (2004).

2.2.3 Mecanismos de defesa dos antioxidantes contra radicais não biológicos, EROs e ERNs

Os antioxidantes são oxidados por espécies reativas, resultando em uma forma mais estável, menos reativa. Em compostos fenólicos, a atividade antioxidante acontece pela formação de radical no grupo fenol e este radical fenólico é estabilizado pela deslocalização do elétron por ressonância dentro do anel aromático (Figura 10) (BREWER, 2011; LEE; KOO; MIN, 2004; NIJVELDT et al., 2001). O potencial de eliminação de espécies reativas de compostos fenólicos parece depender principalmente do padrão (número e localização) de grupos -OH livres no esqueleto, pois compostos com múltiplos grupos hidroxilas são antioxidantes mais eficazes do que aqueles com apenas um (BREWER, 2011).

Figura 10 - Estabilização de ressonância de radicais antioxidantes fenólicos.

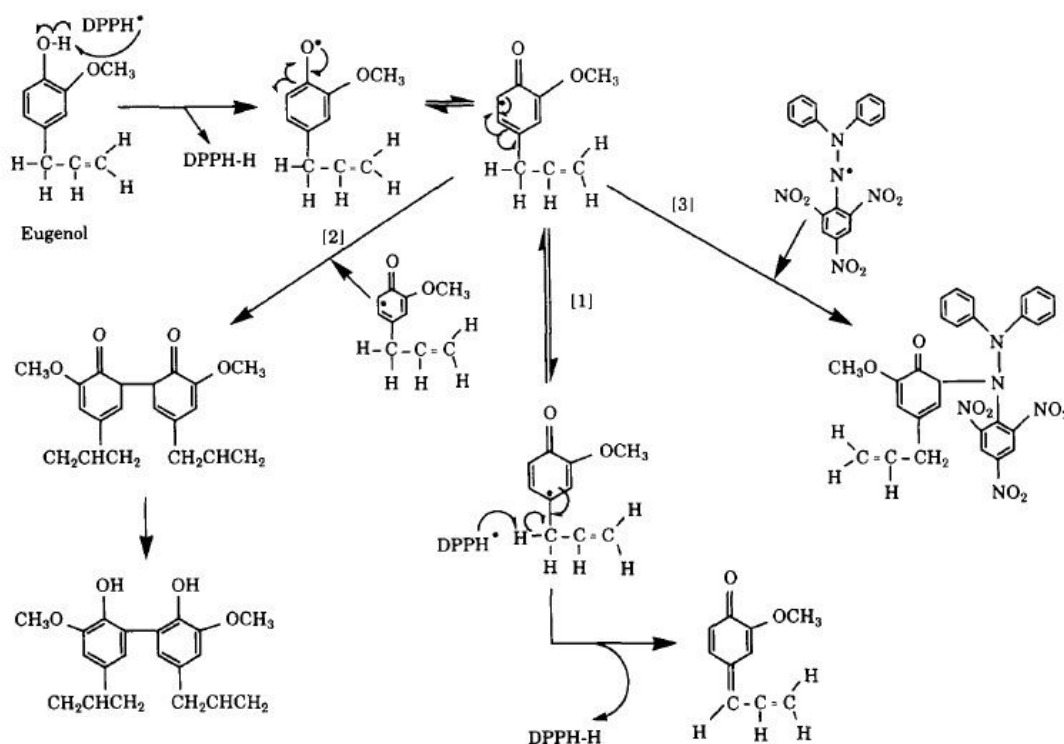


Fonte: Lee; Koo; Min (2004).

Especificamente, para o radical DPPH[•], espécie reativa não biológica mais utilizada em métodos de capacidade antioxidante, é apresentado alguns tipos de mecanismos de ação. Em geral, a redução da concentração de DPPH[•] é relacionada ao número de grupos hidroxila disponíveis na molécula, em compostos que reagem muito rapidamente. No entanto, para muitos compostos testados, o mecanismo é mais complexo, como para o BHT e BHA, cuja estequiometria reacional é de duas ou mais moléculas de DPPH[•]/mol do composto, apesar de possuírem apenas um grupo hidroxila.

Grupos substituintes podem ser reativos, como cadeias laterais em anéis aromáticos, como exemplificado, na Figura 11, o eugenol, com abstração de hidrogênio em posições benzílicas. Após a doação de hidrogênio radicalar, a partir de uma hidroxila fenólica, há ressonância e várias possibilidades reacionais, incluindo etapas de propagação e terminação, típicas de radicais, o que explica as diferenças entre as eficiências sequestrantes de diferentes compostos fenólicos. Entre as reações possíveis, há participação de grupo alquila em *para*- no anel aromático, como mostrado na equação 1 da Figura 11. Outra possibilidade, para fenóis não substituídos em *para*- e *orto*-, envolve dimerização entre dois radicais fenoxila, e após a dimerização e tautomerismo, dois grupos hidroxila seriam regenerados e poderiam novamente interagir com o DPPH[•], conforme mostrado na Figura 11, reação 2. Adicionalmente, mais uma molécula de DPPH[•] pode reagir com um radical arila do fenol como indicado na equação 3 da Figura 11, com regeneração do fenol, ativo frente ao DPPH[•]. As reações 2 e 3 aplicam-se a moléculas que tenham substituintes na posição *orto*- ou *para*-. A química radicalar é complexa e, de modo geral, dá origem a múltiplos produtos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995), o que é um obstáculo para o uso do presente método para comparação de substâncias com estruturas e reatividades diferentes.

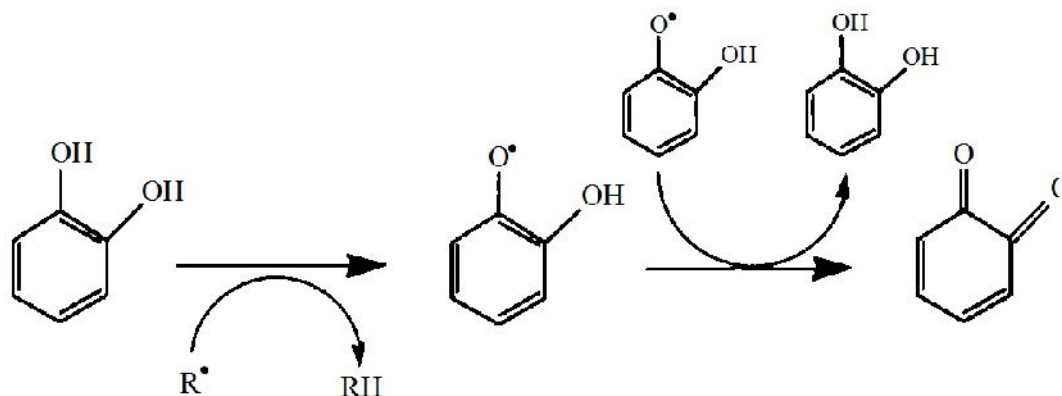
Figura 11 - Possibilidades reacionais do DPPH[•] com composto fenólico (eugenol): reação 1, reatividade de cadeias laterais alquílicas (posição benzílica); reação 2, dimerização com regeneração de fenóis; reação 3, formação de ligação covalente N-C, entre os dois radicais.



Fonte: Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

Ressalta-se que a posição do segundo e terceiro grupos hidroxila é importante. Os compostos cujo segundo grupo hidroxila está na posição *orto*- ou *para*- têm uma atividade mais elevada do que quando em *meta*-. A eficiência dos difenóis *orto*- e *para*- é em parte devida à estabilização do radical ariloxila por ligação de hidrogênio ou por regeneração de outro difenol como indicado na Figura 12, assim como substituição *orto*-metóxi, que também estabiliza o radical ariloxila pela doação de elétrons e, portanto, aumenta a eficiência antioxidante e anti-radicalar. Por outro lado, a presença de um grupo eletroatraente (CHO ou COOH) ou, como no caso do fenol, a ausência de qualquer grupo eletrodoador, produz uma fraca ressonância no anel aromático do radical fenoxila e reduz consideravelmente a eficiência anti-radicalar (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; Berset, 1995).

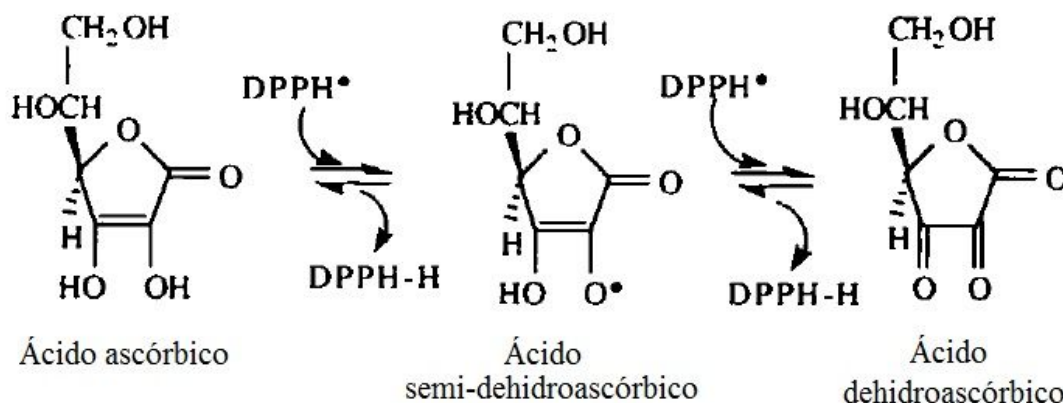
Figura 12 - Mecanismo de regeneração de um *orto*-difenol.



Fonte: Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

Ainda sobre o radical DPPH[•], apesar de não possuir um anel fenólico, o ácido ascórbico é um dos compostos antioxidantes mais estudados e muitas vezes utilizado como substância para se comparar atividade antioxidante; sua atividade frente a esse radical indica a capacidade de reagir com duas moléculas de DPPH[•] como mostrado na Figura 13, pela presença de duas hidroxilas enólicas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Figura 13 - Mecanismo antioxidante do ácido ascórbico com o DPPH[•].

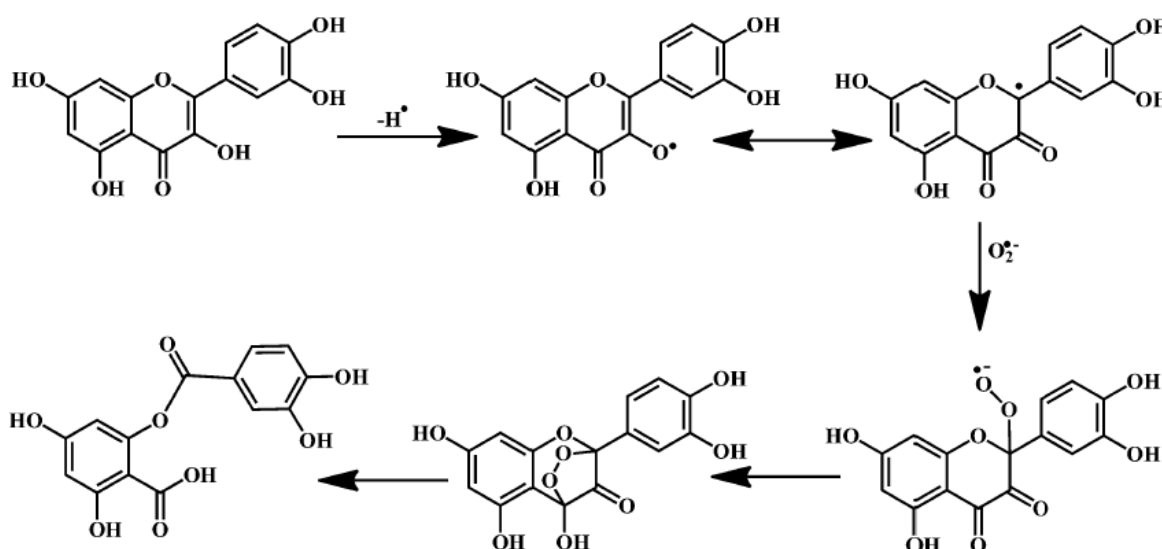


Fonte: Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995).

Em relação à atividade antioxidante contra EROs, como um bom exemplo, temos a quercetina, um dos compostos fenólicos mais conhecidos, seu mecanismo de ação antioxidante pode ser visto na Figura 14, ela age contra o O₂^{•-} pela doação de hidrogênio e formação do radical fenólico. As antocianinas, também são potenciais antioxidantes pela atividade de eliminação de espécies reativas por doação de hidrogênio das hidroxilas no anel

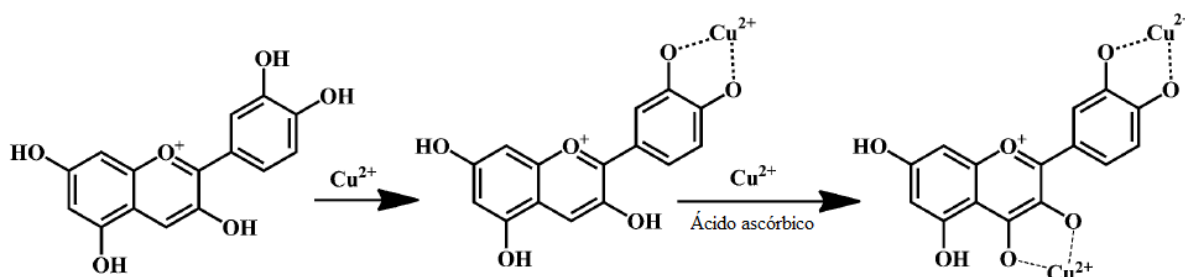
fenólico, além de ter eficácia na inibição da oxidação lipídica por sua atividade quelante de íons metálicos (Figura 15). A atividade antioxidante de derivados hidroxicinâmicos está claramente correlacionada com os padrões de hidroxilação e metilação do anel aromático, sendo a remoção de espécies reativas semelhante à dos flavonoides, como a quercetina, por doação do hidrogênio hidroxila e estabilização por ressonância, assim como permitem a quelatação de íons metálicos (NIMSE; PAL, 2015).

Figura 14 - Mecanismo da atividade de eliminação do radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pela quercetina.



Fonte: Nimse; Pal (2015).

Figura 15 - Atividade quelante de íons metálicos (Cu^{2+}) de antocianina.



Fonte: Nimse; Pal (2015).

Além do anel fenólico, podem existir outras estruturas que podem apresentar capacidade de neutralizar/eliminar as espécies reativas. O licopeno, por exemplo, é um carotenoide com elevado número de ligações duplas conjugadas o que lhe confere a capacidade de extinção de 1O_2 , por exemplo, o β -caroteno. Ligações duplas desempenham

também um papel importante na neutralização de espécies reativas (LEE; KOO; MIN, 2004; NIMSE; PAL, 2015).

O mecanismo da ação antioxidante de compostos fenólicos para as ERNs parece estar relacionado aos mesmos grupos envolvidos nos mecanismos antioxidantes contra as EROs, como sua capacidade de doação de hidrogênio e propriedades quelantes de metais (OLMOS; GINER; MÁÑEZ, 2007).

Sadowska-Bartosz; Adamczyk; Bartosz (2014) estudaram a ação antioxidante contra o ONOO^- de vários compostos fenólicos, e os resultados encontrados indicaram que a ação em diferentes sistemas de análise relacionava-se à presença de hidroxila fenólica. Em particular, os flavonoides podem proteger contra a ação do ONOO^- de duas maneiras: pela remoção direta de ONOO^- e/ou dos produtos da sua decomposição, ou pela reação com produtos intermediários de reações de ONOO^- com estruturas alvo, reparando danos iniciais.

Além disso, relata-se que flavonoides também capturam os precursores de ONOO^- , $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2\cdot^-$, e podem bloquear a nitração de uma grande variedade de moléculas-alvo do ONOO^- , de duas maneiras, pela sua própria nitração ou por uma reação de oxidação com a consequente formação de uma quinona (OLMOS; GINER; MÁÑEZ, 2007).

Uma das hipóteses importantes a se destacar na ação antioxidante de compostos deve-se à competição dos compostos diante da espécie reativa. Compostos que tenham similaridade estrutural com as moléculas alvos das espécies reativas podem competir e reagir, impedindo o ataque dessas espécies. Por exemplo, Sadowska-Bartosz; Adamczyk; Bartosz (2014) sugeriram que a capacidade de isoflavonas reagirem com o ONOO^- é condicionada à sua semelhança com a tirosina, molécula alvo de nitração pelo ONOO^- .

2.3 Métodos de ensaio de atividade antioxidante

A fim de identificar compostos de ocorrência natural que apresentem potencial antioxidante e viabilidade de utilização *in vivo* para a prevenção e/ou tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, ensaios antioxidantes podem ser realizados por métodos químicos, modelos *in vitro* e *in vivo* (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

Estudos em modelos animais fornecem informações importantes sobre a biodisponibilidade, metabolismo e problemas de toxicidade dos antioxidantes, indicando potenciais aplicações clínicas destas substâncias. No entanto, esses ensaios, assim como trabalhos com seres humanos são caros e não são adequados para a triagem inicial de

compostos com potencial antioxidante. Assim, modelos de cultura de células são utilizados para triagem antioxidante inicial, porém, os sistemas celulares são muito complicados e muitos fatores podem afetar os resultados em comparação com os sistemas sem células (LÜ et al., 2010).

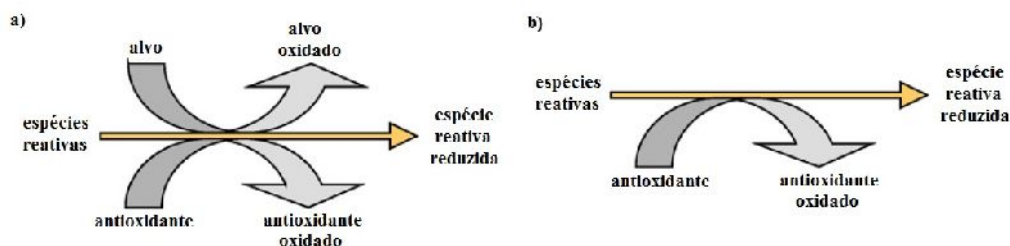
Dessa forma, muitos sistemas químicos e sem células oferecem vantagens únicas para delinear os mecanismos químicos e moleculares de ação de novos antioxidantes (LÜ et al., 2010). Esses estudos visam à pesquisa rápida de um grande número de moléculas, ou o teste de extratos naturais com uma composição complexa ou desconhecida, mas, que sejam dotados de algum potencial antioxidante (AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

Existe um grande número de ensaios de capacidade antioxidante, com alguns requisitos principais, como: utilização de moléculas biológicas relevantes; tecnicamente simples; parâmetros e mecanismos químicos definidos; instrumentação prontamente disponível; repetibilidade e reprodutibilidade adequadas; adaptável para ensaio de antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos; e que seja adaptável à análise de alto rendimento (MAGALHÃES et al., 2008).

Os métodos antioxidantes baseiam-se em vários mecanismos de ação: inibição da capacidade de geração; eliminação de EROs/ERNs; redução da capacidade oxidante, capacidade de quelação de metais; verificação da atividade de enzimas antioxidantes e inibição de enzimas oxidativas. Os métodos químicos baseiam-se essencialmente nos dois primeiros mecanismos, e basicamente, utilizam radicais não biológicos que são moléculas estáveis, em procedimentos simples, rápidos, sensíveis e reprodutíveis, e outros ensaios utilizam espécies reativas de ocorrência biológica, em sistemas livres de células, e são frequentemente considerados por investigadores, antes de estudos adicionais em linhagens celulares e/ou modelos animais (LÜ et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008).

Em resumo, os métodos químicos se baseiam, principalmente, em dois princípios. Na Figura 16a, observa-se o esquema competitivo, onde é adicionada a espécie reativa, o antioxidante e uma molécula alvo, também conhecida como sonda que permite uma mudança de sinal, como alteração de cor, diminuição ou aumento de fluorescência ou outras mudanças possíveis de leitura em equipamento adequado. No esquema não competitivo (Figura 16b), não há molécula alvo, e a mudança de sinal geralmente é relacionada à espécie reativa.

Figura 16 - Representação esquemática de abordagens competitivas (a) e não competitivas (b) para a determinação *in vitro* da capacidade antioxidante.



Fonte: Magalhães et al. (2008).

2.3.1 Ensaios de capacidade de eliminação contra radicais não biológicos estáveis e avaliação da capacidade total de redução

Dos ensaios de capacidade de eliminação de radicais não biológicos e avaliação da capacidade total de redução, destacam-se a capacidade de redução de Folin-Ciocalteu, o sequestro do radical livre estável DPPH[•], TEAC (do inglês *Trolox equivalent antioxidant capacity*), ensaio do FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) e capacidade de redução total estimada por métodos eletroquímicos, entre outros.

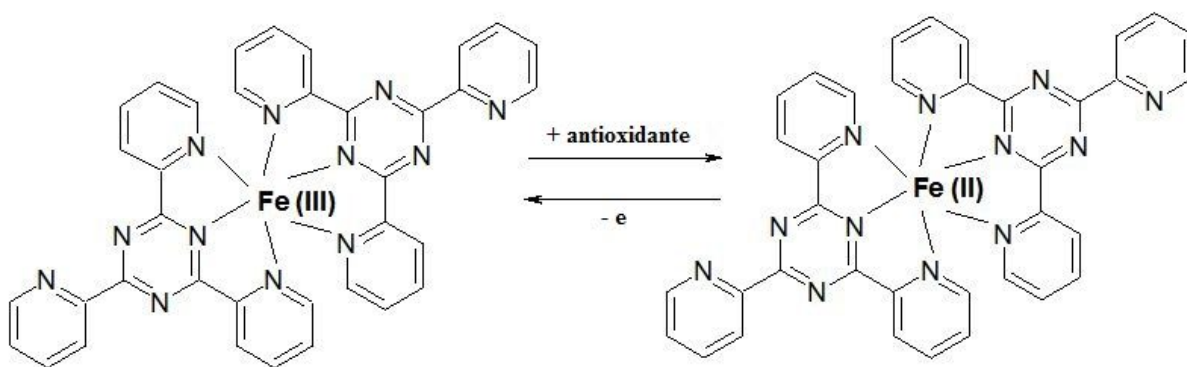
Apesar da natureza química indefinida do reagente de Folin-Ciocalteu, uma mistura de fosfomolibdatos e fosfotungstos, o ensaio de conteúdo total de fenóis (CTF) é conveniente, simples e reprodutível. Várias publicações aplicam o ensaio CTF e ensaios de capacidade antioxidante pelos métodos citados, e mostram excelentes correlações lineares entre o "conteúdo total de fenóis" e a "atividade antioxidante". A fundamentação química do ensaio CTF baseia-se na transferência de elétrons em meio alcalino de compostos fenólicos e outras espécies redutoras para sais de molibdênio, formando complexos azuis que podem ser monitorados espectrofotometricamente em 750-765 nm (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009). Entretanto, o reagente de Folin-Ciocalteu não só mede fenóis, pois reage com qualquer outra substância redutora. Portanto, o mais adequado é indicar que o método mede a capacidade total de redução de uma amostra, não apenas compostos fenólicos. Este reagente faz parte do ensaio de proteína e alguns outros compostos contendo nitrogênio, como hidroxilamina e guanidina, além de ser reativo com tióis, muitas vitaminas, guanina, os trioses gliceraldeído e di-hidroxiacetona, e alguns íons inorgânicos (EVERETTE et al., 2010; IKAWA et al., 2003).

O ensaio do DPPH[•] tem sido amplamente utilizado para avaliar a eficácia de eliminação de radicais livres de várias substâncias antioxidantes. O DPPH[•] é um radical livre

reação fixos pré-determinados ou em ensaio cinético (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011; KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

A capacidade antioxidante por meio do método de FRAP envolve transferência de elétrons. O método baseia-se na medida direta da habilidade dos antioxidantes, em meio ácido (pH = 3,6), em reduzir o complexo férrico-tripiridiltriazina $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$, formando o complexo ferroso-tripiridiltriazina $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$, que possui uma coloração azul intensa, causando um aumento na absorvância a 595 nm (Figura 18) (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURACALIXTO, 2006; PRIOR, 2015).

Figura 18 - Redução do complexo $[\text{Fe (III) (TPTZ)}_2]^{3+}$ a $[\text{Fe (II) (TPTZ)}_2]^{2+}$.



Fonte: Kesi ; Ibrišimovi -Mehmedinovi ; Šestan (2015).

Os métodos eletroquímicos permitem estimar a capacidade de redução total, uma vez que o potencial de oxidação tem relação conceitual com a capacidade antioxidante. Por este método é possível além de realizar a caracterização eletroquímica, obter correlações entre os aspectos estruturais e o mecanismo de atividade antioxidante de substâncias puras. Os mecanismos de oxido-redução podem revelar aspectos tais como, avaliação do efeito de substituintes e da conjugação de duplas, pelos valores no deslocamento de potenciais redox, efeitos da participação do próton ou dependência do pH, efeito de solvente, número de elétrons ou etapas envolvidas (ALVES et al., 2010).

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas em métodos eletroquímicos. As técnicas voltamétricas podem correlacionar potenciais de oxidação, intensidade de corrente e/ou outros parâmetros eletroquímicos com a capacidade antioxidante, e assim se mostrar mais seletivas e sensíveis que muitos métodos espectrométricos. As técnicas coulométricas baseiam-se na medida da quantidade de eletricidade ou carga requerida para oxidar ou reduzir um analito alvo, assim, fundamenta-se no princípio da proporcionalidade entre número de elétrons que fluem pelo eletrodo e a quantidade em moles de substância eletroativa envolvida

na reação eletroquímica. No uso da eletrólise em fluxo contínuo, observaram-se boas correlações entre intensidade de corrente e atividade antioxidante de diversas espécies eletroativas naturais, e sua aplicação a compostos polifenólicos permite ainda relacionar os valores de número de elétrons ou de corrente ao número de grupos hidroxila presentes. Uma das técnicas mais utilizadas é a voltametria cíclica (VC), onde a capacidade de redução de uma amostra é analisada a partir de três parâmetros obtidos através dos traçados de VC: o potencial de oxidação (que reflete a capacidade de redução específica), a intensidade da corrente anódica, a área sob a onda anódica, onde os dois últimos itens estão relacionados com a concentração das espécies redutoras presentes na amostra. Assim, a técnica VC permite rastreio rápido do perfil eletroquímico das amostras, além de possibilitar a análise em meio aquoso, bem como em solventes orgânicos. Além das anteriores, várias outras técnicas baseadas em métodos eletroquímicos vêm sendo utilizadas, destacando métodos baseados na proteção à oxidação de bases de DNA e aqueles baseados na capacidade de redução do Fe^{3+} e Ce^{4+} (ALVES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008).

Em resumo, ensaios com radicais livres de ocorrência não biológica são frequentemente utilizados e são importantes para indicar, em primeira instância, a atividade antioxidante de compostos e extratos. Porém apesar de serem métodos extremamente úteis na triagem de extratos ou compostos com potencial antioxidante, prevê-se que nem todos os métodos têm a mesma solidez, com pequena possibilidade de prever um efeito biológico *in vivo*. Apresentam limitações e interferências, como acessibilidade estérica, número de grupos hidroxilas disponíveis, complexidade dos seus mecanismos, substâncias interferentes, baixa reprodutibilidade, etc., comprometendo suas correlações com a habilidade dos compostos em inibir a deterioração oxidativa *in vivo*, e como consequência, muitas vezes produzem resultados inconsistentes ou contraditórios, prejudicando claramente a sua utilidade e pesquisas futuras enganosas (ALVES et al., 2010; AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

Para uma avaliação mais fidedigna da capacidade antioxidante de uma determinada substância, é necessário saber quais radicais são gerados, como, onde e qual a extensão do dano causado, ou seja, métodos que sob as configurações apropriadas, levariam a informações mais relevantes e úteis, do ponto de vista biológico (ALVES et al., 2010; AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

Assim, para uma avaliação mais confiável desta atividade em sistemas biológicos, devem ser utilizados modelos que mimetizem as mesmas condições químicas, físicas e ambientais esperadas. Técnicas que utilizam as EROs e ERNs em ensaios químicos são mais confiáveis, pois essas espécies são produzidas no organismo e estão envolvidas de forma

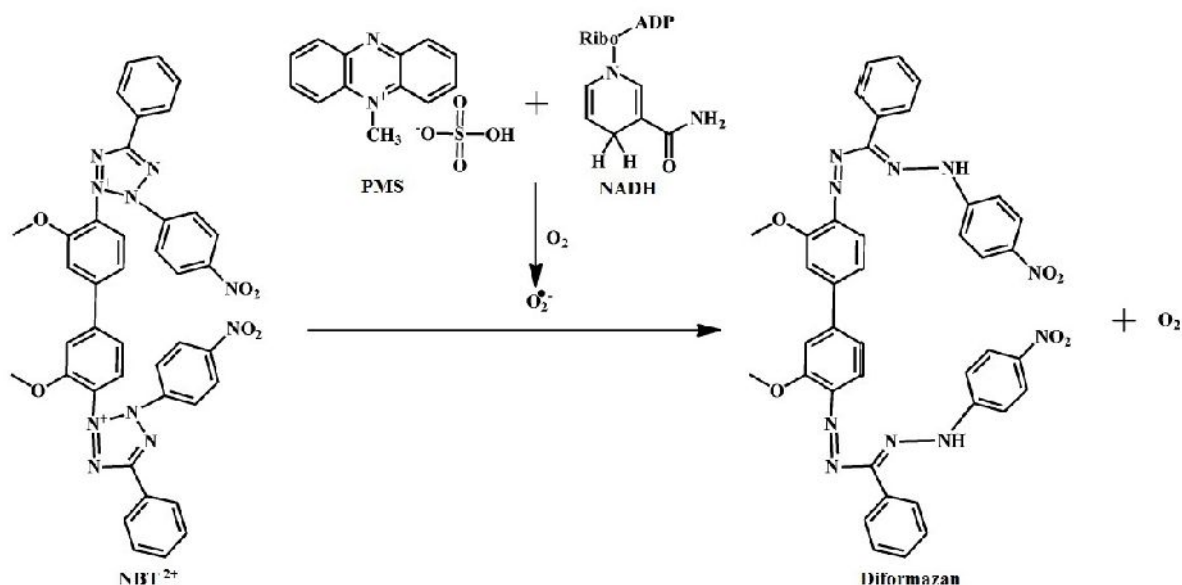
direta ou indireta em diversas patologias (ALVES et al., 2010; AMORATI; VALGIMIGLI, 2015).

2.3.2 Métodos com espécies reativas biologicamente importantes

Os ensaios químicos com espécies reativas encontradas no ambiente biológico utilizam as principais moléculas de EROs e ERNs. As EROs e as ERNs geralmente não apresentam sinal detectável por técnicas simples, então em geral os ensaios utilizam moléculas, chamadas sondas, que interagem com as espécies e que promovem mudança de um sinal que pode ser detectado, como mudança de absorção em determinado comprimento de onda, aumento ou diminuição na fluorescência, sinal de luminescência, entre outros.

Nos métodos de capacidade de eliminação de EROs destacam-se os ensaios de eliminação de $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HO^{\bullet} , $HOCl$, 1O_2 , ROO^{\bullet} e, das ERNs, ensaios para $ONOO^-$ e $^{\bullet}NO$. Existem alguns métodos propostos para o $O_2^{\bullet-}$. Em geral, detecta-se o aumento da absorvância, ou compostos formados ou sinal de quimiluminescência (MAGALHÃES et al., 2008). Um dos métodos mais utilizados é baseado em uma reação não enzimática do metassulfato de fenazina (PMS) na presença de NADH para geração do $O_2^{\bullet-}$ que reduz o cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT) à diformazan. Compostos antioxidantes competem com NBT por $O_2^{\bullet-}$ e dessa forma diminuem a taxa de reação, que é monitorada, espectrofotometricamente, em 560 nm (Figura 19) (MAGALHÃES et al., 2008; NIMSE; PAL, 2015).

Figura 19 - Esquema da redução do cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT) a diformazan induzido por $O_2^{\bullet-}$.

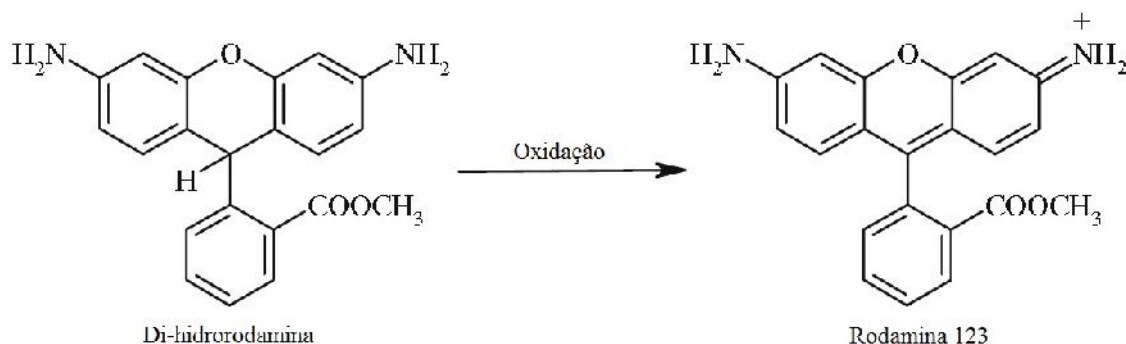


Fonte: Nimse; Pal (2015).

Os métodos propostos para ensaio de eliminação de H_2O_2 também utilizam espectrofotometria e fluorescência, mas a maioria dos métodos utiliza quimiluminescência. A espectroscopia de luminescência envolve vários tipos de fenômenos ópticos; os mais difundidos referem-se à fluorescência molecular, à fosforescência e à quimiluminescência. A quimiluminescência está baseada na emissão de luz de uma espécie excitada que é gerada no curso de uma reação química, é caracterizada por sua alta sensibilidade, ampla faixa linear de resposta, ausência de efeitos de espalhamento e simplicidade de instrumentação, porém, somente certas classes de substâncias exibem luminescência nativa. Isto limita o uso dos métodos luminescentes quando comparados a outros métodos analíticos (BECHARA; VIVIANI, 2015; MAGALHÃES et al., 2008; SOTOMAYOR et al., 2008).

Um dos exemplos do método utilizado para detecção de ação de antioxidantes para a eliminação de H_2O_2 está esquematizado na Figura 20, em que ocorre a reação quimiluminescente para a lucigenina na presença de H_2O_2 , ocorrendo a formação de um intermediário (dioxetano) produzindo duas moléculas de N-metil-acridona com emissão de luz (SOTOMAYOR et al., 2008).

Figura 21 - Esquema da oxidação da di-hidrorodamina 123 (DHR) à rodamina 123.

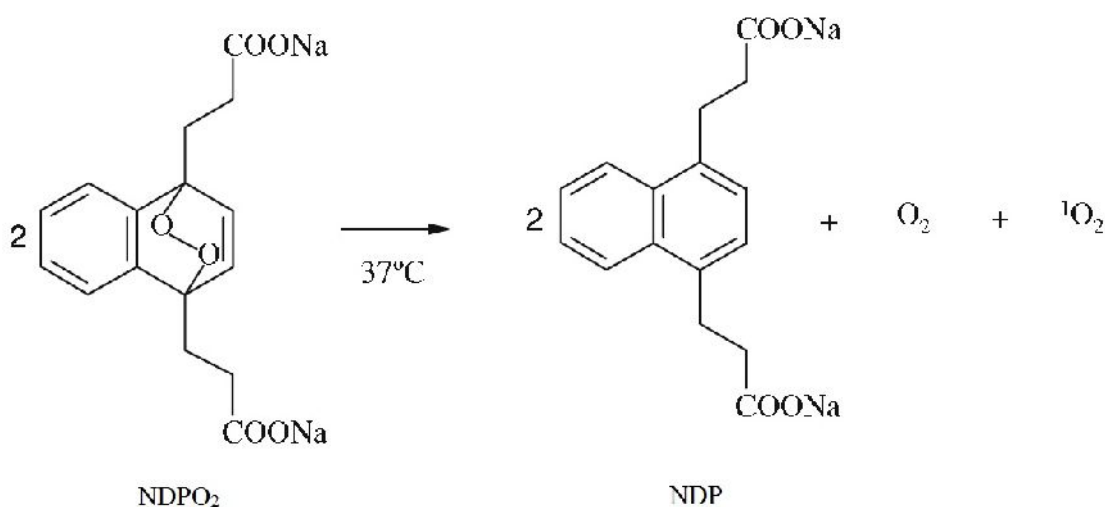


Fonte: Costa et al. (2007).

O HOCl e o ONOO⁻ são sintetizados mais facilmente que o ¹O₂, antes do ensaio. A obtenção de HOCl é realizada imediatamente antes do ensaio, ajustando o pH para 6,2 com ácido sulfúrico (H₂SO₄), em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl). O ONOO⁻ é sintetizado previamente pela mistura de uma solução de H₂O₂ acidificada com ácido clorídrico (HCl), com nitrito de sódio (NaNO₂) (GOMES et al., 2007).

A geração do ¹O₂ é feita no momento do ensaio pela decomposição térmica de um composto específico, o 3,3'-(1,4-naftaleno)bispropionato de sódio (NDPO₂). A decomposição produz o ácido 3,3'-(1,4-naftaleno) bispropiónico (NDP) e O₂, não reativo, e a espécie desejada o ¹O₂, que promoverá a oxidação da DHR (Figura 22) (GOMES et al., 2007).

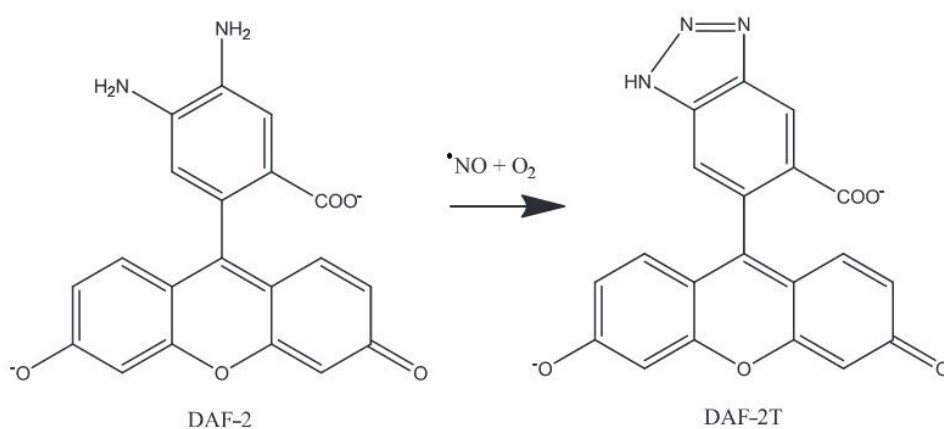
Figura 22 - Esquema da decomposição térmica do endoperóxido NDPO₂, solúvel em água, produzindo o NDP, oxigênio molecular (O₂) e oxigênio singlete (¹O₂).



Fonte: Costa et al. (2007).

Para a detecção de $\bullet\text{NO}$, a maioria dos métodos se concentra em metabólitos do $\bullet\text{NO}$, como nitrito e nitrato ou S-nitrosotiol ou nitrosaminas. Mas, o $\bullet\text{NO}$ pode ser detectado com alta sensibilidade e especificidade por quimioluminescência, pela qual o $\bullet\text{NO}$ interage com o ozônio, mas requer equipamento analítico especial. Então, sondas fluorescentes passaram a ser utilizadas. Dentre elas, a 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) tem sido mais amplamente utilizada. A fracção diaminoarilo forma um triazol com intensa fluorescência, após nitroação a triazol fluoresceína (DAF-2T), um produto fluorescente verde intenso (Figura 23). A capacidade de eliminação de $\bullet\text{NO}$ é determinada pela capacidade de compostos em prevenir a nitroação de DAF-2 induzida por $\bullet\text{NO}$. A utilização da DAF-2 para detecção de $\bullet\text{NO}$ tem muitas vantagens, incluindo um aumento elevado no rendimento de fluorescência, promovendo um baixo limite de detecção (MAGALHÃES et al., 2008; UHLENHUT; HÖGGER, 2012).

Figura 23 - Esquema da oxidação da 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) e seu produto de reação triazol fluoresceína (DAF-2T).



Fonte: Uhlenhut; Högger (2012).

Os métodos para eliminação do $\text{ROO}\bullet$ utilizam-se de várias técnicas, absorvância, fluorescência, quimiluminescência e detecção de substâncias, por exemplo por cromatografia gasosa. O método mais utilizado para tal espécie é o chamado ORAC (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), que consiste no decaimento da fluorescência ao longo do tempo, devido à oxidação de uma sonda ser retardada ou inibida por antioxidantes. As sondas utilizadas nessa análise são o complexo proteína-pigmento vermelho -ficoeritrina (-PE), o BODIPY 581/591 e a fluoresceína (LÜ et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2008).

Observa-se, então, uma gama de métodos químicos que podem indicar potencial antioxidante de compostos e extratos, esclarecer sobre seus mecanismos de ação e indicar a utilização dos mesmos *in vivo* de forma mais segura e pontual diante do estresse oxidativo/nitrosativo/carbonílico.

2.4 *Curcuma longa*

Dentre as plantas com potencial efeito biológico relacionado aos seus constituintes químicos, destaca-se a *Curcuma longa* Linn. A *C. longa* é erva pertencente à classe *Liliopsida* e família *Zingiberaceae*, cultivada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, amplamente distribuída nos trópicos da Ásia, África e Austrália, sendo a Índia, seu maior produtor, consumidor e exportador. Seu crescimento requer um clima quente e úmido, com temperaturas entre 20 e 30 °C e grandes quantidades de água (ARYA et al., 2015; KRUP; PRAKASH L; A, 2013; PRIYADARSINI, 2014; TRUJILLO et al., 2013; USDA, 2016). Seu nome em latim *Curcuma*, é derivado da palavra árabe, *Kourkoun*, o nome original para o açafrão, assim conhecido popularmente e também no Brasil como açafrão-da-terra (ARYA et al., 2015; TRUJILLO et al., 2013).

Há descrição de estudos com as várias partes da planta: folha, flores e rizoma (Figura 24). Entretanto, a parte do vegetal mais utilizada é o rizoma (Figura 24a), que pode ser consumido fresco ou seco. Para fins de conservação, esse rizoma é descascado, desidratado e moído, gerando um pó de coloração dourada (Figura 24b), utilizado como tempero, agente de coloração e importante ingrediente na medicina tradicional, desde o tempo antigo, em países do sul da Ásia e do Oriente Médio (KUMAR et al., 2016; NAMRATHA et al., 2013; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 24 - Raiz de *C. longa* (a); pó seco e moído extraído de rizoma de *C. longa* (b); flor de *C. longa* (c).



Fonte: imagens cedidas pela Cooperaçafrão; Sueth-Santiago et al. (2015).

C. longa pode ser usada de forma isolada ou em combinação com outros temperos como o *curry*; o pó de *curry* é uma mistura de especiarias que contém basicamente gengibre, pimenta dedo-de-moça, pimenta vermelha, canela em rama, cominho, pimenta-do-reino, cardamomo, cravo, erva-doce, coentro em grãos e açafrão, sendo o açafrão adicionado em torno de 20-30% em relação ao peso total do *curry*. Os ingredientes utilizados são torrados, moídos e usados em dosagens diferentes para preparar o *curry*. Além desses, outros ingredientes podem ser incluídos de acordo com as preferências, como alforva, pimenta-de-caiena, cominhos finos, noz-moscada, pimenta-da-jamaica, pimentão e alecrim, entre outros. Por isso, a composição pode depender de cada região/produtor, porém, a fórmula base onde o açafrão é um dos principais ingredientes, sempre é mantida (BALIGA et al., 2012; NAMRATHA et al., 2013).

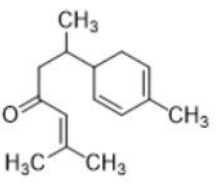
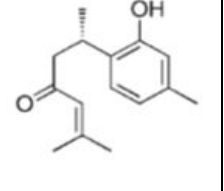
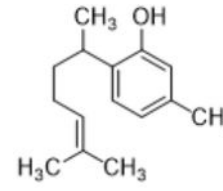
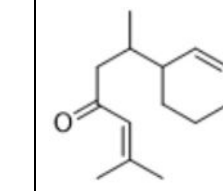
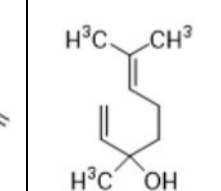
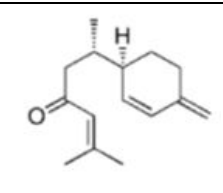
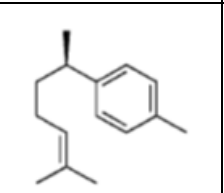
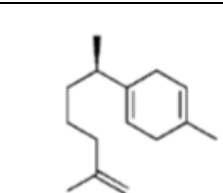
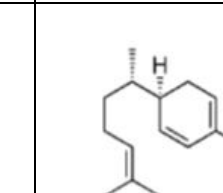
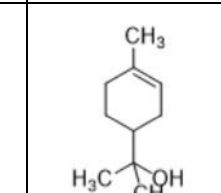
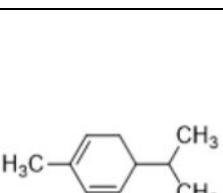
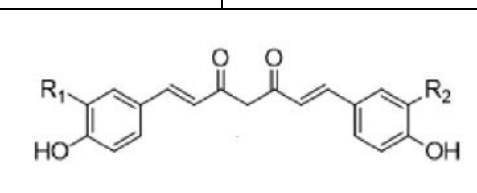
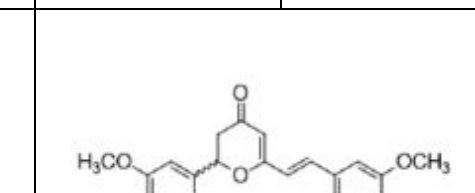
O uso do açafrão na Índia como um remédio popular continua até os dias atuais. Uma pasta de açafrão indicada pelo sistema médico indiano antigo, o *Ayurvedic*, é usada para tratar infecções oculares comuns, cobrir feridas, tratar mordidas, queimaduras, acne e outras doenças de pele. Mulheres recebem um tônico contendo pasta de açafrão fresco para beber após o parto e o cataplasma de açafrão também é aplicado ao períneo para ajudar na cicatrização de quaisquer lacerações do canal, devido ao parto. Ainda é utilizado para curar tosse e infecções respiratórias, doenças dentárias, distúrbios digestivos, como dispepsia e acidez, indigestão, flatulência e úlceras; o açafrão assado é um ingrediente usado como um anti-diarreico para crianças, além de aliviar os efeitos alucinatórios do haxixe e outras drogas psicotrópicas (HATCHER et al., 2008).

2.4.1 Composição da *Curcuma longa*

A *C. longa* contém 60-70% de carboidratos, 8-8,6% de proteína, 5-10% de gordura, 2-7% de fibra e até 5% de óleos essenciais (turmerona, atlantona, e zingiberona) e resinas, além de uma variedade de fitoquímicos, incluindo curcuminoides, como a curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, zingibereno, curcumenol, curcumol, tetra-hidrocurcumina, trietilcurcumina, turmerina, turmeronas e turmeronois (BALIGA et al., 2012; JURENKA, 2009; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013; TRUJILLO et al., 2013). A cor amarela brilhante do açafrão é principalmente associada à curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, pigmentos polifenólicos lipossolúveis (AKRAM et al., 2010). Em geral, o conteúdo de curcuminoides é de 3-5% (50-70% curcumina), mas pode variar entre 2 e 9%, dependendo das condições geográficas. A

composição de curcuminoides é de aproximadamente 70% de curcumina, 17% desmetoxicurcumina, 3% de bisdesmetoxicurcumina e o resto (10%) é chamado ciclocurcumina, recentemente descoberta (Figura 25). No entanto, o último composto tem sido associado com baixa ou nenhuma atividade biológica (STANI, 2017; TRUJILLO et al., 2013).

Figura 25 - Estruturas químicas de fitoquímicos presentes em maior abundância em *C. longa*.

 α -Turmerona	 Ar-Turmerona	 Curcufenol	 Curlona	 Linalol
 β -Turmerona	 α -curcumeno	 β -curcumeno	 Zinzibereno	 Terpineol
 α -felandreno	 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$ Curcumina $R_1 = \text{H}; R_2 = \text{OMe}$ Desmetoxicurcumina $R_1 = R_2 = \text{H}$ Bisdesmetoxicurcumina		 Ciclocurcumina	

Fonte: adaptado de Esatbeyoglu et al. (2012); Sueth-Santiago et al. (2015).

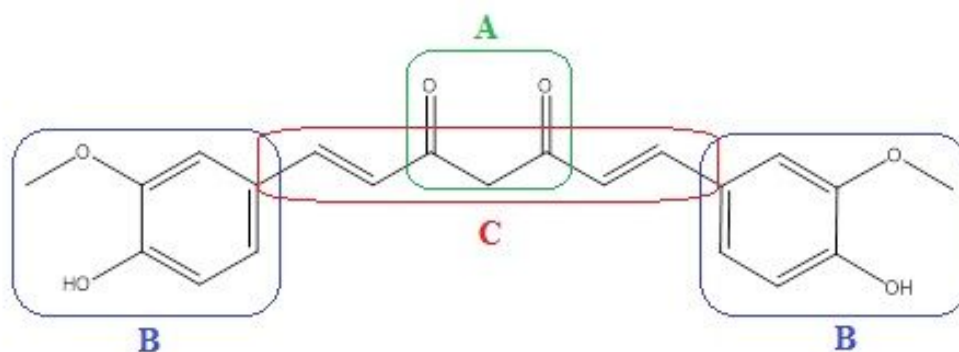
Existem controvérsias sobre a atividade biológica dos curcuminoides, pois poucos estudos atribuem atividade biológica a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013). Grande parte dos estudos realizados indica que o componente mais ativo entre os curcuminoides da *C. longa* é a curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxi-fenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona), sendo este o foco exclusivo em muitos estudos relacionados ao combate do estresse oxidativo (KUMAR et al., 2016). Ela foi isolada pela primeira vez por Vogel em 1815 e sua estrutura foi definida por Milobedzka e

Lampe em 1910; quando isolada, apresenta-se como um pó cristalino cor de laranja-amarelo praticamente insolúvel em água (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; TRUJILLO et al., 2013).

2.4.2 A química de curcuminoides

A curcumina possui três grupos funcionais: uma porção β -dicetona (A), dois grupos fenólicos (B) e duas ligações duplas conjugadas (C) (Figura 26) (HATCHER et al., 2008; NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

Figura 26 - Grupos funcionais na curcumina (A) β -dicetona ou seu tautômero ceto-enol; (B) fenol; (C) ligação dupla conjugada.

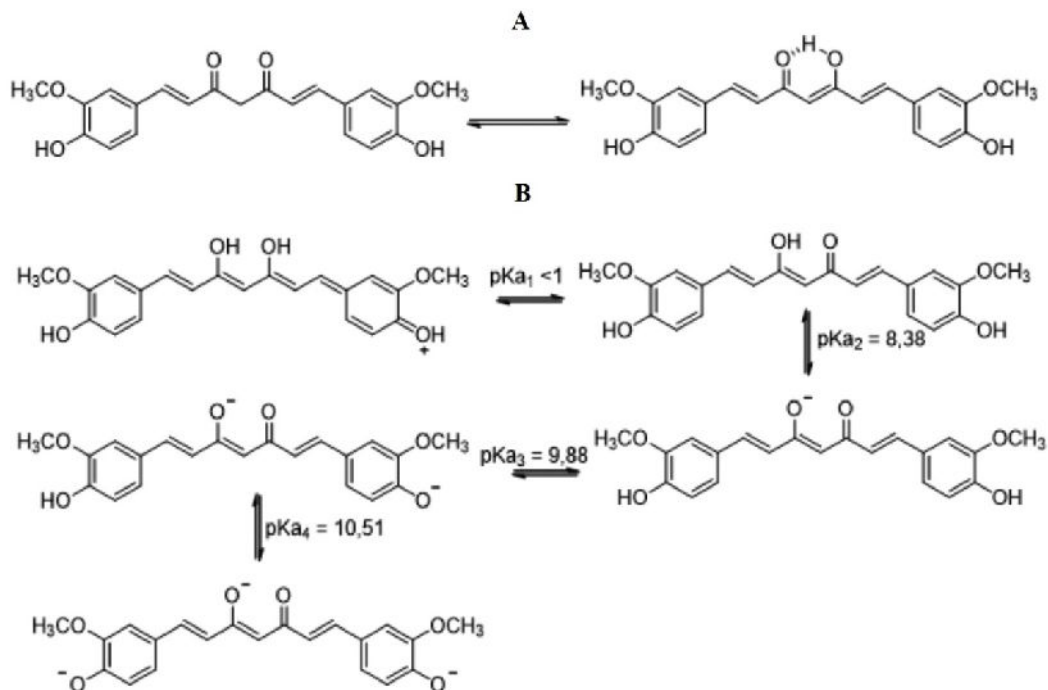


Fonte: adaptado de Hatcher et al. (2008); Sueth-Santiago et al. (2015).

Existe equilíbrio ceto-enólico na porção β -dicetona (Figura 27A). Em geral, em meio aquoso, a curcumina permanece nas formas ceto e enol e normalmente se convertem na forma enol em outros solventes tanto prótico quanto aprótico. Em faixas de pH entre 3 e 7, o equilíbrio ceto-enólico desloca-se, preferencialmente, para o sentido enol, pela presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade da molécula. Entretanto, a curcumina na forma ceto (mesmo em baixa concentração, quando comparada ao enol) possui um metileno bastante deficiente de elétrons em função da vizinhança eletrofílica, o que a torna um ótimo doador de hidrogênio (KIM et al., 2013; MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016; STANI, 2017; SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Essa capacidade doadora de hidrogênio pelo metileno foi indicada ser o mecanismo mais provável para as propriedades antioxidantes da curcumina. Além disso, os dois grupos metoxi e os dois grupos

hidroxila aromáticos podem desempenhar um papel essencial em atividades biológicas atribuídas à curcumina (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; TRUJILLO et al., 2013).

Figura 27 - Equilíbrio ceto-enólico da curcumina (A) e reações de transferência de prótons, com respectivos valores de pKa (B).



Fonte: adaptado de Priyadarsini (2009); Sueth-Santiago et al. (2015).

A curcumina apresenta absorção em um amplo espectro na região UV-visível de 300 a 500 nm, devido à presença de grupos fenólicos, e é fortemente influenciada pelo solvente. Em solvente orgânico, observa-se, geralmente, uma banda larga com máximo de absorvância em ~ 425 nm. Numa geometria planar, a enolização permite a conjugação entre os sistemas de elétrons dos dois cromóforos feruloíla, através do átomo de carbono hibridado sp^2 central, resultando na absorção de luz no visível, sendo visualizada a cor amarela. A excitação eletrônica da transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é responsável pela banda de absorção na faixa visível, e não uma transição $n \rightarrow \pi^*$. O primeiro estado excitado da curcumina é altamente polar devido à transferência de carga intramolecular a partir do anel fenila para a porção carbonila (KIM et al., 2013; VAN NONG et al., 2016).

Sobre a fluorescência, Van Nong et al. (2016) indicaram que ao excitar no comprimento de onda de 425 nm, espectros de extratos de curcuminoides apresentaram emissão ampla entre 528 e 607 nm, indicando que dependendo do extrato e do solvente utilizado na dissolução há bandas em diferentes comprimentos de onda, na faixa citada. Dessa

forma, a curcumina sofre efeito solvatocrômico, pela modificação da polaridade do solvente, por exemplo, sendo esta vermelha em metanol e amarela em diclorometano (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Além da polaridade do solvente, o pH também interfere no λ_{max} da curcumina. A curcumina é um ácido fraco, mas, como visto na Figura 27B, apresenta três funções ácidas instáveis e, conseqüentemente, três valores de pKa estimados correspondentes aos três equilíbrios prototrópicos, sendo o hidrogênio adjacente à carbonila o mais ácido deles (pKa = 8,38). Os hidrogênios fenólicos são menos ácidos como mostra a Figura 27B, entretanto, ainda existe debate sobre qual dos três, isto é, o hidrogênio enólico ou o hidrogênio fenólico é o mais ácido. A dissociação ácida induz a troca de coloração da curcumina de amarela para vermelha. A absorção máxima da curcumina completamente desprotonada (cor vermelha) em pH alcalino (pH > 10) é de 467 nm (PRIYADARSINI, 2014; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina mostra-se sensível à degradação térmica induzida e a variações no pH do meio, além de ser fotodegradável (sensível à luz) e sofrer auto-degradação no escuro. Em solução aquosa, ocorre fotodegradação e auto-degradação no escuro; no meio básico, a auto-degradação é diminuída; já o processo de degradação por aquecimento parece ser independente do solvente e do pH. Sugere-se que a porção β -dicetona na molécula é a função química mais vulnerável, principalmente ao calor. Os produtos resultantes da degradação da curcumina são compostos como vanilina, ácido vanílico, ácido protocatecúico e compostos voláteis (ESATBEYOGLU et al., 2015; MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016).

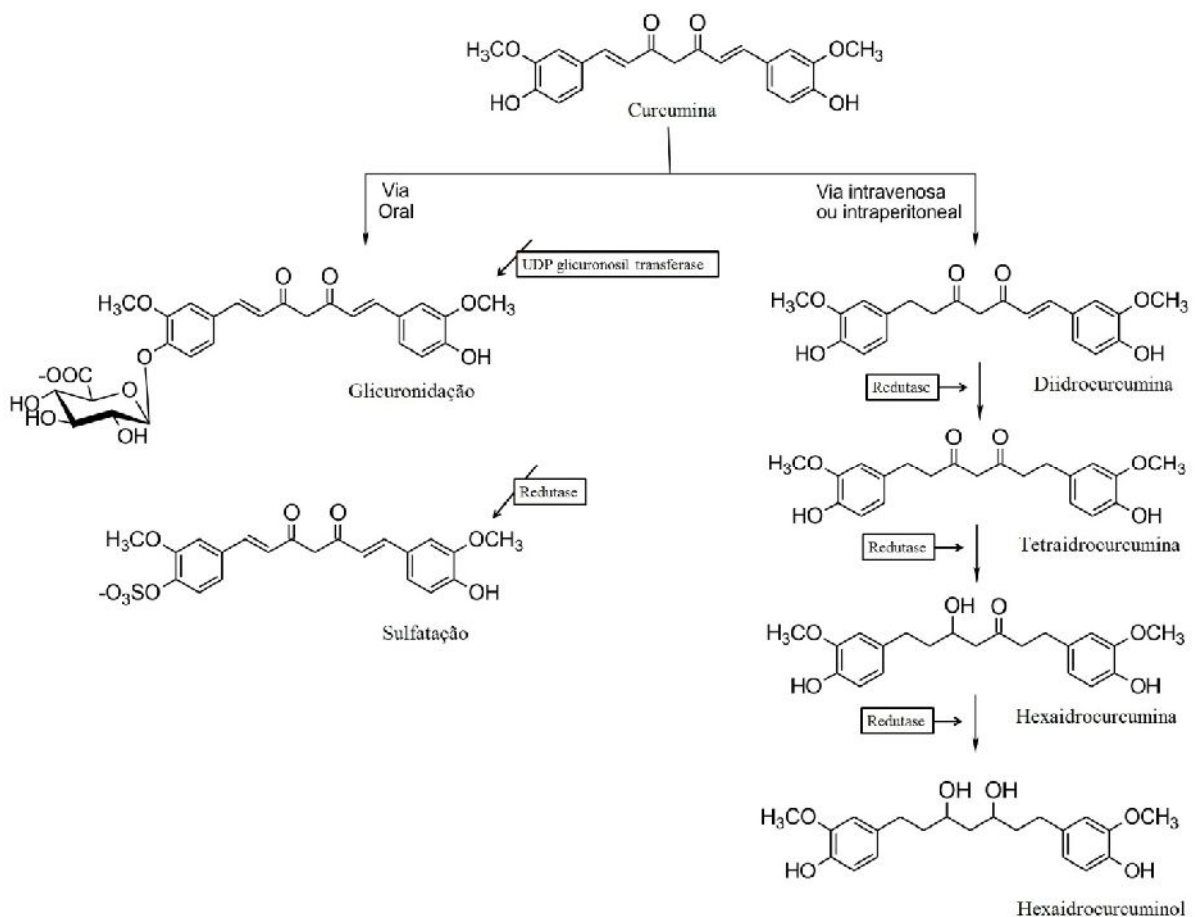
2.4.3 Metabolismo dos curcuminoides

Acumulam-se dados que revelam que a curcumina tem relativa baixa biodisponibilidade e baixa solubilidade em meio aquoso (PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Um dos maiores problemas referentes à sua utilização clínica é relacionado à sua baixa biodisponibilidade. A reduzida solubilidade em meio aquoso faz com que ela seja pouco absorvida, além de ser metabolizada em outros compostos (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina sofre metabolismo em diferentes componentes após administração oral em animais. Ela é submetida à conjugação metabólica, formando os derivados glicuronideo e sulfato de curcumina. Sofre biorredução a tetraidrocurcumina, hexaidrocurcumina e hexaidrocurcuminol (Figura 28), evidenciado em ratos e camundongos *in vivo* e em

suspensões de hepatócitos de humanos e de ratos. A curcumina reduzida também é sujeita a glicuronidação em curcumina glicuronídeo e seus derivados, e um metabólito biliar menor foi o ácido di-hidroferúlico juntamente com vestígios de ácido ferúlico. Então além da baixa solubilidade em meio aquoso, a baixa eficácia relatada por alguns autores da administração da curcumina *in vivo* é agravada pelo fato desses metabólitos serem inativos, no que se refere à maioria das atividades biológicas associadas ao seu uso (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). Entretanto, estudos indicam que alguns metabólitos da curcumina têm ações biológicas importantes, por exemplo, a tetraidrocurcumina inibe a peroxidação lipídica e induz a atividade de enzimas antioxidantes *in vitro* e a hexaidrocurcumina tem capacidade para inibir a expressão de COX-2 (Ciclooxigenase-2), enzima responsável pelos fenômenos da inflamação (ESATBEYOGLU et al., 2015; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Figura 28 - Metabolismo da curcumina.



Fonte: adaptado de Anand et al. (2008); Pulido-Moran et al. (2016); Sueth-Santiago et al. (2015).

Em relação à curcumina administrada na forma injetável, estudos em animais demonstraram que a mesma é rapidamente metabolizada no fígado e intestino e excretada nas fezes, sem excreção urinária. A biodisponibilidade sistêmica é indicada como limitada, porém uma pequena quantidade ainda permanece detectável nos órgãos (JURENKA, 2009; PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014). Sua administração por injeção mostra que além do fígado também é detectada no baço, além de ser captada rapidamente no cérebro e pulmão (PRASAD; TYAGI; AGGARWAL, 2014).

Alguns estudos recentes discutem sobre essa baixa biodisponibilidade, pois mesmo apresentando má absorção, metabolismo rápido e rápida eliminação sistêmica, a curcumina é uma molécula lipofílica que sofre rápida permeação por membranas celulares sendo importante na sua utilização e atividade biológica em nível celular (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013).

Estudos indicam que a *C. longa* e a curcumina são bem toleradas e não tóxicas para animais (2,5 g de pó de *C. longa* ou 300 mg do seu extrato etanólico por kg peso corporal durante 3 semanas), e seres humanos (500 mg de curcumina por dia durante 7 dias) mesmo em doses elevadas (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013; SHANKAR et al., 1980; SONI; KUTTAN, 1992). Qiu et al. (2016), investigaram, especialmente, o efeito de superdosagem de curcumina em ratos (100 mg de curcumina por kg de peso corporal 5 dias por semana durante 90 dias) e indicaram que essa superdosagem e sua administração a longo prazo poderiam iniciar um estado de desequilíbrio no corpo, com a diminuição do peso corporal nos animais e indução de lesão hepática, através do estímulo do estresse oxidativo, distúrbios inflamatórios e distúrbios metabólicos. Contudo, mesmo em altas doses, a curcumina pode desempenhar papéis antioxidante e anti-inflamatório pronunciados na proteção contra lesões hepáticas, dessa forma, indicaram que a administração habitual de curcumina é segura. Ressalta-se, porém, que sua farmacocinética ainda precisa de esclarecimentos adicionais (NOORAFSHAN; ASHKANI-ESFAHANI, 2013), afim de que doses possam ser recomendadas com segurança.

Com exceção da curcumina, o metabolismo dos outros curcuminoides, em termos de absorção, utilização e excreção, é muito pouco explorado. Entretanto pela similaridade estrutural entre elas, pode-se esperar semelhanças metabólicas.

2.4.4 Atividades biológicas de curcuminoides

Como mencionado anteriormente, na medicina tradicional, a *C. longa* e a curcumina foram usadas como medicamento oral e tópico para tratar uma ampla variedade de doenças. Numerosas investigações realizadas nos últimos trinta anos, especialmente na última década, indicam que os efeitos mais perceptíveis são o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral. Adicionalmente, devido à sua capacidade de afetar uma grande gama de alvos moleculares, com um excelente perfil de segurança, a curcumina tem sido avaliada como um candidato potencial para a prevenção e/ou tratamento de um grande número de doenças (HANAI; SUGIMOTO, 2009). O Quadro 4 mostra efeitos atribuídos à curcumina sobre diferentes doenças em diversos sistemas do organismo.

Quadro 4 - Efeitos da curcumina em situações clínicas, em diversos sistemas do organismo.

Sistema	Doenças	Referência	Efeito
Sistema Nervoso	Doença de Alzheimer	Kakkar; Kaur (2011)	Melhora os efeitos adversos do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) envolvido na etiologia do Alzheimer.
	Tumor cerebral	Purkayastha et al. (2009)	Bloqueia a formação de tumores cerebrais e elimina células tumorais pelo bloqueio da proliferação, sobrevivência e invasão das células no cérebro.
		Lim et al. (2011)	Inibe o crescimento de tumor cerebral de linhas derivadas de tumor embrionário e de neurosfera de glioblastoma, pela modulação da proliferação celular pela interrupção nas fases G_2/M e indução apoptótica.
	Doenças neurodegenerativas	Tian et al. (2012)	Diminui a inflamação cerebral e exerce efeito neuroprotetor em doenças neurodegenerativas, por aliviar a hipoperfusão e ao afetar a homeostase do colesterol.
		Liu et al. (2012)	Tem efeito neuroprotetor na lesão cerebral induzida pela isquemia cerebral crônica, pela diminuição do nível de malonaldeído (MDA) e aumento da atividade da SOD.
	Traumatismo craniano	Sharma et al. (2009)	Regula moléculas envolvidas no equilíbrio da crise de energia após a lesão cerebral traumática.
	Isquemia	Shukla et al.	Melhora no desempenho

		(2008)	neurocomportamental, inibição da peroxidação lipídica, aumento na atividade da SOD, e redução na área do enfarte.
	Depressão	Huang et al. (2011)	Efeito antidepressivo em ratos, possivelmente mediado pelo aumento da expressão de BDNF (manutenção dos neurônios).
	Encefalopatia (hepática)	Roselló et al. (2008)	Diminui os danos no hipocampo pelo estresse oxidativo em ratos com encefalopatia hepática de baixo grau.
Sistema Respiratório	Câncer de pulmão	Alexandrow et al. (2012)	Reduz a capacidade proliferativa do adenocarcinoma de pulmão.
		Lin et al. (2009)	Suprime a migração e invasão de células de câncer de pulmão, pela inibição de metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e MMP-9), proteinases que atuam na invasão, metástase e angiogênese de células cancerosas.
	Doenças inflamatórias do pulmão	Lüer et al. (2011)	Tem efeito antibacteriano no trato respiratório superior, inibindo o crescimento bacteriano, a adesão, a invasão e a ativação pró-inflamatória das células epiteliais.
Sistema Cardiovascular	Cardiomiopatia (ex: cardiomiopatia diabética)	Farhangkhoe et al. (2006)	Regula os níveis de eNOS e iNOS, diminuindo o estresse oxidativo, causado pela diabetes que causa cardiomiopatia.
	Hipertrofia e insuficiência cardíaca	Morimoto et al. (2008)	Previne a deterioração da função sistólica e os aumentos induzidos pela insuficiência cardíaca na espessura e diâmetro da parede do miocárdio.
Sistema Urinário	Fibrose tubular renal	Li; Chen; Li (2011)	Atenua a fibrose tubulo-intersticial.
	Lesão oxidativa nos rins	Yousef et al. (2010)	Útil na inversão da toxicidade do paracetamol, pela restauração das atividades das enzimas antioxidantes.
Sistema Reprodutor feminino e masculino	Danos oxidativos induzidos por toxinas (ex.: medicamentos, aflatoxina, pesticidas)	Noorafshan et al. (2011)	Melhora os parâmetros estruturais dos túbulos seminíferos e o número de células de Leydig (produz testosterona) nos testículos, alterados pelo metronidazol.
		Farombi et al. (2007)	Recupera as lesões induzidas por di-n-butilftalato em parâmetros bioquímicos, espermatoológicos e estrutura histológica do testículo.
		Mathuria; Verma (2008)	Melhora a contagem de espermatozoides, a imobilização e viabilidade, e as características

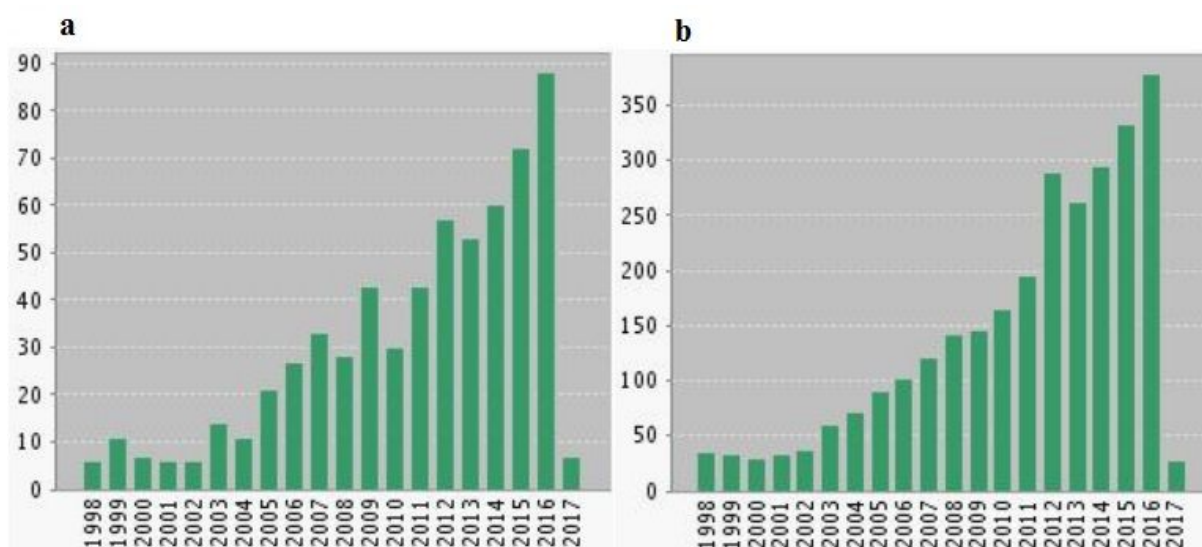
			morfológicas dos espermatozoides em proteção a aflatoxina.	
		Giannessi et al. (2008)	Protege contra os danos causados nas células de Leydig nos testículos pela ingestão crônica de álcool: preserva a estrutura mitocondrial e o tamanho das células.	
		Madhavi; Kumar (2010)	Restaura os parâmetros para o estado normal, em ratos com toxicidade reprodutiva, pelo inseticida clorpirifos.	
	Tumores do sistema reprodutor	Hong et al. (2006)	Reduz o volume do tumor, da atividade de metaloproteinases (importantes na progressão tumoral) e dos nódulos metastáticos em câncer da próstata.	
		Zheng; Tong; Wu (2004)	Inibe o crescimento de células cancerosas e induz apoptose de células de câncer do ovário.	
		Singh; Singh (2011)	Capaz de impedir a resposta proliferativa do estradiol e induzir apoptose, em câncer de colo do útero.	
	Inflamação prostática	Nonn; Duong; Peehl (2007)	Diminui as alterações pró-inflamatórias induzidas por citocinas em células epiteliais prostáticas normais.	
	Sistema digestório e hepato-biliar	Tumores	Farombi et al. (2008)	Protege contra a hepatotoxicidade induzida por dimetilnitrosamina, pela indução de heme oxigenase-1 (enzima antioxidante).
			Wang et al. (2009)	Capaz de regular a fosfatase PRL-3, envolvida em metástases tumorais.
Fibrose hepática		Bruck et al. (2007)	Inibe o desenvolvimento de cirrose hepática induzida pela tioacetamida.	
Doença inflamatória intestinal (doença de crohn, colite ulcerativa)		Zhao et al. (2016)	Suprime a ativação de células dendríticas, envolvidas na patogênese da doença inflamatória intestinal e, restaura o equilíbrio imunológico no tratamento da colite experimental.	
		Holt; Katz; Kirshoff (2005)	Diminui o índice de atividade da doença de Crohn (CDAI) e taxas de sedimentação de eritrócitos na doença de Crohn.	
Lesões hepáticas		Yousef et al. (2010)	Restaura as atividades das enzimas antioxidantes, proteção da histologia do fígado e normalização das funções do fígado por toxicidade do	

			paracetamol.
		Yousef; El-Demerdash; Radwan (2008)	Protege as alterações bioquímicas no fígado, induzidas por arsenito de sódio em ratos.
		Messner; Sivam; Kowdley (2009)	Reduz o estresse oxidativo dependente do ferro e a toxicidade do ferro em células epiteliais de fígado sem bloquear a captação de ferro.
Sistema músculo-esquelético	Doenças inflamatórias (ex.: osteoartrite)	Lev-Ari (2005)	Inibe a atividade da ciclo-oxigenase-2 (COX-2), enzima pró-inflamatória, em células sinoviais de osteoartrite.
	Danos isquêmicos	Avci et al. (2012)	Protege contra a lesão de isquemia do músculo esquelético na redução de citocinas pró-inflamatórias, com maior atividade antioxidante.
	Resistência à insulina	Na et al. (2011)	Melhora a resistência à insulina muscular aumentando a oxidação do ácido graxo e da glicose.
Doenças da pele	Câncer de pele	Jee et al. (1998)	Induz a apoptose em células de carcinoma de células basais humanas, indicação na prevenção ou terapia do câncer de pele.
	Ferimento da pele	Bhagavathula et al. (2009)	Provoca cicatrização rápida e produção de colágeno na pele em lesões superficiais por escoriação.
	Lesão cutânea oxidativa	Jagetia; Rajanikant (2012)	Acelera a cicatrização da ferida por excisão profunda com irradiação.
Sistema Endócrino	Diabetes	Mahesh; Sri Balasubasshini; Menon (2004)	Diminui os níveis de glicose no sangue e normalização dos marcadores de peroxidação lipídica.
		Suryanarayana et al. (2007)	Controla o estresse oxidativo, inibindo o aumento de TBARS e a carbonilação de proteínas e inverte atividades de enzimas antioxidantes alteradas por estreptozotocina (STZ).
		Sharma; Kulkarni; Chopra (2006)	Atenua significativamente a disfunção renal e o estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por STZ.
		Farhangkhomee et al. (2006)	Reduz os níveis de eNOS e iNOS em associação com a redução de dano oxidativo ao DNA e às proteínas.

Particularmente, em relação à atividade antioxidante de *C. longa*, no banco de dados *Web of Science*, 651 artigos foram publicados, desde 1998 até março de 2017 (Figura 29a).

Para a curcumina, especificamente, foram encontrados 2937 itens relacionados à atividade antioxidante (Figura 29b). O aumento de publicações iniciou-se em 2003, chegando a mais de 350 publicações para a curcumina, no ano de 2016, enquanto que para a *C. longa*, nesse mesmo ano, cerca de 90 artigos foram publicados relacionados à atividade antioxidante.

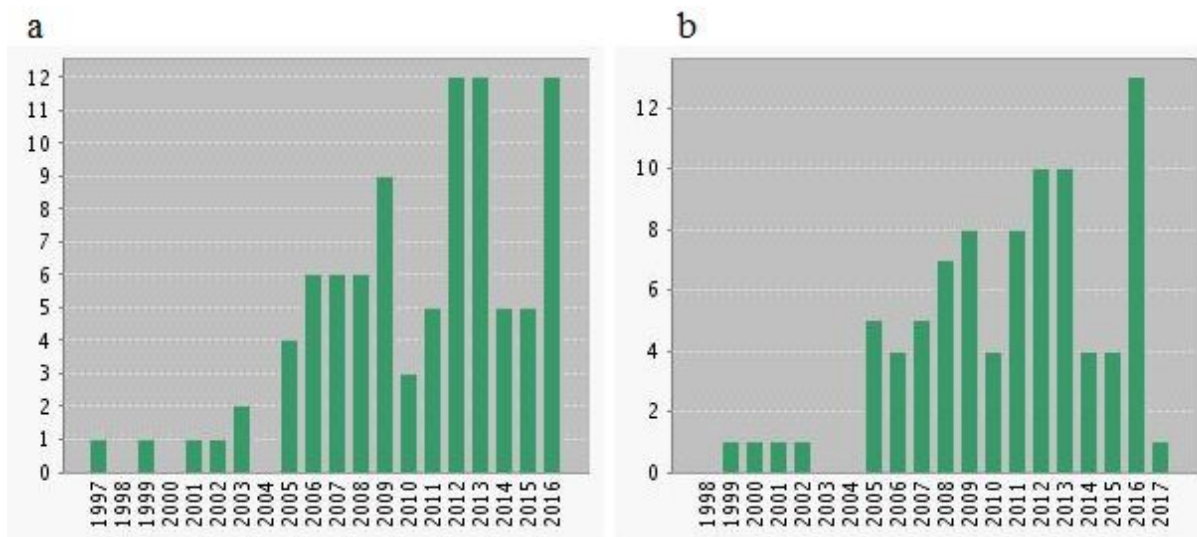
Figura 29 - Número de publicações para atividade antioxidante para a *C. longa* (a) e para a curcumina (b) pelo *Web of Science*, no período de 1998 a 2017.



Fonte: Reuters (2017).

Entretanto quando se trata de publicações relacionadas aos outros curcuminoides comumente encontrados no rizoma, os números caem drasticamente. Para a desmetoxicurcumina, no mesmo período, nos últimos 20 anos, foram encontrados apenas 94 artigos relacionados à capacidade antioxidante e 90 artigos para a bisdesmetoxicurcumina (Figura 30). Os estudos encontrados nas bases de dados são realizados com extratos, onde há apenas suposição de atividade relacionada aos três curcuminoides e são incluídos a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina, sem estabelecer uma atividade direta e específica para cada um deles, e outros estudos que são de fato realizados com os compostos isolados, geralmente são conduzidos com radicais não biológicos ou dosagem de atividade de enzimas antioxidantes e marcadores biológicos e inflamatórios relacionando a atividade antioxidante dos mesmos com os dados obtidos, mas não estudos que utilizem a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina como sequestradores diretos de EROs e ERNs.

Figura 30 - Número de publicações para atividade antioxidante para a desmetoxicurcumina (a) e para a bisdesmetoxicurcumina (b) pelo *Web of Science*, no período de 1997 a 2017.



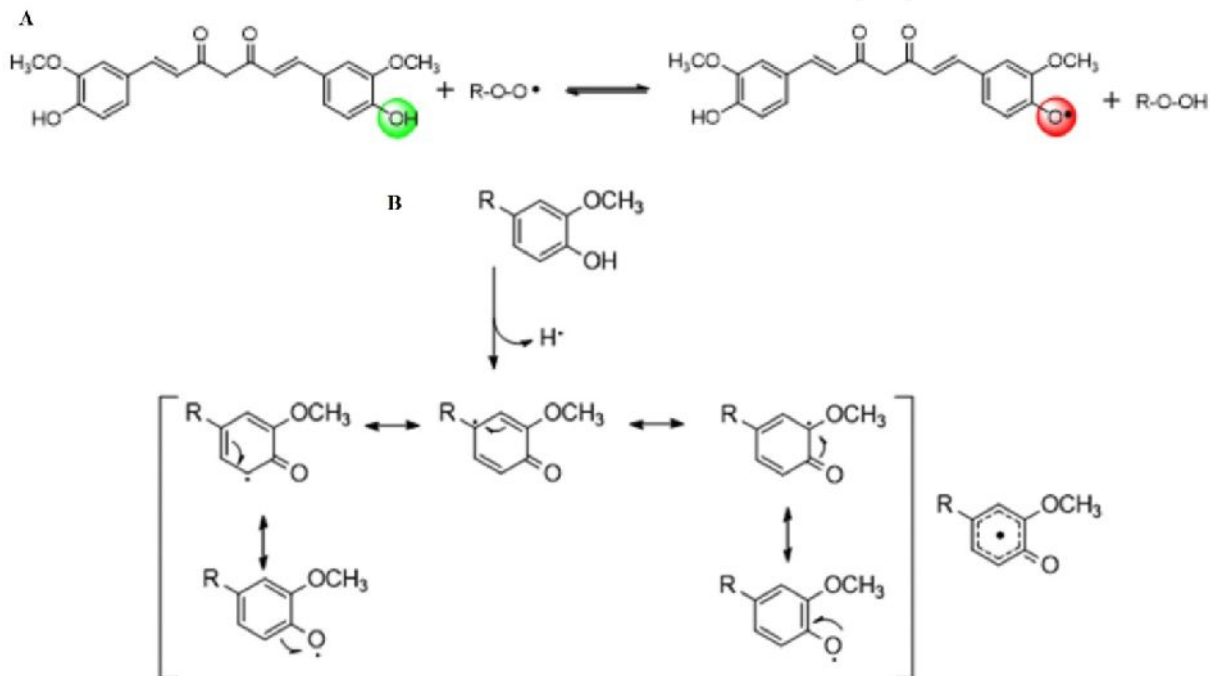
Fonte: Reuters (2017).

A curcumina tem capacidade de reduzir o estresse oxidativo. A versátil estrutura química da curcumina permite que a molécula interaja com um grande número de moléculas dentro da célula, levando a uma variedade de efeitos biológicos, mencionados acima, e a inibição da produção de espécies reativas. A falta de toxicidade e efeitos secundários, bem como a sua disponibilidade em grandes quantidades como um produto natural, são vantagens adicionais na aplicação deste agente para a prevenção e tratamento de uma variedade de doenças relacionadas ao desbalanço redox (STANI , 2017).

O mecanismo antioxidante pode envolver uma ou mais das seguintes interações: eliminação ou neutralização de espécies reativas, inibição de enzimas oxidativas, interação com oxigênio, tornando-o menos disponível para reações oxidativas, interação com a cascata oxidativa, com inibição de sua propagação, quelação ou desativação de propriedades oxidativas de íons metálicos, como o ferro (NAMRATHA et al., 2013).

A atividade antioxidante básica da curcumina depende diretamente da presença das duas subunidades estruturais, as hidroxilas dos grupos fenólicos e o grupo metileno central (Figura 31 e 32). Em ambos os casos, a atividade antioxidante está relacionada à doação de hidrogênio radicalar. Na subunidade fenol, os hidrogênios do fenol estão completamente disponíveis, para a formação de radicais fenoxila, ocorrendo a estabilização dos mesmos, por ressonância no anel aromático (Figura 31) (STANI , 2017; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 31 - Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar pelo fenol (A) e estabilização do radical formado, por ressonância no anel aromático (B).



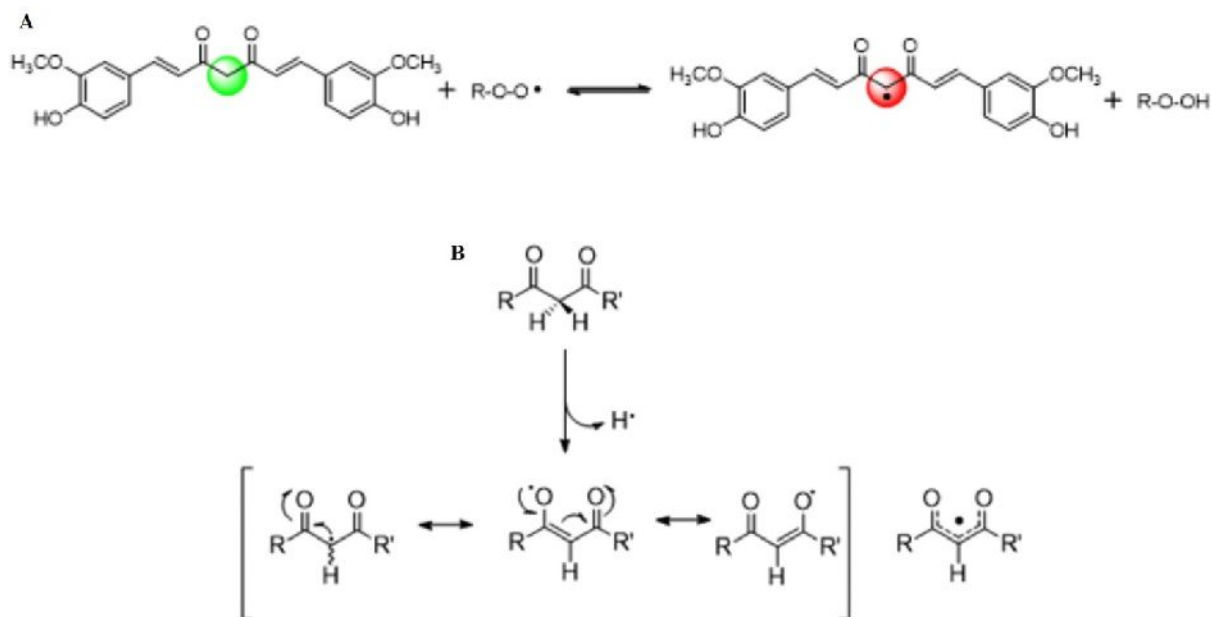
Fonte: adaptado de Sueth-Santiago et al. (2015).

Por reações semelhantes, um radical centrado em carbono origina-se do grupo metileno central da curcumina (Figura 32). Propõe-se que o grupo CH_2 α -dicarbonílico seja o sítio de reação, visto que as ligações CH neste carbono são mais fracas devido à ressonância (STANI, 2017).

A estabilidade do radical fenoxila é maior que a do radical carbônico, porém estudos indicam que a dissociação do hidrogênio do grupo metileno também contribui para a atividade antioxidante da curcumina. Dessa forma, a curcumina é vista como um poderoso antioxidante natural capaz de combater diferentes EROs e ERNs, como o $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 , $HO\cdot$, $ROO\cdot$, H_2O_2 , $ONOO^-$ (PRIYADARSINI, 2014; STANI, 2017).

Em relação à quelação ou desativação de propriedades oxidativas de íons metálicos, estudos *in vitro* indicam que a região A, a β -dicetona ou o grupo ceto-enol (Figura 23), são reconhecidos como complexantes de íons metálicos, como Mn^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ e Cu^{2+} , tendo alguma estabilidade cinética ou termodinâmica em meios polares e/ou próticos, e propõe-se que tais interações sejam biologicamente significativas *in vivo* (HATCHER et al., 2008).

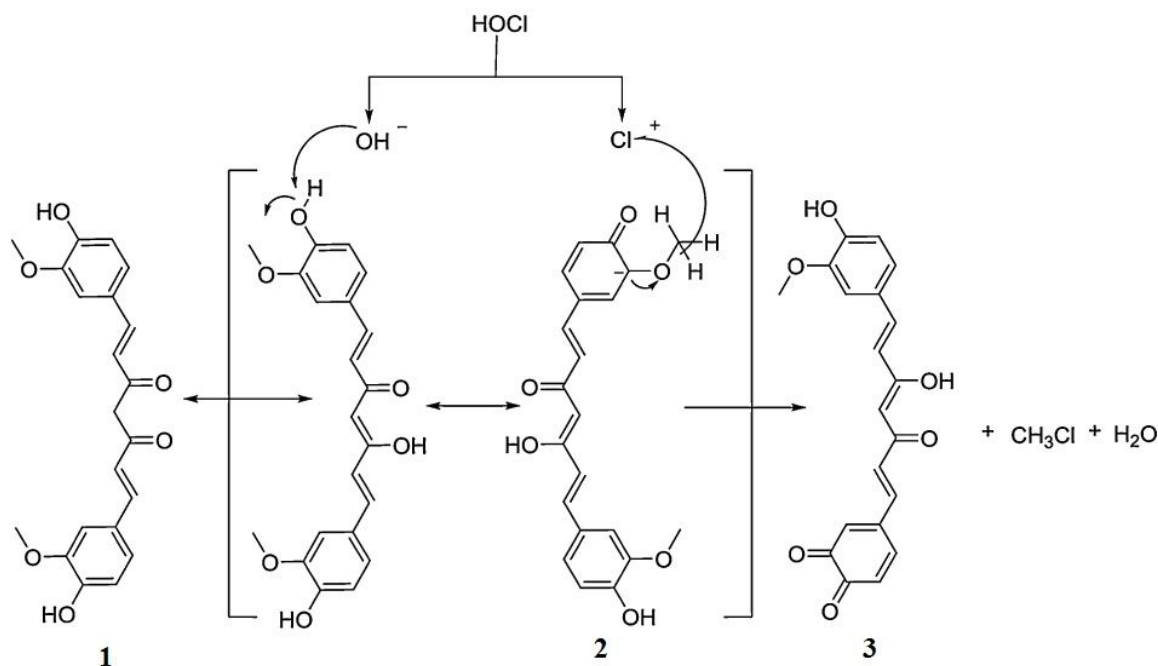
Figura 32 - Mecanismo antioxidante da curcumina, envolvendo a doação de hidrogênio radicalar no metileno (A) e estabilização do radical formado (B).



Fonte: adaptado de Sueth-Santiago et al. (2015).

Em relação à atividade da curcumina diante do HOCl, Yue et al. (2014) propuseram um mecanismo além dos citados, onde há envolvimento das metoxilas e das hidroxilas fenólicas, conforme mostra a Figura 33. Quando a curcumina (composto 1) interage com HOCl, a hidroxila de HOCl ataca primeiro o grupo hidroxila do fenol, com formação do intermediário 2, estabilizado por ressonância. Este processo fornece um centro eletronegativo para o ataque eletrofílico do cátion cloreto, a metila, para formar o intermediário 3, produzindo cloreto de metila (CH₃Cl). No final do processo, a curcumina é oxidada a uma quinona estável.

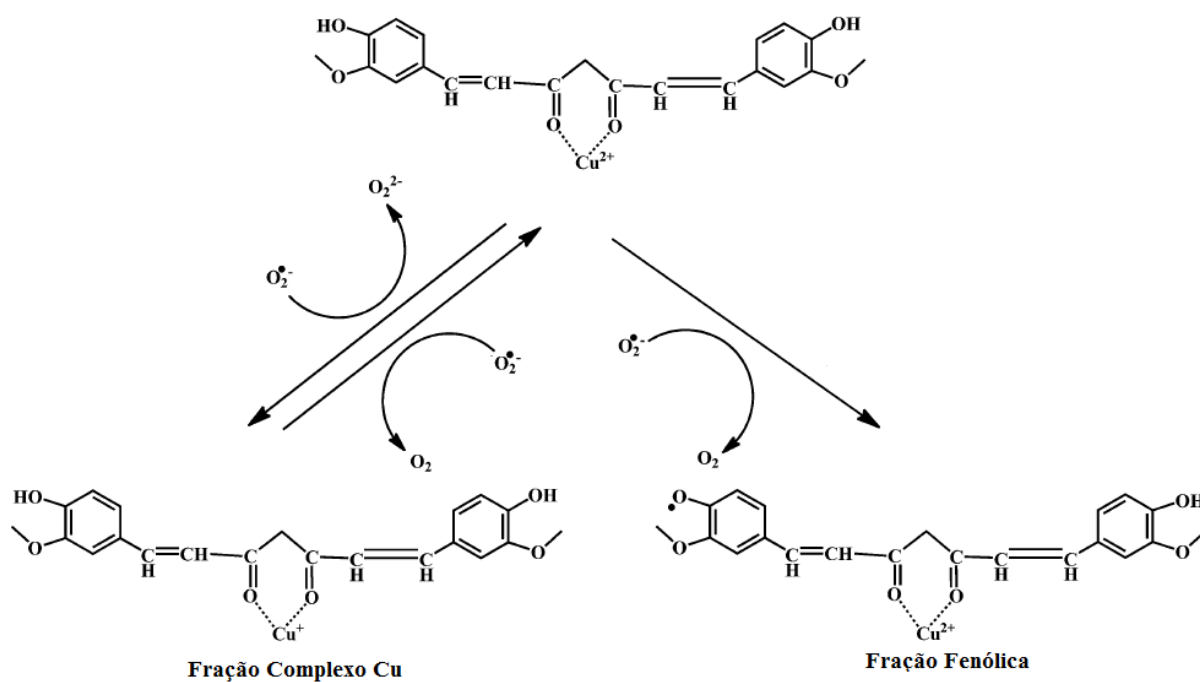
Figura 33 - Mecanismo proposto para a eliminação de HOCl pela curcumina.



Fonte: Yue et al. (2014).

Além dos mecanismos propostos para atividade antioxidante da curcumina abordados anteriormente, Barik et al. (2005) verificaram sua ação complexante de Cu^{2+} , formando o complexo (curcumina- Cu^{2+}), verificando que o mesmo apresenta atividade promissora, com melhor eficácia antioxidante. O mecanismo de eliminação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ é exemplificado na Figura 34, a partir do complexo curcumina- Cu^{2+} sendo possível realizar o papel da SOD no processo de eliminação desse radical. Quando o $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com o complexo de curcumina- Cu^{2+} , o $\text{O}_2^{\bullet-}$ reage com a porção de Cu^{2+} , enquanto que apenas uma pequena fração reage com a curcumina. A reação provoca a redução de Cu^{2+} em Cu^+ . O Cu^+ sofre oxidação subsequente por outra molécula de $\text{O}_2^{\bullet-}$, regenerando assim o complexo de origem.

Figura 34 - Mecanismo de atividade de eliminação de $O_2^{\bullet-}$, do complexo curcumina- Cu^{2+} .



Fonte: Barik et al. (2005).

Apesar da curcumina ser o componente principal da *C. longa*, como abordado também são identificados no rizoma outros curcuminoides, como desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, cujas propriedades benéficas não podem ser negligenciadas.

Este trabalho visa explorar a atividade antioxidante de extratos de *C. longa* e dos curcuminoides isolados: curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, para entender se a atividade antioxidante contra as EROs e ERNs é devido à ação de apenas um curcuminóide particular ou à ação agonista da mistura dos curcuminoides no extrato de *C. longa*.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a capacidade antioxidante de extratos de *C. longa* e determinar seus curcuminoides constituintes, investigando a ação antioxidante do extrato e dos curcuminoides isolados contra EROs e ERNs.

3.2 Específicos

- Avaliar as condições microbiológicas do pó da *C. longa*;
- Preparar extratos a partir de uma série de solventes e determinar o método de extração mais eficiente na extração de compostos fenólicos de *C. longa*;
- Identificar e quantificar os curcuminoides presentes nos extratos de *C. longa*;
- Determinar o conteúdo total de fenóis nos extratos de *C. longa*;
- Verificar a atividade antioxidante frente a radicais não biológicos dos extratos de *C. longa*;
- Averiguar o potencial antioxidante frente ao radical DPPH[•] dos extratos de *C. longa*, utilizando CLAE para verificar os compostos com maior capacidade antioxidante frente ao radical;
- Comparar a capacidade antioxidante frente ao DPPH[•] da curcumina, em comparação com as principais substâncias utilizadas como padrões em métodos de capacidade antioxidante;
- Verificar o potencial sequestrador de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) do extrato etanólico de *C. longa* e dos curcuminoides identificados e isolados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados nas análises efetuadas estão listados no Quadro 5 com as respectivas descrições e funções.

Quadro 5 - Lista de equipamentos, suas descrições e funções.

Equipamento	Descrição	Análise
Espectrofotômetro UV-Vis (G1103A, Agilent 8453)	-	Conteúdo total de fenóis (CTF)
		Método DPPH [•]
		Método FRAP
CLAE Shimadzu (VP series, Kyoto)	Sistema controlador (CBM-20A) Bomba (LC-20AT vp) Forno de coluna (CTO-20A /C) Coluna Shimadzu VP-ODS c18 (250 L x 4,6 mm) Detector UV/VIS (SPD-M20A) Software (LC-solution)	Identificação e quantificação dos curcuminoides
		DPPH [•] -CLAE-UV
Leitor de microplaca (Synergy HT, BIO-TEK)	Detecção: - espectrofotométrica - fluorimétrica - quimiluminométrica	Ensaio de eliminação de EROs
		Ensaio de eliminação de ERNs

4.2 Materiais

Todos os produtos químicos e reagentes utilizados eram de grau analítico. Reagente de Folin-Ciocalteu, radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), acetato de sódio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico (Trolox), curcumina, desmetoxicurcumina, bisdesmetoxicurcumina, quercetina, ácido cafeico, 3,5-di-*tert*-4-butil-hidroxitolueno (BHT), ácido ascórbico, di-hidrorodamina 123 (DHR), solução de hipoclorito de sódio, 3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno (NOC-5), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), metassulfato de fenazina (PMS), cloreto de tetrazólio-nitrozul (NBT), bicarbonato de sódio, histidina, lucigenina foram obtidos da Sigma Aldrich (Missouri, EUA).

A 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), o peróxido de hidrogênio a 30% e o filtro de seringa com membrana com poro de 0,45 µm foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Etanol, metanol e acetonitrila para CLAE foram obtidos da Panreac Applichem

(Missouri, EUA). Ácido gálico e cloreto férrico da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, Brasil). Carbonato de sódio da Reagen - Quimibras Indústrias Químicas S/A (Rio de Janeiro, Brasil). Ácido clorídrico da Dinâmica Contemporânea LTDA (São Paulo, Brasil). O ácido acético da Labsynth (São Paulo, Brasil).

O 3,3'-(1,4-naftaleno)bispropionato de sódio (NDPO₂) e o peroxinitrito (ONOO) foram previamente sintetizados pelos grupos da Universidade de Aveiro (Aveiro, Portugal) e da Universidade do Porto (Porto, Portugal), respectivamente (COSTA et al., 2007; GOMES et al., 2007).

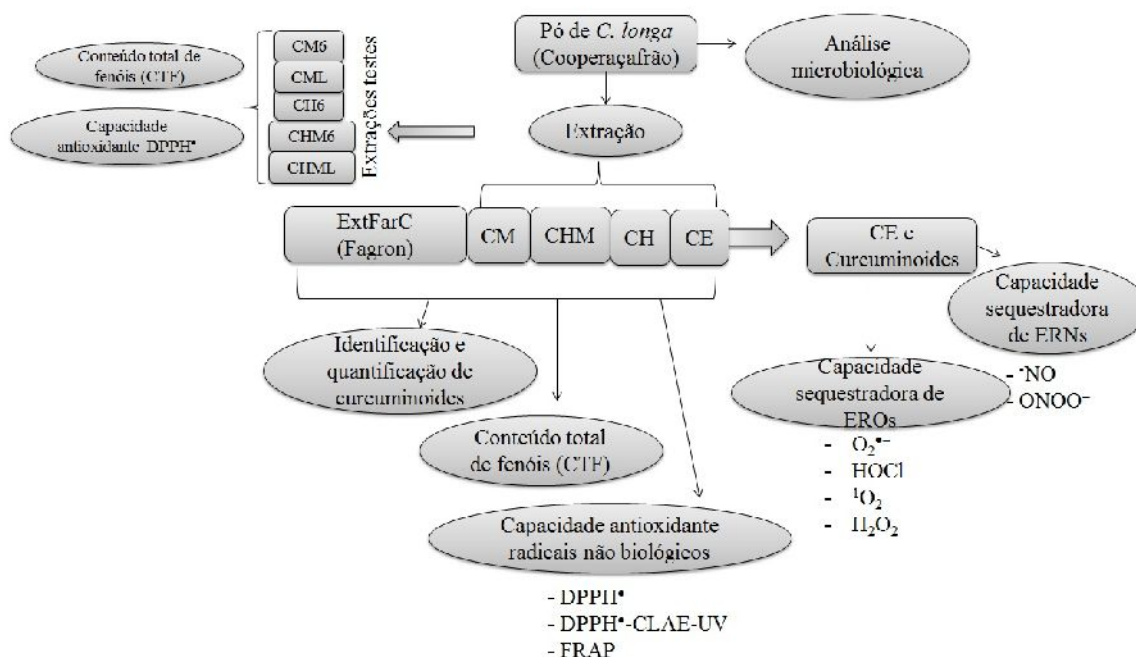
O pó de *C. longa* (açafão-da-terra) foi adquirido em março de 2015, da Cooperativa dos Produtores de Açafão de Mara Rosa – Cooperaçafão (Av. Joaquim Gonçalves, nº 1, Centro, Mara Rosa – GO, Brasil, Tel.: (62) 33662045, e-mail: cooperacafrão@gmail.com) e o extrato farmacêutico (ExtFarC) foi obtido em abril de 2015, da Fagron Brasil (Av. Engenheiro Luís Carlos Berrini, 105 - Edifício Berrini One, São Paulo – SP, Brasil, Tel.: (11) 20502300, e-mail: contato@fagron.com.br) (ver Anexo A).

As vidrarias utilizadas foram de uso exclusivo, sendo lavadas com água deionizada e etanol, antes e após a sua utilização.

4.3 Métodos

Foi realizada análise microbiológica de *C. longa* afim de verificar as condições sanitárias e a integridade dos nutrientes no alimento. A partir do pó foram realizadas extrações com diferentes solventes, e para os extratos obtidos, juntamente com o ExtFarC, foram realizadas identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE, verificação do conteúdo total de fenóis, capacidade antioxidante frente a radicais não biológicos e capacidade sequestradora de EROs e ERNs. A Figura 35 esquematiza as etapas das análises realizadas e descritas a seguir.

Figura 35 - Esquema ilustrando as etapas de extração e análises realizadas na identificação de compostos e obtenção da capacidade antioxidante.



4.3.1 Análise microbiológica do pó de *Curcuma longa*

As análises microbiológicas do pó de *C. longa* foram realizadas no Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, sob orientação da Profa. Dra. Maria Cristina Delgado da Silva.

O pó de *C. longa* foi submetido à análise microbiológica, conforme descrito pela legislação Brasileira. De acordo com a Resolução - RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para temperos em pó, deve-se verificar a contagem de coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella*. A análise foi realizada conforme Silva et al. (2010) e MAPA (2003), resumida a seguir: 25 mg de pó foram transferidos para um erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada, sendo preparada uma diluição correspondente a 1:10 (m/v), a partir da qual foram elaboradas as diluições 1:100 (m/v) e 1:1000 (m/v). Para a contagem de coliformes totais e termotolerantes foi utilizada a técnica clássica do Número Mais Provável (NMP), que permite estimar a densidade de microrganismos viáveis presentes em uma amostra sob análise, utilizando os caldos lauril sulfato triptose, verde brilhante e *Escherichia coli* (EC). A partir das diluições obtidas, foram pipetadas alíquotas de 1 mL das respectivas diluições para uma série de três tubos contendo 9 mL do caldo lauril sulfato triptose, contendo o tubo de Durham invertido, homogeneizando e incubando os tubos a 36 °C

por 24 h. Transcorrido este tempo e observada a produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham), tomaram-se todos os tubos com produção de gás e foi transferida uma alçada de cada cultura para tubos de caldo verde brilhante 2% (VB). Incubou-se a 36 °C por 24 h e, observado o crescimento com produção de gás, foi novamente transferida uma alçada dos tubos positivos para o caldo EC incubando-se a 45 °C, por 48 h. Foi registrado o número de tubos positivos com gás e determinado o NMP/g em um quadro de NMP apropriada às diluições inoculadas (ver Anexo B). O resultado foi expresso em NMP de coliformes/g.

Para verificar a ausência ou presença de *Salmonella* spp., a amostra contida na água peptonada foi incubada a 36 °C por 24 h. Em seguida, estas amostras foram transferidas para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo, 0,1 mL para 10 mL de Rappaport-Vassiliadis e 1 mL para 10 mL de Selenita Cistina, incubados a 41,5 e 37 °C por 24 horas, respectivamente. Cada amostra foi semeada em placas de Petri com Ágar Xilose lisina (XLD) e Ágar Bismuto Sulfito (BS) que foram incubados a 37 e 41 °C por 24 h, respectivamente.

4.3.2 Preparação dos extratos do pó de *Curcuma longa*

Os extratos do pó de *C. longa*, de cor amarela, foram preparados por meio da técnica de extração em aparelho do tipo Soxhlet como descrito por De Oliveira et al. (2009), com modificações. Vários pacotes de 100 g adquiridos da Cooperaçafrão foram abertos, misturados mecanicamente e, dessa mistura, foram retiradas as respectivas massas.

Inicialmente, foram realizadas extrações-teste para definir o melhor tempo de extração, sendo comparadas extrações por 6 horas e por tempo adequado até a amostra tornar-se límpida. A extração foi feita utilizando solvente apolar (hexano) e solvente polar (metanol), em sequência. Foram pesados 20 g de pó de *C. longa*, colocados em um cartucho poroso apropriado de celulose na câmara do extrator de Soxhlet. Em seguida, foram medidos 150 mL de hexano e colocados em um balão de fundo redondo, que foi acoplado ao extrator. A extração foi seguida por 6 h, a 68 °C. O material extraído foi colocado em um rota-evaporador (Buchi) a 68 °C, para eliminação do solvente; o extrato foi então transferido para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração, dando origem ao extrato hexânico de *C. longa* (CH6). Este mesmo procedimento foi repetido, utilizando o mesmo cartucho utilizado para a extração com hexano, fazendo-se uso do metanol a 64,7 °C por 6 h, dando origem ao extrato metanólico de *C. longa* (CHM6), após adequada destilação do solvente. Em procedimento semelhante, utilizando outra amostra de *C. longa*, foi realizada extração, por tempo adequado para que a amostra se tornasse límpida no cartucho poroso, utilizando hexano, inicialmente

por 6 h e, em seguida, metanol no mesmo cartucho dando origem ao extrato CHML no final do procedimento. O procedimento de extração foi repetido realizando-se a extração apenas com metanol, seguindo o mesmo procedimento, em temperatura de ebulição do metanol (64,7 °C), por 6 h e até que a amostra se tornasse límpida, dando origem aos extratos metanólicos de *C. longa*, CM6 e CML. Análises do teor de compostos fenólicos e capacidade antioxidante frente ao radical DPPH• foram realizadas, afim de definir o melhor tempo de extração (Figura 32).

Em seguida, após definição do tempo de extração, as extrações definitivas foram feitas utilizando solvente apolar (hexano) e solventes polares: metanol e etanol. O procedimento de extração foi realizado da mesma forma como anteriormente descrito, utilizando-se 6 h de extração. Foram pesados 20 g de pó de *C. longa*, colocados em um cartucho poroso apropriado de celulose, na câmara do extrator de Soxhlet. Em seguida, foram medidos 150 mL de hexano e colocados em um balão de fundo redondo, que foi acoplado ao extrator. A extração foi seguida por 6 h, a 68 °C. O material extraído foi colocado em um rota-evaporador (Buchi) a 68 °C, para eliminação do solvente; o extrato foi então transferido para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração, levando ao extrato hexânico de *C. longa* (CH). Esse procedimento foi repetido, utilizando o mesmo cartucho utilizado para a extração com hexano, fazendo-se uso do metanol a 64,7 °C por 6 h, dando origem ao extrato metanólico de *C. longa* (CHM). Da mesma forma obteve-se o extrato metanólico (CM), seguindo-se o mesmo procedimento, utilizando-se outra amostra com a mesma quantidade e mesmo volume de solvente, porém, sem utilizar a etapa hexânica. O extrato etanólico foi obtido da mesma forma, utilizando-se apenas etanol, em refluxo, no processo de extração, na temperatura de ebulição do etanol, a 78,4 °C (CE). Os extratos obtidos, juntamente com o extrato farmacêutico (ExtFarC), adquirido da Fagron, foram utilizados para as análises seguintes.

4.3.3 Análise dos espectros de absorção dos extratos de *Curcuma longa*

A obtenção dos espectros de absorção molecular dos extratos de *C. longa* e a curcumina foi realizada com as soluções metanólicas dos extratos CM, CHM, CH e CE com concentração de 25 µg/mL, do ExtFarC com concentração de 12,5 µg/mL e da curcumina de 5,18 µg/mL, e o espectro de absorção na região UV-Vis das amostras foi obtido a partir de varredura na faixa de 200 a 600 nm, utilizando cubeta de quartzo (capacidade = 3 mL; caminho óptico = 1 cm) em espectrofotômetro.

4.3.4 Identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE-UV dos extratos de *Curcuma longa*

As condições cromatográficas, em CLAE, foram adaptadas de (MALASONI; SRIVASTAVA, 2013). Foi utilizado uma coluna de fase reversa C18, uma corrida isocrática, com fluxo de 1,5 mL/min, temperatura da coluna de 33°C, empregando fase móvel constituída de acetonitrila, água e ácido acético (40:60:1, v/v/v), filtrado a vácuo, com detecção espectrofotométrica em comprimento de onda de 425 nm. O volume de injeção foi de 20 µL. Os extratos foram dissolvidos em acetonitrila (1 mg/mL) e foram filtrados em membrana de 0,45 µm e em seguida injetados em CLAE. O tempo total da análise cromatográfica foi de 35 min. para cada análise.

Para a quantificação dos compostos, soluções-estoque de curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina foram preparadas, uma a uma, em acetonitrila, na concentração de 500 µg/mL, e em seguida soluções padrões foram preparadas a partir desta, 125, 62,5, 31,25 e 15,62 µg/mL, a fim de obter curva de calibração para cada composto. Os resultados foram expressos em mg/g de extrato seco, como média ± desvio padrão (DP). Os experimentos foram feitos em duplicata.

4.3.5 Conteúdo total de fenóis e Capacidade frente a radicais não biológicos dos extratos de *Curcuma longa* e de curcuminoides

4.3.5.1 Conteúdo Total de Fenóis pelo método de Folin-Ciocalteu

O conteúdo total de fenóis (CTF) dos extratos obtidos foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu, tal como descrito por Cicco et al. (2009), com modificações. Os extratos foram dissolvidos em etanol (625 µg/mL) e, foram adicionados a tubos de ensaio: 0,12 mL da solução dos extratos (25 µg/mL), 0,3 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (0,2 M) e 2,4 mL de carbonato de sódio a 5% ($3,77 \times 10^{-1}$ mol/L). Os tubos foram protegidos da luz e levados ao banho de aquecimento, a 40° C, por 20 min. Foi realizada a medida da absorvância a 760 nm, utilizando espectrofotômetro. O teor de fenóis totais foi obtido a partir de uma curva de calibração realizada com ácido gálico (0,75 – 7,52 µg/mL ou $4,00 - 40,00 \times 10^{-2}$ µmol/mL) (Figuras 36 e 37) e expressos como massa de equivalentes de ácido gálico por massa de extrato seco (mg de EAG/g) como média ± desvio padrão (DP). O estudo correspondeu a três experimentos, realizados em triplicata.

Figura 36 - Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância, $\lambda = 760$ nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico em $\mu\text{g/mL}$.

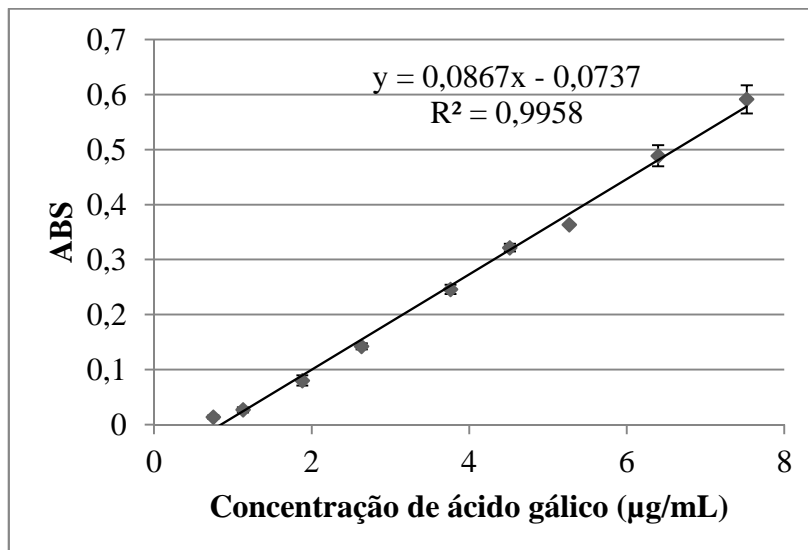
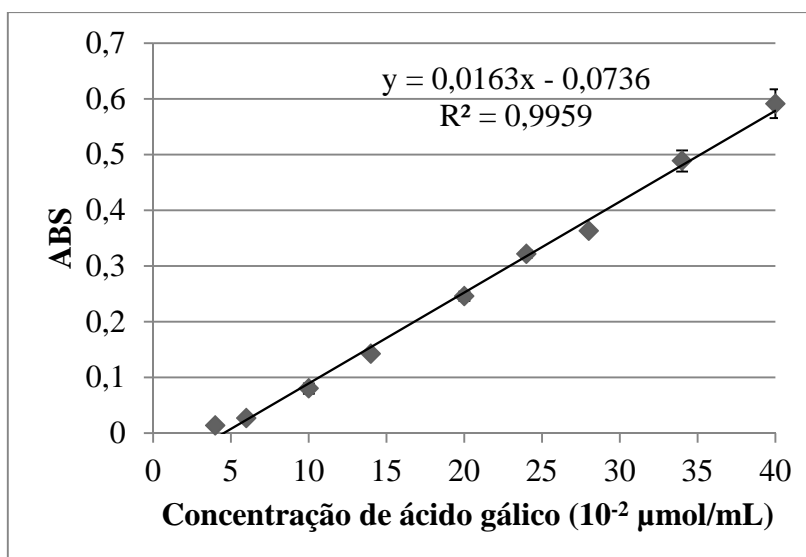


Figura 37 - Curva de calibração com o ácido gálico. Medidas em absorvância, $\lambda = 760$ nm, do complexo formado entre o reagente de Folin-Ciocalteu e o padrão ácido gálico em $\mu\text{mol/mL}$.



4.3.5.2 Ensaio de capacidade antioxidante pelo método do DPPH[•]

A capacidade antioxidante dos extratos de *C. longa* foi determinada em relação à sua atividade sequestradora de radical (ASR), utilizando radical DPPH[•], conforme descrito por De Oliveira et al. (2009), com algumas modificações. Os extratos (250 $\mu\text{g/mL}$) e o radical DPPH[•]

(40 µg/mL) foram dissolvidos em metanol e 0,3 mL de cada extrato (25 µg/mL) foi misturado com 2,7 mL de solução de DPPH• (36 µg/mL). A mistura foi protegida da luz e o tempo reacional foi de 30 min. A capacidade antioxidante foi determinada por meio da medida do decréscimo da absorvância em 516 nm, em espectrofotômetro.

A ASR em porcentagem foi calculada através da seguinte equação:

$$\%ASR = [(Abs_{controle} - Abs_{amostra}) / Abs_{controle}] \times 100$$

Onde, $Abs_{controle}$ é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH• e $Abs_{amostra}$ é a absorvância da mistura reacional após 30 min. (DPPH• + amostra) (GÜLÇİN, 2006). Os resultados são expressos em ASR como média ± desvio padrão (DP).

A capacidade inibitória IC_{50} , frente ao radical DPPH•, definida como a quantidade de amostra necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH• em 50%, foi determinada para os extratos, para a curcumina padrão e para compostos usualmente usados como padrões de antioxidantes. Cada ensaio foi realizado, usando 5 a 6 concentrações, [CM, CHM e CE (10 - 60 µg/mL), ExtFarC (5 - 25 µg/mL), CH (25 - 300 µg/mL), curcumina, ácido ascórbico, ácido cafeico, Trolox e BHT (0,35 - 8 µg/mL), ácido gálico e quercetina (0,025 - 1,5 µg/mL)] em triplicata, para se obter os valores de IC_{50} , expresso como média ± desvio padrão (DP), que foram calculados a partir das curvas de ASR em relação à concentração do extrato/composto, utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

Da mesma forma, um estudo cinético também foi realizado da curcumina e de compostos antioxidantes-padrão, para verificar a velocidade de reação dos mesmos. Foi utilizada a concentração determinada para o IC_{50} de cada composto e realizadas leituras a 516 nm, no 1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 10°, 15°, 20°, 25° e 30° min do tempo de contato entre a mistura reacional e o DPPH•.

4.3.5.3 Experimento DPPH•-CLAE-UV

O procedimento foi realizado conforme descrito por Zhang et al. (2011), com modificações. Os extratos foram diluídos em metanol (4 mg/mL) e 25 µL das soluções foram misturadas com 80 µL de solução de DPPH• (0,4 mg/mL) e adicionado metanol para o volume final de 250 µL. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm. A mistura foi

incubada a 37 °C por 30 min e submetida à análise em CLAE. Os picos relacionados aos compostos com maior atividade sequestradora do DPPH• apresentaram maior redução ou desapareceram por completo, após reação. As condições cromatográficas para os extratos foram as mesmas descritas na sessão anterior.

O ensaio também foi realizado para a curcumina e os compostos antioxidantes-padrão. Os compostos foram diluídos em metanol (1 mg/mL) e 170 µL das soluções foram misturadas com 80 µL de solução de DPPH• (0,4 mg/mL ou 1,0 µmol/mL), as soluções foram filtradas em membrana de 0,45 µm. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 min e submetida à análise em CLAE. Para as condições cromatográficas foi utilizado uma coluna de fase reversa, usando uma corrida gradiente com fluxo de 0,8 mL/min, temperatura da coluna de 40°C. A fase móvel foi ácido acético a 5% em água ultrapura (A) e metanol (B): 0 min - 10% de B, 7 min - 30%, 15 min - 40%, 40 min - 60%, 55 min - 90%, 65 min - 90%, 70 min - 10%, com detecção no comprimento de onda de 260 nm para quercetina e ácido ascórbico, 281 nm para o ácido gálico, Trolox e BHT, 325 nm para ácido cafeico e 425 nm para curcumina. O volume de injeção foi de 20 µL. O tempo total da análise cromatográfica foi de 75 min.

4.3.5.4 Ensaio de capacidade antioxidante pelo método de FRAP

A determinação da capacidade antioxidante por meio do método de FRAP foi realizada conforme descrito por Omena et al. (2012), com modificações. Para o procedimento, o reagente FRAP foi preparado no momento da análise, com uma mistura de 50 mL de tampão acetato (0,3 mol/L, pH = 3,6), com 5 mL da solução de TPTZ (10 mmol/L em HCl 40 mmol/L), mais 5 mL da solução de FeCl₃.6H₂O (20 mmol/L). Adicionou-se 90 µL de cada solução dos extratos, para obter concentração final de 25 mg/L, em cada tubo de ensaio, acrescentou-se 270 µL do solvente e misturou-se com 2,7 mL do reagente FRAP. As soluções foram homogeneizadas e colocadas em banho-maria a 37 °C por 30 min. Realizou-se, então, a leitura da absorvância a 595 nm, em espectrofotômetro.

A curva de calibração foi construída, variando-se a concentrações da solução de Trolox (0,04 a 7,50 µg/mL ou 0,15 a 30 x 10⁻³ µmol/mL). A curva de calibração (Figuras 38 e 39) foi construída a partir de valores de absorvância a 595 nm das soluções preparadas, nas diferentes concentrações estabelecidas. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de Trolox (ET)/g de extrato seco, como média ± desvio padrão (DP). Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

Figura 38 - Curva de calibração com o Trolox em $\mu\text{g/mL}$. Medidas em absorvância, $\lambda = 595$ nm.

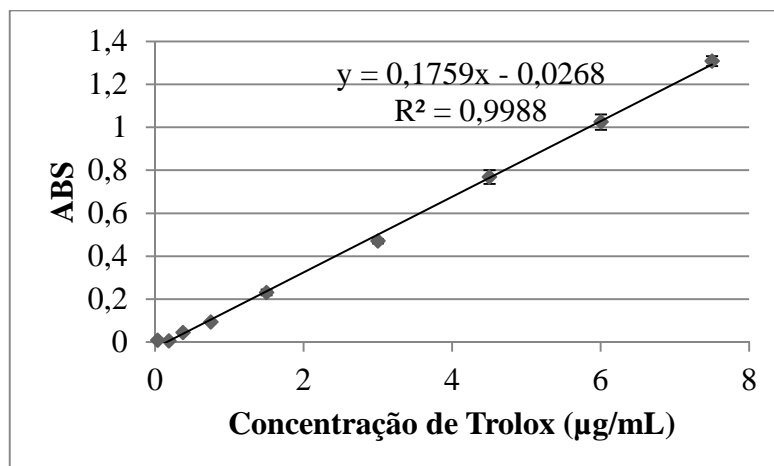
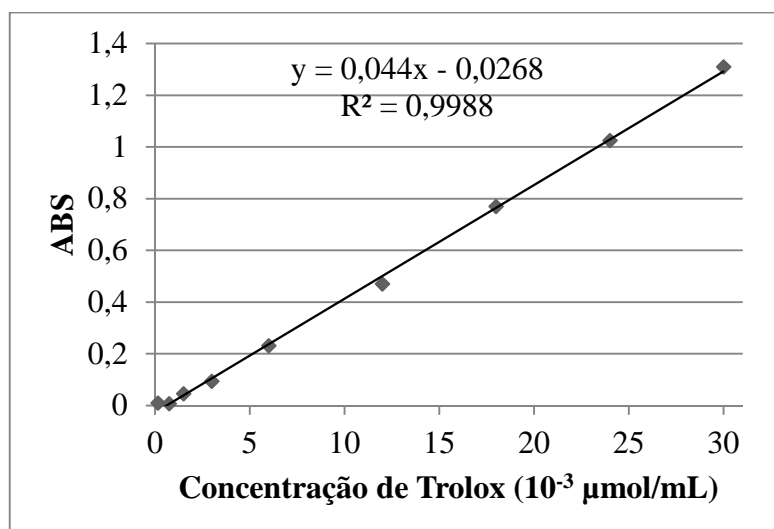


Figura 39 - Curva de calibração com o Trolox em $\mu\text{mol/mL}$. Medidas em absorvância, $\lambda = 595$ nm.



4.3.6 Ensaio de capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio

Os ensaios de eliminação de EROs e ERNs foram realizados no laboratório *Free Radical and Antioxidants* – FRAU da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, sob orientação da Profa. Dra. Eduarda Fernandes.

Para os ensaios de eliminação de EROs e ERNs, foi utilizado o extrato etanólico de *C. longa* (CE), escolhido de acordo com as análises frente a radicais não biológicos e por ser o solvente mais adequado para utilização biológica do que o metanol e, os curcuminoides identificados nos extratos - curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina. O

extrato, os compostos e o controle positivo, a quercetina, foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), com exceção do ensaio de eliminação de HOCl, onde a dissolução foi feita em etanol visto que o DMSO captura o HOCl e interfere na análise (DAMASCENO et al., 2015). Para cada ensaio, pelo menos, quatro experimentos independentes foram realizados, usando 5 a 7 concentrações em triplicata, para se obter os valores de IC₅₀, expresso como média ± erro padrão da média (SEM, do inglês *standard error of the mean*), que foram calculados a partir das curvas de percentagem de inibição em relação à concentração do composto, utilizando o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Inc., La Jolla, CA).

Em cada ensaio, experimentos adicionais foram realizados para verificar os possíveis efeitos de interferência dos solventes e/ou compostos em estudo, nas metodologias utilizadas, e nenhum efeito direto foi observado nas condições experimentais utilizadas.

4.3.6.1 Ensaio de eliminação de radical superóxido (O₂^{•-})

O O₂^{•-} foi gerado pelo sistema NADH/PMS e a atividade de eliminação de O₂^{•-} foi determinada por espectrofotometria no leitor de microplacas, através do monitoramento do efeito do extrato etanólico e dos compostos na redução do NBT induzida pelo O₂^{•-} a 560 nm por 2 min, como descrito por Gomes et al. (2007). O ensaio foi realizado à temperatura ambiente. As misturas reacionais em cada um dos poços continham os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (volume final de 300 µL): extrato CE de *C. longa* (0,03 - 1,88 µg/mL), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina, ou bisdesmetoxicurcumina (0,03 - 1,88 µg/mL), ou quercetina (1,88 - 60 µg/mL), dissolvidos em DMSO + NADH (166 µM) + NBT (43,3 µM) + PMS (2,7 µM). NADH, NBT e PMS foram dissolvidos em tampão fosfato (19 mM), pH 7,4. Os resultados foram expressos como inibição (em percentagem) da redução do NBT para diformazan.

4.3.6.2 Ensaio de eliminação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A atividade sequestradora de H₂O₂ foi medida por monitoramento da oxidação da lucigenina induzida pelo H₂O₂, utilizando a técnica de quimioluminescência, descrita por Gomes et al. (2007). As misturas reacionais continham os seguintes reagentes, com as concentrações finais indicadas (em um volume final de 250 µL): tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) + extrato CE de *C. longa* (0,25 - 8,00 µg/mL), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina, ou

bisdesmetoxicurcumina (0,12 - 4,00 $\mu\text{g/mL}$), ou quercetina (125 - 1000 $\mu\text{g/mL}$), dissolvidos em DMSO + lucigenina (0,8 mM) dissolvida em solução tampão + H_2O_2 (1%). Os ensaios foram realizados a 37 °C. O sinal de quimioluminescência foi detectado no leitor de microplacas imediatamente após a introdução da placa. Os resultados foram expressos como inibição (em percentagem) da oxidação da lucigenina induzida pelo H_2O_2 . Cada estudo correspondeu a seis experimentos, realizados em triplicata.

4.3.6.3 Ensaio de eliminação do ácido hipocloroso (HOCl)

O ensaio de eliminação do HOCl foi realizado de acordo com procedimento descrito por Gomes et al. (2007), com base na oxidação de DHR a rodamina 123, induzida por HOCl. O HOCl foi preparado imediatamente antes da utilização, ajustando o pH de uma solução a 1% (m/v) de NaOCl para 6,2, com a adição gota a gota de uma solução de H_2SO_4 . A concentração de HOCl foi ainda determinada espectrofotometricamente a 235 nm, utilizando o coeficiente de absorção molar de $100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e a diluição apropriada (concentração final de 5 μM), que foi feita em um tampão fosfato 100 mM a pH 7,4. As soluções de trabalho de DHR foram diluídas no tampão fosfato, a partir da solução estoque (2,89 mM), imediatamente antes das determinações e colocados em gelo, no escuro. As misturas reacionais continham os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (em um volume final de 300 μL): solução tampão 100 mM de fosfato a pH 7,4 + extrato CE de *C. longa* (0,03 - 8,00 $\mu\text{g/mL}$), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina, ou bisdesmetoxicurcumina (0,03 - 4,00 $\mu\text{g/mL}$), ou quercetina (0,04 - 4,80 $\mu\text{g/mL}$), dissolvidos em etanol + DHR (5 μM) + HOCl (5 μM). Os ensaios fluorimétricos foram realizados a 37 °C, em um leitor de microplacas, no comprimento de onda de emissão de $528 \pm 20 \text{ nm}$, com excitação a $485 \pm 20 \text{ nm}$. O sinal de fluorescência foi medido imediatamente após a introdução da placa. Os resultados foram expressos como inibição (em percentagem) da oxidação de DHR induzida pelo HOCl.

4.3.6.4 Ensaio de eliminação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

A atividade sequestradora de $^1\text{O}_2$ foi realizada por monitoramento da oxidação da não-fluorescente DHR à fluorescente rodamina 123 pelo $^1\text{O}_2$, de acordo com procedimento descrito por Gomes et al. (2007). O $^1\text{O}_2$ foi gerado por decomposição térmica de um endoperoxídeo solúvel em água, previamente sintetizado, o NDPO₂ (COSTA et al., 2007). As soluções de trabalho do NDPO₂, foram diluídas em tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) e

preparadas imediatamente antes de cada ensaio. As soluções de trabalho de DHR foram diluídas em tampão fosfato, a partir da solução estoque (2,89 mM), imediatamente antes das determinações e colocados em gelo, no escuro. As misturas reacionais continham os reagentes nas seguintes concentrações finais indicadas (em um volume final de 250 μ L): extrato CE de *C. longa* (0,25 - 8,00 μ g/mL), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina, ou bisdesmetoxicurcumina (0,12 - 4,00 μ g/mL), ou quercetina (0,15 - 19,20 μ g/mL), dissolvidos em DMSO + histidina (10 mM) + DHR (50 μ M) + NDPO₂ (1 mM). Os ensaios fluorimétricos foram realizados a 37 °C, em um leitor de microplacas, utilizando o comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm e excitação a 485 ± 20 nm. A fluorescência foi medida após um período de incubação de 30 min. Os resultados foram expressos como inibição (em percentagem) da oxidação DHR induzida pelo ¹O₂.

4.3.6.5 Ensaio de eliminação do óxido nítrico (\bullet NO)

A atividade sequestradora de \bullet NO foi verificada por monitoramento da oxidação de DAF-2, não fluorescente, ao fluorescente triazol-fluoresceína, sendo o \bullet NO gerado pelo NOC-5, de acordo com procedimento descrito por Gomes et al. (2007). As misturas reacionais nos poços continham os seguintes reagentes, com as concentrações finais indicadas (em um volume final de 300 μ L): DAF-2 (5 μ M) + extrato CE de *C. longa* (0,25 - 8,00 μ g/mL), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina, ou bisdesmetoxicurcumina (0,06 - 2,00 μ g/mL), ou quercetina (0,15 - 4,80 μ g/mL), dissolvidos em DMSO, + NOC-5 (10 μ M). Os ensaios foram realizados a 37 °C e o sinal de fluorescência foi detectado após período de incubação de 30 min, no comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm, com excitação a 485 ± 20 nm, em leitor de microplacas. Os resultados foram expressos como inibição (em percentagem) da oxidação da DAF-2 induzida pelo \bullet NO.

4.3.6.6 Ensaio de eliminação de peroxinitrito (ONOO⁻)

A atividade sequestradora de ONOO⁻ foi medida por monitoramento da reação de oxidação de DHR não-fluorescente para a rodamina 123, fluorescente, induzida por ONOO⁻, de acordo com procedimento descrito por Gomes et al. (2007). O ONOO⁻ foi previamente sintetizado conforme descrito por Gomes et al. (2007). Antes de cada experimento, a concentração de ONOO⁻ foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{302\text{nm}} = 1670 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

e, em seguida, foi feita a diluição apropriada em NaOH 0,05 M. As soluções de trabalho de DHR foram diluídas em tampão fosfato, a partir da solução estoque (2,89 mM), imediatamente antes das determinações e colocados em gelo, no escuro. As misturas reacionais continham os seguintes reagentes nas concentrações finais indicadas (em um volume final de 300 μ L): DHR (5 μ M) + extrato CE de *C. longa* (0,13 - 8,00 μ g/mL), ou curcumina, ou desmetoxicurcumina (0,03 - 4,00 μ g/mL), ou bisdesmetoxicurcumina (0,03-2,00 μ g/mL), ou quercetina (0,02-2,40 μ g/mL), dissolvidos em DMSO + ONOO⁻ (600 nM). Os ensaios foram realizados a 37 °C. O sinal de fluorescência foi detectado após um período de incubação de 2 min no comprimento de onda de emissão de 528 ± 20 nm com excitação a 485 ± 20 nm, no leitor de microplacas. Em um conjunto paralelo de experimentos, os ensaios foram realizados na presença de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) (25 mM), a fim de simular as concentrações fisiológicas de CO₂. Os resultados foram expressos como inibição (em porcentagem) da oxidação de DHR induzida pelo ONOO⁻.

4.3.7 Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e *post test* Tukey ao nível de 95% de significância ($p < 0,05$), utilizando o software GraphPad Prism 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir encontram-se os resultados relacionados às análises realizadas com o pó e os extratos de *C. longa*. A análise microbiológica foi realizada, afim de verificar a qualidade do pó de *C. longa* e assim a integridade dos nutrientes do produto. Foram realizadas a identificação e a quantificação dos curcuminoides nos extratos obtidos, e, em seguida, a análise de capacidade antioxidante dos extratos e dos compostos identificados e isolados.

5.1 Análise microbiológica do pó da *Curcuma longa*

O Quadro 6 mostra o resultado da análise microbiológica do pó de *C. longa*, adquirido junto a Cooperaçãofrão. A resolução RDC 12 de 2001 da Anvisa (BRASIL, 2001) sobre os padrões microbiológicos para alimentos, indica a tolerância de 10^2 NMP/g para coliformes a 45 °C/g (termotolerantes) de produto e ausência de *Salmonella sp.*/25 g para temperos. A análise mostrou contagem $<0,3$ NMP/g para coliformes a 45 °C (termotolerantes) nas diluições realizadas, 1:10, 1:100 e 1:1000, do pó de *C. longa*, assim como a análise de *Salmonella sp.* mostrou ausência desta bactéria no produto, indicando que o mesmo se encontra seguro microbiologicamente e próprio para consumo. Microrganismos utilizam nutrientes para se multiplicarem e assim degradam o alimento e alteram sua composição, textura, sabor, etc. Um produto com ausência de contaminação microbiológica, além de evitar a disseminação de doenças, ainda oferece ao consumidor nutrientes íntegros para o consumo.

Quadro 6 - Análise microbiológica da *C. longa* em pó.

Amostra	Coliformes (NMP/g ¹)			<i>Salmonella sp.</i> (em 25 g)
	Diluição	Totais	Termotolerantes	
<i>C. longa</i>	1:10	>1.100	<0,3	Ausente
	1:100	>1.100	<0,3	
	1:1000	>1.100	<0,3	

¹NMP: número mais provável

5.2 Definição do tempo de extração para os extratos de *Curcuma longa*

O Quadro 7 mostra os resultados referentes aos extratos obtidos após 6 h de refluxo e por tempo suficiente para a amostra se tornar límpida. Observa-se um maior valor para CTF e percentual de redução do radical DPPH[•] para as amostras extraídas por 6 h, e menores valores dos dois parâmetros para as amostras que foram extraídas exaustivamente. Como citado anteriormente (item 2.4.2), os curcuminoides podem sofrer degradação pelo calor, exposição à luz e auto-degradação, ao longo do tempo. Campos et al. (2008) indicaram que cocções e armazenamento por longos períodos podem influenciar no teor de compostos com atividade antioxidante, como ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos, dessa forma, propuseram que o aquecimento deve ser realizado em temperaturas mais baixas e tempos mais curtos possível, afim de preservar compostos antioxidantes, incluindo os compostos fenólicos. Dessa forma, pelos resultados obtidos escolheu-se trabalhar com extrações realizadas por 6 h com diferentes solventes, para evitar a possível degradação dos constituintes químicos, sem comprometer o rendimento dos produtos.

Quadro 7 - Conteúdo Total de Fenóis (CTF) e DPPH[•] (ASR%) dos extratos de *C. longa* (média ± DP).

Extrato	CTF (mg EAG/g extrato)	DPPH (ASR % - 25 µg/mL)
CM6	114,7 ± 4,0	26,7 ± 1,20
CML	95,6 ± 5,2	17,9 ± 3,6
CHM6	190,9 ± 5,9	21,4 ± 0,9
CHML	45,3 ± 1,1	16,6 ± 2,5

*Valores médios de três repetições.

5.3 Rendimento dos extratos definitivos

O rendimento do processo de extração para os extratos definitivos utilizados nas seguintes análises está apresentado no Quadro 8, que apresenta o percentual de rendimento dos extratos obtidos, em relação à massa total usada na extração.

Quadro 8 - Rendimento do processo de extração do pó de *C. longa*.

Extratos	Fração	Rendimento (g)	Rendimento (%)	Rendimento Total (%)
Extrato Hexânico e Metanólico	Hexânica (CH)	1,20	6,00	15,95
	Metanólica (CHM)	1,99	9,95	
Extrato Metanólico (CM)		4,14	20,36	20,36
Extrato Etanólico (CE)		3,13	15,65	15,65

Observa-se que o rendimento do extrato que foi utilizado exclusivamente metanol (CM) foi o que apresentou maior percentual de rendimento em relação aos outros extratos. A extração realizada com hexano e metanol que produziram os extratos CH e CHM, apresentou rendimento conjunto similar ao extrato etanólico (CE). É possível verificar que o hexane tem menor eficiência na extração quando consideramos o peso do extrato e o mesmo diminui a eficiência do etanol quando comparamos com o extrato utilizando-se apenas metanol. Dessa forma, conclui-se que o metanol é mais eficiente na extração quando consideramos o peso total do extrato.

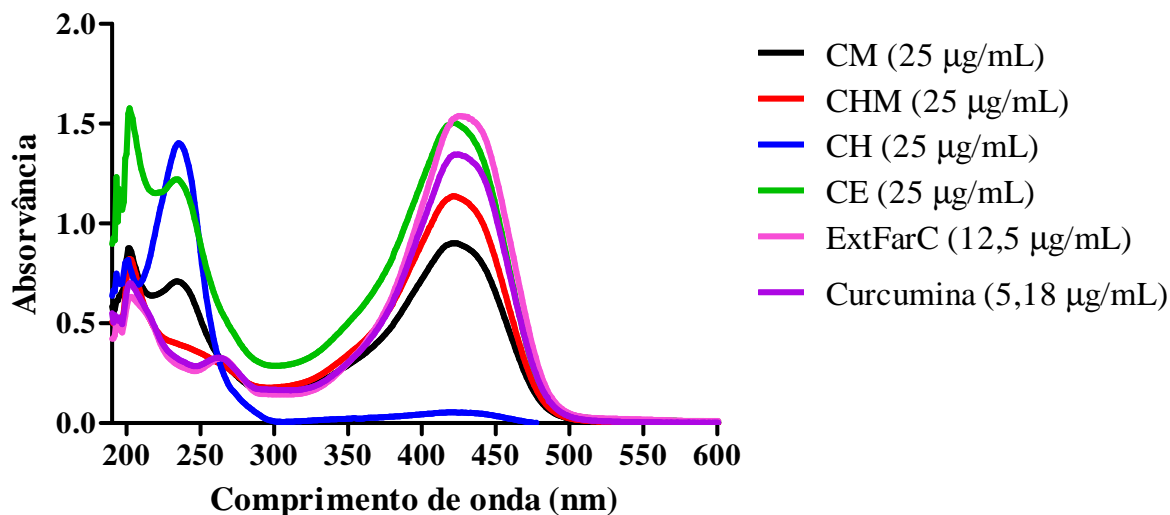
5.4 Identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE-UV dos extratos de *Curcuma longa*

Os curcuminoides são geralmente responsáveis pelas atividades auferidas aos extratos de *C. longa*; como indicado nos próximos tópicos. A análise do perfil químico foi necessária para relacionar tais atividades aos compostos presentes nos extratos.

Na Figura 40, estão apresentados os espectros dos extratos obtidos de *C. longa*. Os extratos CM, CHM, CE e ExtFarC apresentam banda larga e intensa, em torno de 425 nm, característica dos curcuminoides, relativa às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, de acordo com a literatura (KIM et al., 2013; ROHMAN, 2012; VAN NONG et al., 2016) e conforme o espectro UV-Vis da curcumina, também mostrado na Figura 37. O espectro do extrato CH apresenta banda com menor intensidade nesse comprimento de onda. O extrato CE apresentou maior absorvância em 425 nm, em relação aos extratos CHM e CM, sugerindo uma maior concentração dos constituintes, indicando que a extração dos curcuminoides com etanol é eficiente. O ExtFarC apresentou absorvância similar ao CE em concentração inferior, sendo

indicativo de uma maior concentração de curcuminoides, neste extrato em relação aos outros extratos estudados.

Figura 40 - Espectros de absorção no UV-Vis dos extratos de *C. longa* e da curcumina.



Nas Figuras 42, 43, 44, 45 e 46 são apresentados os cromatogramas, a partir de CLAE, referentes aos extratos derivados do pó de *C. longa*. Os picos mostrados nos cromatogramas foram identificados por meio de comparação com padrões autênticos mostrados na Figura 38. Foram identificados nos extratos, três curcuminoides: bisdesmetoxicurcumina apareceu com tempo de retenção de 19 min, a desmetoxicurcumina em 22 min e a curcumina em 26 min, de acordo com cromatogramas obtidos com padrões autênticos dos curcuminoides (Figura 41). Entretanto, nem todos os extratos apresentaram os três compostos. Apenas os extratos CM, CHM e CE apresentaram os três curcuminoides; o extrato CH continha somente desmetoxicurcumina e curcumina e o ExtFarC apresentou apenas curcumina na sua composição.

Figura 41 - CLAE-UV dos curcuminoides-padrão: a – bisdesmetoxicurcumina, b – desmetoxicurcumina e c – curcumina, em 425 nm.

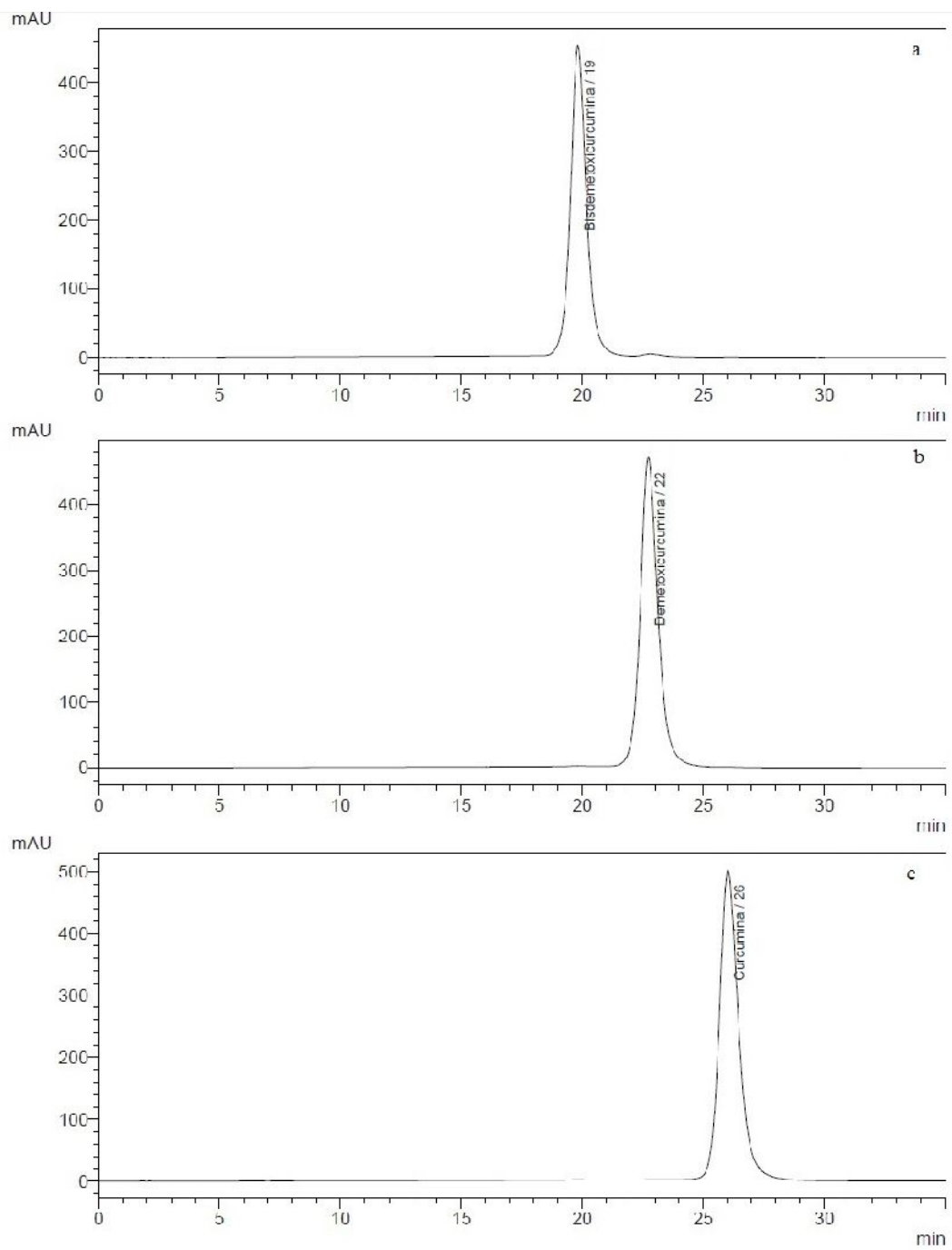


Figura 42 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CM de *C. longa*. Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

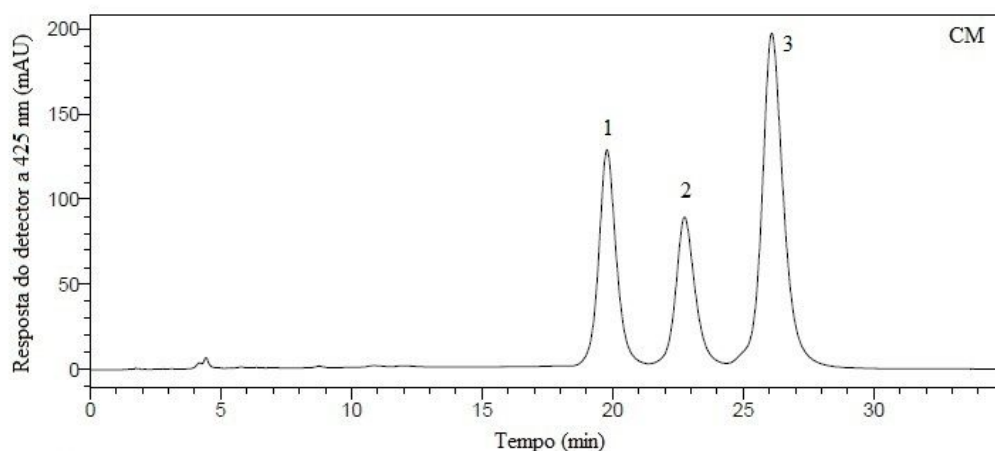


Figura 43 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CHM de *C. longa*. Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

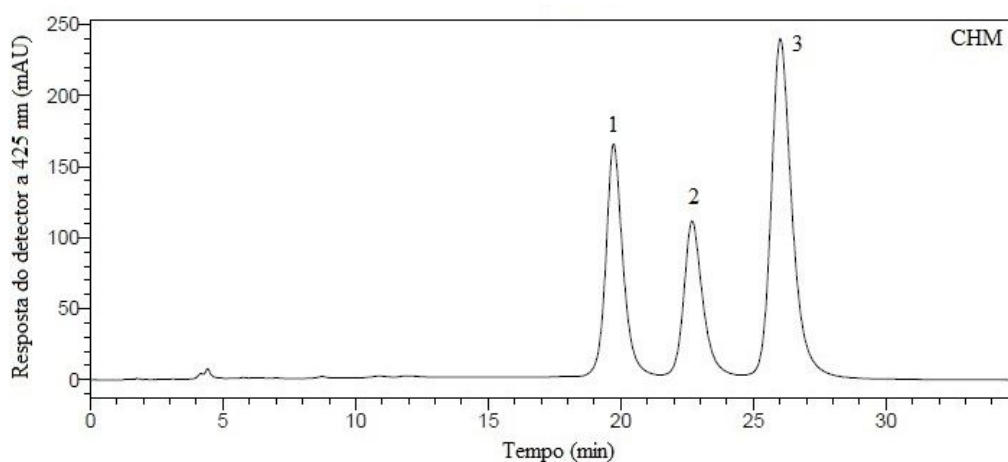


Figura 44 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CH de *C. longa*. Picos correspondem: 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

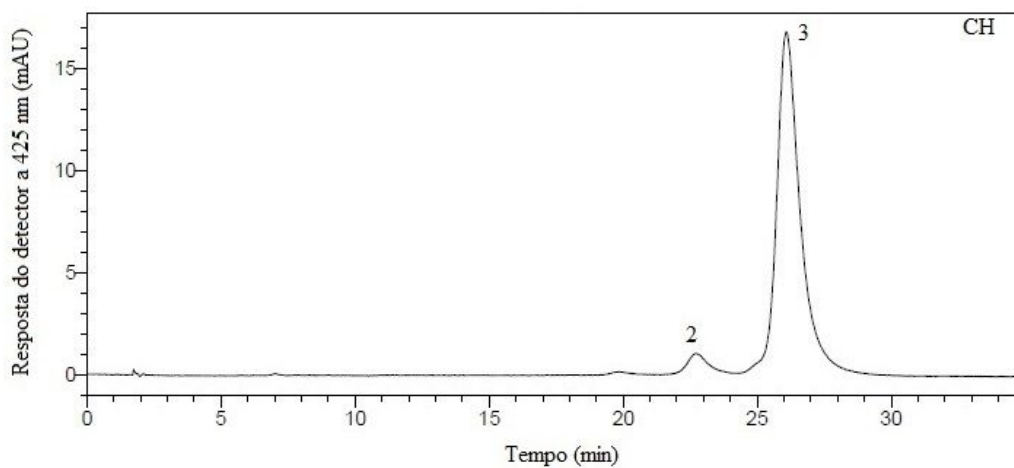


Figura 45 - Cromatograma CLAE-UV do extrato CE de *C. longa*. Picos correspondem: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina, em 425 nm.

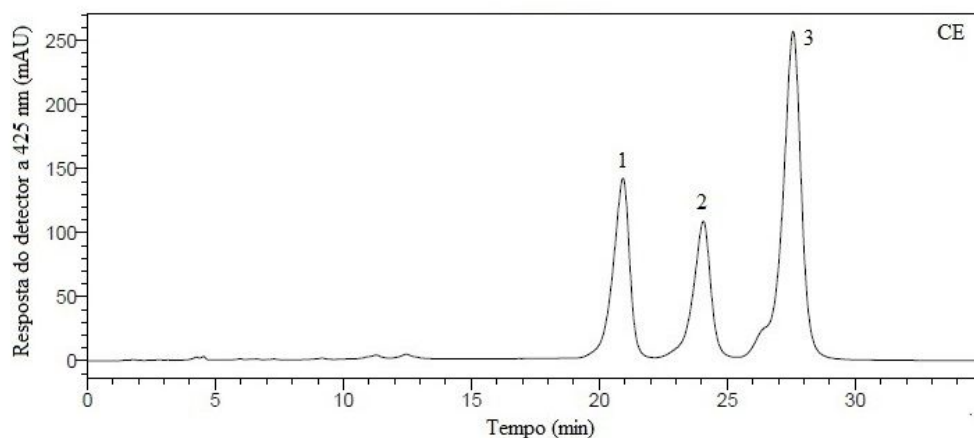
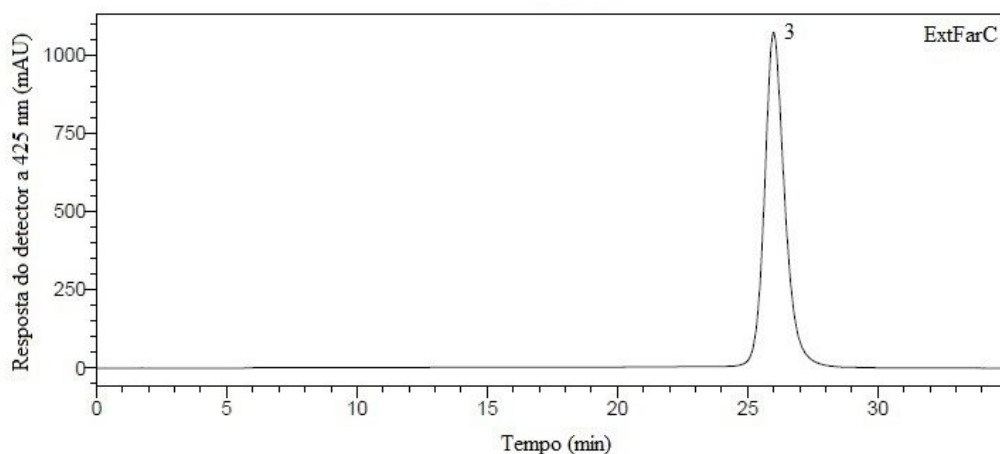


Figura 46 - Cromatograma CLAE-UV do extrato ExtFarC de *C. longa*. Pico corresponde: 3, curcumina, em 425 nm.



O Quadro 9 lista a quantidade destes compostos nos extratos. Nos extratos CM, CHM e CE, a curcumina está presente em maior quantidade (247,43 - 265,20 mg/g de extrato), seguido pela bisdesmetoxicurcumina (100,80 - 109,71 mg/g) e, em menores quantidades, a desmetoxicurcumina (66,11 mg/g de extrato). O extrato CH apresentou as menores quantidades de desmetoxicurcumina e curcumina, em 3,40 e 47,35 mg/g de extrato, respectivamente. A partir destes resultados, pode-se confirmar que metanol e etanol são mais eficientes na extração dos três curcuminoides que o hexano. O extrato farmacêutico mostrou em sua composição a presença majoritária de curcumina, no caso, 654,47 mg/g de extrato, apresentando assim, maior conteúdo de curcumina e total de curcuminoides que os extratos CE, CM, CHM e CH, obtidos do pó da *C. longa*.

Quadro 9 - Quantificação dos extratos de *C. longa* por CLAE, com detecção a 425 nm.

Composto	Equação da regressão linear pela área	CM (mg/g extrato)	CHM (mg/g extrato)	CH (mg/g extrato)	CE (mg/g extrato)	ExFarC (mg/g extrato)
Bisdesmetoxicurcumina	$y = 68755[c] - 82526$ R² 0,9999	102,48	109,71	ND	100,80	ND
Desmetoxicurcumina	$y = 80287[c] - 75831$ R² 0,9997	66,11	68,72	3,40	69,10	ND
Curcumina	$y = 54110[c] - 85570$ R² 0,9998	249,12	247,43	47,35	265,20	654,47
Total de curcuminoides		417,71	425,86	50,75	435,10	654,47

[c] concentração do curcuminoides. ND Não detectado.

Revathy et al. (2011) relataram a presença dos três curcuminoides em extratos de rizomas de *C. longa* coletados em Assam, Índia, preparados com acetona, clorofórmio, hexano, metanol, acetato de etila e hexano/metanol e foram encontrados valores entre 7,57% e 43,50%. O extrato obtido com acetona apresentou a maior quantidade de curcuminoides (43,50%), semelhante aos extratos CE, CM e CHM do presente estudo, como mostra o Quadro 10.

No entanto, as proporções de curcuminoides encontradas pelos autores foram diferentes dos nossos resultados, o extrato em acetona de *C. longa* apresentou mais desmetoxicurcumina do que bisdesmetoxicurcumina, ao contrário dos extratos CE, CM e CHM do presente estudo.

Jayaprakasha; Rao; Sakariah (2002) investigaram extratos metanólicos de *C. longa*, colhida em diferentes locais da Índia e, utilizando método de extração similar, em extrator Soxhlet, com hexano por 30 min e seguido de metanol por 2 h, e encontraram valores entre 2,34 – 9,18% de curcuminoides, bem abaixo dos apresentados pelos extratos metanólicos do presente estudo. Esta diferença pode estar relacionada com o procedimento de extração e/ou solventes utilizados, indicando que o metanol durante 6 h pode ser mais eficiente na extração de curcuminoides.

Embora, muitos estudos relatem a presença exclusiva de curcuminoides em extratos de *C. longa*, existem relatos que registram a presença de outros compostos. Como exemplo, Karioti et al. (2011) verificaram a presença de sesquiterpenoides (ar-turmerona, -turmerona, -turmerona e curlona) (Figura 22) e alguns ácidos fenólicos (ácido *E*-cumárico, vanilina,

ácido *E*-ferúlico) em extrato de *C. longa*. No entanto, a presença de ácidos fenólicos pode ser devida a produtos de degradação dos curcuminoides, durante o processo de extração (ESATBEYOGLU et al., 2015; KARIOTI et al., 2011; KUMAR et al., 2006; MONDAL; GHOSH; MOULIK, 2016; SALEM; ROHANI; GILLIES, 2014). Assim, por serem produtos relacionados com a degradação de curcuminoides, juntamente com as informações sobre as propriedades biológicas relacionadas a *C. longa* serem atribuídas principalmente aos curcuminoides presentes no rizoma, a caracterização de compostos fenólicos de extratos de *C. longa* se concentra principalmente na identificação e quantificação de curcuminoides, buscando sempre o desenvolvimento de métodos mais simples e eficientes para a separação, identificação e quantificação dos mesmos (ANUBALA; SEKAR; NAGAIAH, 2014; LONG et al., 2014).

Quadro 10 - Percentual em curcuminoides, em extratos de *C. longa*, oriundos de diferentes locais.

Referência	Extração/ Identificação	Extrato	C	D	B	Total de curcuminoides*
Autora (2017)	Soxhlet (6 h)	Metanol (CM)	24,91%	6,61%	10,25%	41,77%
		Hex/Metanol (CHM)	24,74%	6,87%	10,97%	42,59%
		Hexano (CH)	4,74%	0,34%	-	5,08%
	CLAE	Etanol (CE)	26,52%	6,91%	10,08%	43,51%
		Farmacêutico (ExtFarC)	65,45%	-	-	65,45%
Revathy et al. (2011)	Soxhlet (6 h)	Acetona	22,80%	14,20%	6,50%	43,50%
		Clorofórmio	19,7%	12,15%	5,05%	36,90%
		Hexano	6,50%	1,03%	0,04%	7,57%
	CLAE	Metanol	15,68%	9,90%	4,73%	30,30%
		Acetato de etila	18,76%	11,60%	5,20%	35,50%
		Hex/Metanol	18,10%	11,20%	6,10%	35,40%
Jayaprakaha; Rao; Sakariah (2002)	Soxhlet (30 min/2 h)	**Salem- Metanol	4,14%	2,88%	2,16%	9,18%
		**Mysore- Metanol	1,06%	0,86%	0,42%	2,34%
	CLAE	**Erode- Metanol	4,00%	3,36%	1,75%	9,11%
		**Balasore- Metanol	5,65%	0,83%	0,62%	7,10%

C = curcumina; D = desmetoxicurcumina; B = bisdesmetoxicurcumina; * Percentual de total de curcuminoides em relação ao peso total de extrato seco; ** Locais de cultivo.

5.5 Conteúdo total de fenóis e capacidade antioxidante frente a radicais não biológicos dos extratos de *Curcuma longa*, curcuminoides e padrões antioxidantes

O Quadro 11 apresenta os resultados obtidos para o CTF e a capacidade antioxidante pelos métodos do DPPH[•] e FRAP, para os extratos CM, CH, CHM, CE e ExtFarC.

Quadro 11 - Conteúdo total de fenóis (CTF), FRAP e DPPH[•] (ASR% e IC₅₀) dos extratos de *C. longa* (média ± DP).

Extrato	CTF (mg EAG/g extrato) ¹	FRAP (mg ET/g extrato)	DPPH [•] (ASR % - 25 µg/mL)	IC ₅₀ em relação ao DPPH (µg/mL)
CM	209,90 ± 12,12 ^b	114,60 ± 27,60 ^b	45,50 ± 8,20 ^b	27,68 ± 0,13 ^a
CHM	236,80 ± 53,19 ^b	123,50 ± 13,10 ^b	54,80 ± 0,90 ^b	26,67 ± 0,53 ^b
CH	66,82 ± 8,15 ^c	16,60 ± 4,90 ^c	10,10 ± 2,90 ^c	43,45% ^{*300 µg/mL}
CE	255,80 ± 17,33 ^b	158,00 ± 3,00 ^b	55,20 ± 0,70 ^b	19,45 ± 0,24 ^c
ExtFarC	616,90 ± 31,00 ^a	436,30 ± 32,30 ^a	85,00 ± 0,90 ^a	13,84 ± 0,06 ^d

¹Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p = 0,05). Valores médios de três repetições. *Efeito de sequestro (média %) na maior concentração testada (em sobrescrito).

O ExtFarC apresentou maior conteúdo de fenóis totais, 616,90 ± 31,00 mg EAG/g de extrato, seguido dos extratos CE, CHM e CM, que apresentaram valores de 255,80 ± 17,33; 236,80 ± 53,19 e 209,90 ± 12,12 mg EAG/g de extrato, respectivamente (Quadro 11). O extrato CH foi o que apresentou menor conteúdo de fenóis totais em relação a todos os extratos estudados (66,82 ± 8,15 mg EAG/g de extrato).

O Quadro 11 mostra, também, os resultados da atividade antioxidante pelo método do DPPH[•] para os extratos de *C. longa* na concentração de 25 µg/mL e o IC₅₀ para o ensaio com DPPH[•]. O ExtFarC foi o que apresentou maior percentual de inibição (85,01 ± 0,94 %), seguido do CE (55,20 ± 0,70 %), CHM (54,83 ± 0,91 %) e CM (45,50 ± 8,20 %). O CH foi o que apresentou menor percentual de inibição, apenas 10,10 ± 2,90 % para a concentração citada, muito inferior aos outros extratos estudados.

Em relação ao IC₅₀, para o DPPH[•], o CE e o ExtFarC apresentaram menores valores de IC₅₀ dentre os extratos estudados, 19,45 ± 0,24 e 13,84 ± 0,06 µg/mL respectivamente, enquanto que o CM e o CHM foram de 27,68 ± 0,13 e 26,67 ± 0,53 µg/mL, respectivamente,

todos estatisticamente diferentes. Aliado aos dados da identificação e quantificação dos curcuminoides, observa-se que a atividade antioxidante frente ao DPPH[•], eleva-se com o aumento da quantidade de curcumina presente, como é observado pelos ExtFarC, seguido pelo CE, indicando que a curcumina pode ter uma maior atividade antioxidante frente a esse radical quando comparado aos outros curcuminoides. O extrato CH não alcançou 50% de inibição nas concentrações estudadas (5 - 300 µg/mL), alcançando apenas 43,45% de atividade na maior concentração trabalhada.

Sobre os valores pelo método de FRAP, o ExtFarC apresentou maior valor (436,30 ± 32,30 µmol ET/g extrato) e com isso maior atividade frente a este método e estatisticamente diferente dos outros extratos. Os extratos CM, CHM e CE apresentaram atividades estatisticamente semelhantes e o CH foi o extrato que apresentou menor atividade em comparação com os outros extratos, indicando menor atividade pelo método de FRAP (Quadro 11).

Na literatura, são encontrados diferentes valores de conteúdos totais de fenóis pelo método de Folin–Ciocalteu para extratos de *C. longa* (Quadro 12). Os valores obtidos para os extratos metanólicos CM e CHM, no presente estudo, foram maiores que os registrados por Hirun; Utama-Aang; Roach (2014), ao estudarem extratos metanólicos de rizomas de *C. longa* da Tailândia, tratados por micro-ondas em diferentes potências e tempos de contato, assim como, Danciu et al. (2015) encontraram valor menor de CTF para o extrato etanólico, quando comparado ao extrato CE estudado. Essas diferenças podem ser atribuídas ao local de cultivo ou aos processos de tratamento/extração realizados. Por outro lado, Martinez-Correa et al. (2016) registraram valores equivalentes de CTF para os extratos etanólicos em relação ao extrato CE do presente estudo (Quadro 12).

Sobre os valores de IC₅₀ para o DPPH[•], Hirun; Utama-Ang; Roach (2014), após investigação de extratos metanólicos de *C. longa*, indicaram que apenas 3 tratamentos dos 9 realizados apresentaram menores valores de IC₅₀ (23,41 – 24,12 µg/mL), o restante apresentou maiores valores em relação aos extratos CM e CHM. Semelhante ao presente extrato etanólico, com menor IC₅₀ em relação aos extratos metanólico e hexânico, Martinez-Correa et al. (2016) também encontraram os menores IC₅₀ para os extratos etanólicos, em relação ao extrato aquoso, indicando que o etanol é mais eficiente na extração de compostos, com atuação frente ao DPPH[•].

Quadro 12 - Conteúdos totais de fenóis (CTF) e DPPH[•] (IC₅₀) em extratos de *C. longa* registrados na literatura.

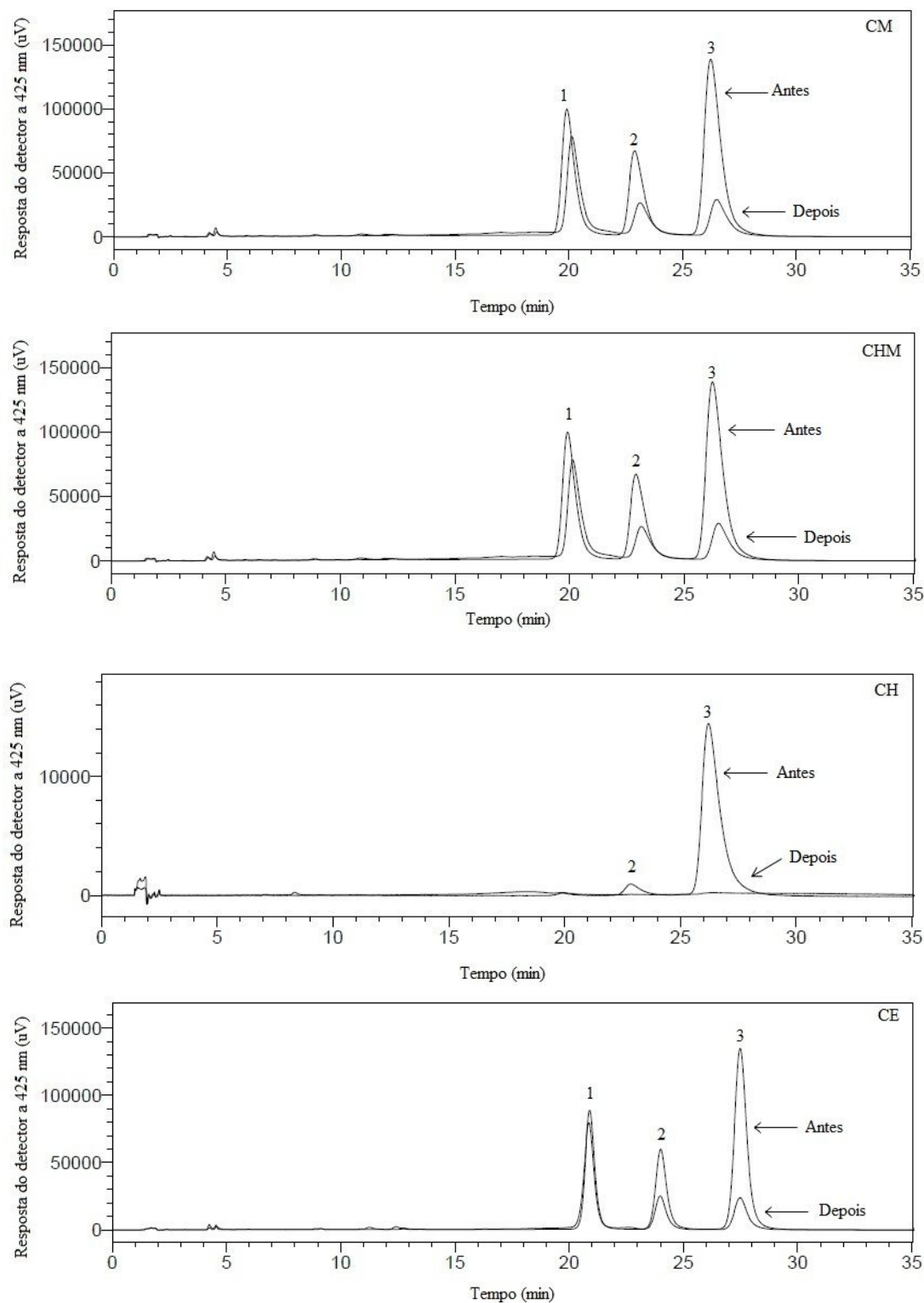
Referências	Local da amostra	Tratamento/Extração/ Solvente	CTF (mg EAG/g extrato)	IC ₅₀ - DPPH (µg/mL)
Hirun; Utama-Aang; Roach (2014)	Chiang Mai, Tailândia	Tratamento por micro-ondas. Extração (metanol) e centrifugação	24,60 ± 13,00 a 113,10 ± 17,70	23,41 ± 13,61 a 59,56 ± 6,96
Danciu et al. (2015)	Timisoara, Romênia	Extração (etanol) 70 °C por 2 h	182,00 ± 0,60	-
Martinez-Correa et al. (2016)	Mato Grosso, Brasil	Extração supercrítica (água) (com e sem CO ₂) 25 °C, por 42 h	44,00 ± 2,00 e 16,10 ± 0,70	-
		Extração supercrítica (etanol) (com e sem CO ₂), 25 °C, por 42 h	453,00 ± 31 430,00 ± 12,00	33,60 ± 0,40 14,00 ± 1,00

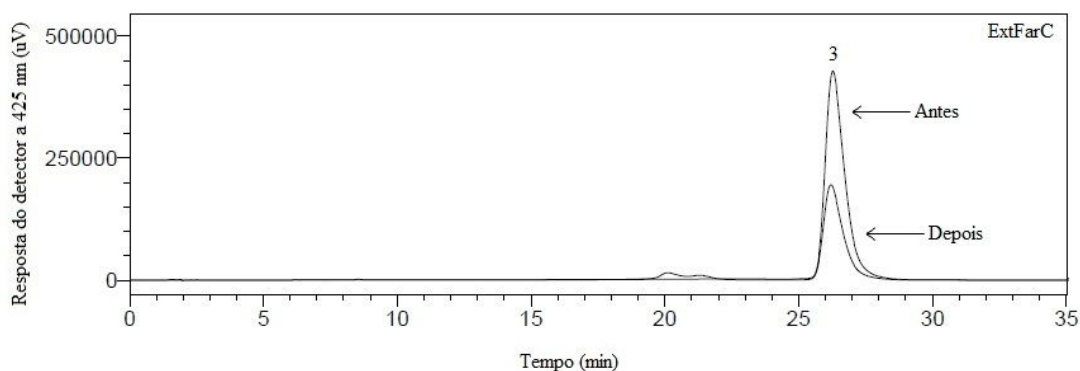
Para obter dados adicionais sobre a atividade dos curcuminoides presentes nos extratos, foi realizada análise por CLAE-UV, da interação entre os mesmos e o DPPH[•], sendo a análise em CLAE-UV realizada a partir dos respectivos extratos antes e após a reação com o DPPH[•]. A Figura 47 mostra os cromatogramas resultantes do experimento DPPH[•]-CLAE-UV, para os extratos de *C. longa*, antes e depois da reação com o DPPH[•], por 30 minutos. Observa-se a redução da intensidade dos três picos relacionados aos curcuminoides, constituintes dos extratos CM, CHM e CE, indicando uma atividade antioxidante dos três compostos, com redução entre 6,65 - 24,22% para a bisdesmetoxicurcumina, entre 49,13 - 62,97% para a desmetoxicurcumina e entre 53,86 - 81,93% para curcumina (Quadro 13), sendo a redução mais evidente nos picos relacionados à curcumina e à desmetoxicurcumina.

Ocorreu a redução total dos dois picos relacionados a desmetoxicurcumina e curcumina no extrato CH. O DPPH[•], em excesso, reagiu totalmente com os constituintes químicos. A associação com os dados de IC₅₀DPPH, é sempre necessária. No ExtFarC não foi possível comparar a redução dos picos entre compostos e assim indicar qual teria maior atividade antioxidante, pois o extrato apresentou majoritariamente curcumina, não indicando por CLAE a presença de desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina.

Ressalta-se ainda, uma maior redução do pico da curcumina nos extratos que possuem os outros curcuminoides, CM, CHM e CE, do que quando o extrato possui apenas curcumina que é o caso do ExtFarC, sendo talvez um comportamento antioxidante sinérgico dos compostos em relação ao DPPH[•] (Quadro 13), fato que suscita investigação futura.

Figura 47 - Cromatogramas DPPH[•]-CLAE-UV dos extratos CM, CHM, CH, CE e ExtFarC de *C. longa* antes e depois da reação com DPPH[•], por 30 minutos, a 425 nm. Picos correspondem a: 1, bisdesmetoxicurcumina; 2, desmetoxicurcumina; 3, curcumina.





Quadro 13 - Percentual de redução dos picos dos curcuminoides, após a reação com DPPH[•], por CLAE-UV, nos extratos de *C. longa*.

Compostos	CM (% de redução)	CHM (% de redução)	CH (% de redução)	CE (% de redução)	ExtFarC (% de redução)
Bidesmetoxicurcumina	8,26	24,22	-	6,65	-
Desmetoxicurcumina	49,13	62,97	100	58,92	-
Curcumina	66,37	79,71	100	81,93	53,86

Diante, dos dados acima expostos, verificou-se que a curcumina foi encontrada em maior concentração em todos os extratos estudados e apresentou maior atividade antioxidante frente ao DPPH[•] como mostrado na análise pelo DPPH[•]-CLAE-UV. Dessa forma, foi realizado o ensaio de atividade antioxidante frente ao DPPH[•] desse composto isolado e comparado com os principais compostos utilizados como antioxidantes, quanto à ASR_{DPPH}%.

O Quadro 14 apresenta os IC₅₀ da curcumina e de compostos usualmente utilizados como padrões em ensaios antioxidantes para o DPPH[•] em µmol/mL. Como indicado no item 2.2.3, a atividade antioxidante em relação ao DPPH[•] de compostos fenólicos é em geral relacionada ao número de grupos hidroxila disponíveis na molécula, entretanto a química radicalar é complexa e, de modo geral, dá origem a múltiplos produtos sendo um obstáculo para o uso do presente método. Mas, em relação aos dados encontrados, a curcumina apresentou menor IC₅₀ que o BHT e o Trolox, e não diferiu significativamente do ácido ascórbico. Apenas o ácido cafeico, quercetina e ácido gálico foram mais efetivos que a curcumina em relação à redução do DPPH[•], pois apresentaram valores de IC₅₀ menores.

Quadro 14 - IC₅₀DPPH• da curcumina, Trolox, ácido cafeico, quercetina, ácido gálico, BHT e ácido ascórbico (média ± DP).

Composto	IC₅₀ em relação ao DPPH• (10⁻³ μmol/mL)
Curcumina	14,85 ± 0,59 ^c
Trolox	17,66 ± 0,80 ^b
Ácido Cafeico	11,92 ± 0,84 ^d
Quercetina	8,27 ± 0,59 ^e
Ácido Gálico	5,85 ± 0,27 ^f
BHT	41,95 ± 1,77 ^a
Ácido Ascórbico	15,83 ± 0,13 ^{bc}

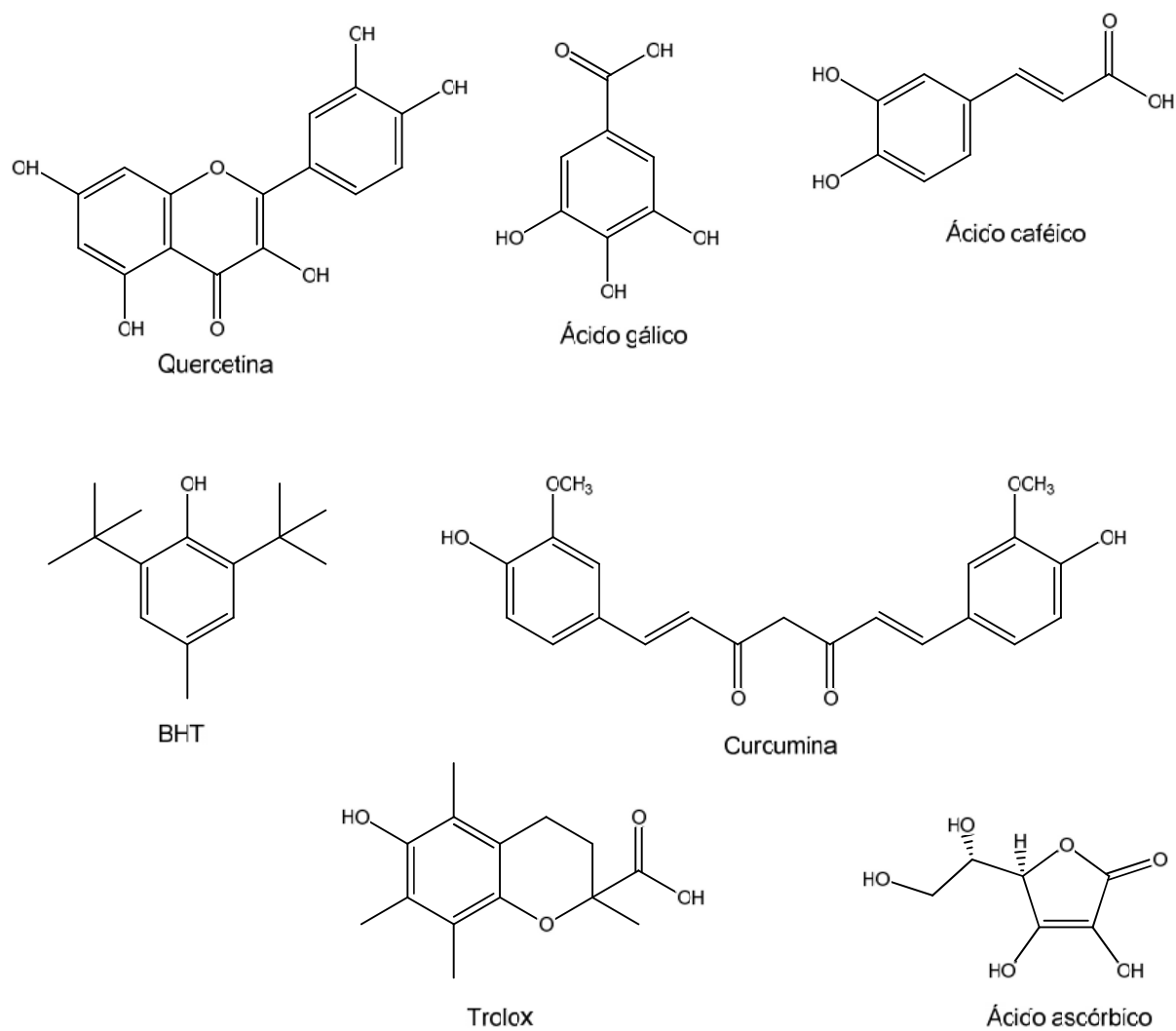
*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p = 0,05). Valores médios de três repetições.

Compostos que possuem substituintes na posição *orto*- ou *para*-, como quercetina, ácido gálico, ácido cafeico, curcumina e trolox, compostos que apresentaram os melhores resultados (Figura 48), podem reagir com o DPPH• após a doação de hidrogênio radicalar a partir de uma hidroxila fenólica, pelas reações 2 e 3 que foram mostradas na Figura 11.

Também se indica a importância da posição de segundo e terceiro grupos hidroxila, pois compostos que apresentam a segunda hidroxila na posição *orto*- ou *para*- têm uma atividade mais elevada do que quando em *meta*-, como se verificou para a quercetina, ácido cafeico e ácido gálico, da mesma forma pela substituição *orto*-metóxi como encontrado na curcumina, compostos estes que foram mais eficientes que o Trolox e o BHT (Figura 48). Outro ponto abordado é a presença de um grupo eletroatraente ou a ausência de qualquer grupo eletrodoador que reduz consideravelmente a eficiência anti-radicalar, que foi o caso do Trolox, um dos antioxidantes menos eficientes, nessa avaliação (Figura 48 e Quadro 14).

No caso do ácido ascórbico, o mesmo apresentou-se bastante eficiente no ensaio de atividade antioxidante frente ao DPPH•, pois pode reagir com duas moléculas de DPPH• como mostrado na Figura 13, pelas duas hidroxilas enólicas que possui (Figura 48).

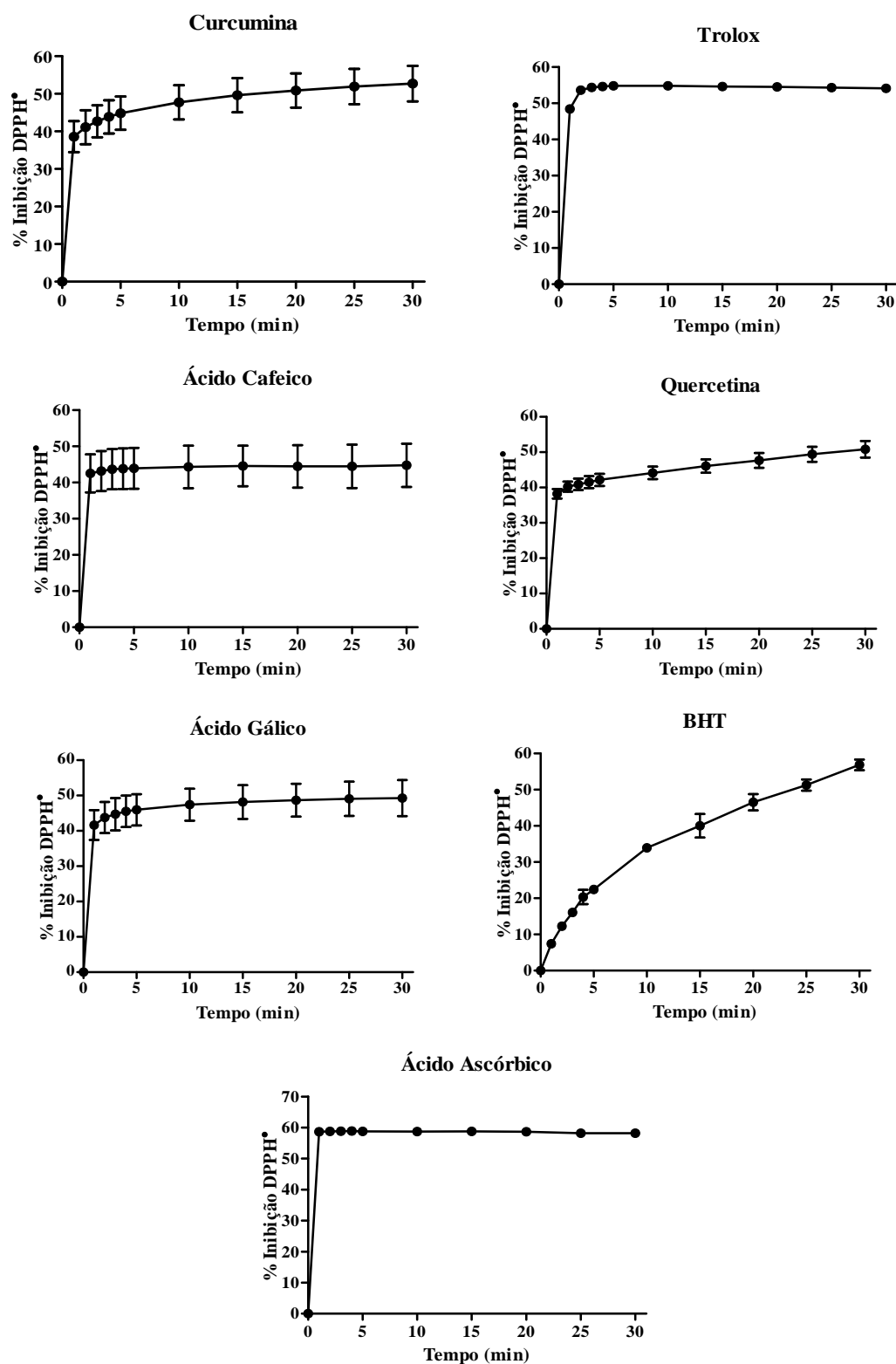
Figura 48 - Estruturas da curcumina e de antioxidantes utilizados no ensaio comparativo do DPPH[•].



Fonte: Autora (2017).

O comportamento cinético das reações com os respectivos compostos está ilustrado na Figura 49.

Figura 49 - Comportamento cinético da curcumina, Trolox, ácido cafeico, quercetina, ácido gálico, BHT e ácido ascórbico frente ao DPPH^{*}.



*Cada ponto mostra a média e as barras do desvio padrão (DP) representam os valores obtidos em triplicata.

O Trolox, o ácido cafeico, o ácido gálico e o ácido ascórbico, em concentrações próximas aos seus valores de IC_{50} , têm comportamentos semelhantes diante do $DPPH^{\bullet}$, com sequestro quase total até os primeiros 5 min. A curcumina e a quercetina, por sua vez, têm uma ação mais lenta e gradual até os 30 min. Para o BHT, a ação é bem mais lenta do que aquela dos outros compostos, diante do $DPPH^{\bullet}$. A cinética mais lenta é caracterizada por curvas hiperbólicas levando mais tempo para atingir um estado estacionário. O perfil de ação relacionado ao tempo não indica melhor atividade; diante de espécies reativas existentes no meio biológico isso se torna relativo devido à espécie-alvo. Algumas espécies reativas têm ação muito rápida e uma meia vida mais curta, como por exemplo o 1O_2 e o HO^{\bullet} e outras, como o H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ podem ter ação mais lenta, mas passar mais tempo em contato com biomoléculas, atravessar membranas ou participar de reações na formação de outras espécies mais deletérias, podendo, dessa forma, necessitar de antioxidantes com perfis diferentes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Então, há aplicação para os diferentes oxidantes, a depender da situação. A sinergia entre eles pode ser uma característica potencialmente útil.

O ensaio preliminar do $DPPH^{\bullet}$ -CLAE-UV também foi realizado com a curcumina e os compostos antioxidantes do Quadro 14. As Figuras 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56 mostram os cromatogramas dos compostos, do $DPPH^{\bullet}$ e dos compostos com $DPPH^{\bullet}$, após contato por 30 min, nos seus devidos e respectivos comprimentos de onda. Observa-se uma redução dos picos referentes aos compostos antioxidantes em questão nos cromatogramas, após a reação, quando comparados aos cromatogramas dos compostos isolados. Entretanto, quando se comparam os cromatogramas antes e após a reação do $DPPH^{\bullet}$, observa-se que houve um aumento nos picos após a reação com todos os compostos.

No ensaio espectrofotométrico de obtenção de $IC_{50DPPH^{\bullet}}$, observou-se diminuição da absorvância relacionada ao $DPPH^{\bullet}$, entretanto neste ensaio não foi possível verificar a diminuição do pico relacionada ao composto. A diferença da molécula de $DPPH^{\bullet}$ após a reação com substância antioxidante é de um hidrogênio, formando $DPPH-H$. Boudier et al. (2012) afirmaram que nos ensaios realizados com $DPPH^{\bullet}$, pela semelhança das moléculas antes e após a reação, pode-se não verificar a separação entre eles, sendo necessário um método específico para detectar os produtos reacionais. Uma possibilidade é a análise dos antioxidantes oxidados.

Como exemplo, na curcumina, houve diminuição de seu pico, em torno de 51,5 min, e surgimento de novos picos em torno de 52,5 e 53,5 min, o que pode estar relacionado aos

produtos formados, a partir da oxidação do mesmo pelo DPPH[•] (Figura 50), não identificados no escopo deste trabalho.

No Trolox, o pico respectivo, em tempo de retenção em torno de 40,1 min, diminuiu consideravelmente, quando em presença do DPPH[•], com surgimento de um novo pico, em tempo de retenção de 38,8 min (Figura 51).

O ácido cafeico, a quercetina e o ácido ascórbico apresentaram picos em torno de 12 min, 31 min e 4 min, respectivamente, entretanto, o perfil cromatográfico não indicou mudanças claras, apenas a diminuição dos picos relacionados aos respectivos compostos, indicativos de reação dos mesmos com o DPPH[•], porém o método de detecção usado não permitiu definir os produtos de reação gerados (Figuras 52, 53 e 54). Trabalho neste sentido encontra-se em andamento.

O cromatograma do ácido gálico revelou dois picos unidos em torno de 4 min e após a reação com o DPPH[•] os dois picos apresentaram diminuição, indicando reação do composto com o radical, entretanto assim como o ácido cafeico, a quercetina e o ácido ascórbico não houve surgimento de novo pico, ou seja, não foi possível a detecção do novo composto produzido na reação, nas condições usadas (Figura 55).

O BHT foi detectado em torno de 62,5 min e, após a reação com o DPPH[•] houve surgimento de um novo pico em 62 min no cromatograma, além da diminuição do pico relativo ao BHT antes da reação (Figura 56).

Figura 50 - Cromatogramas do DPPH[•], da curcumina e da curcumina+DPPH[•], após a reação por 30 min, a 425 nm.

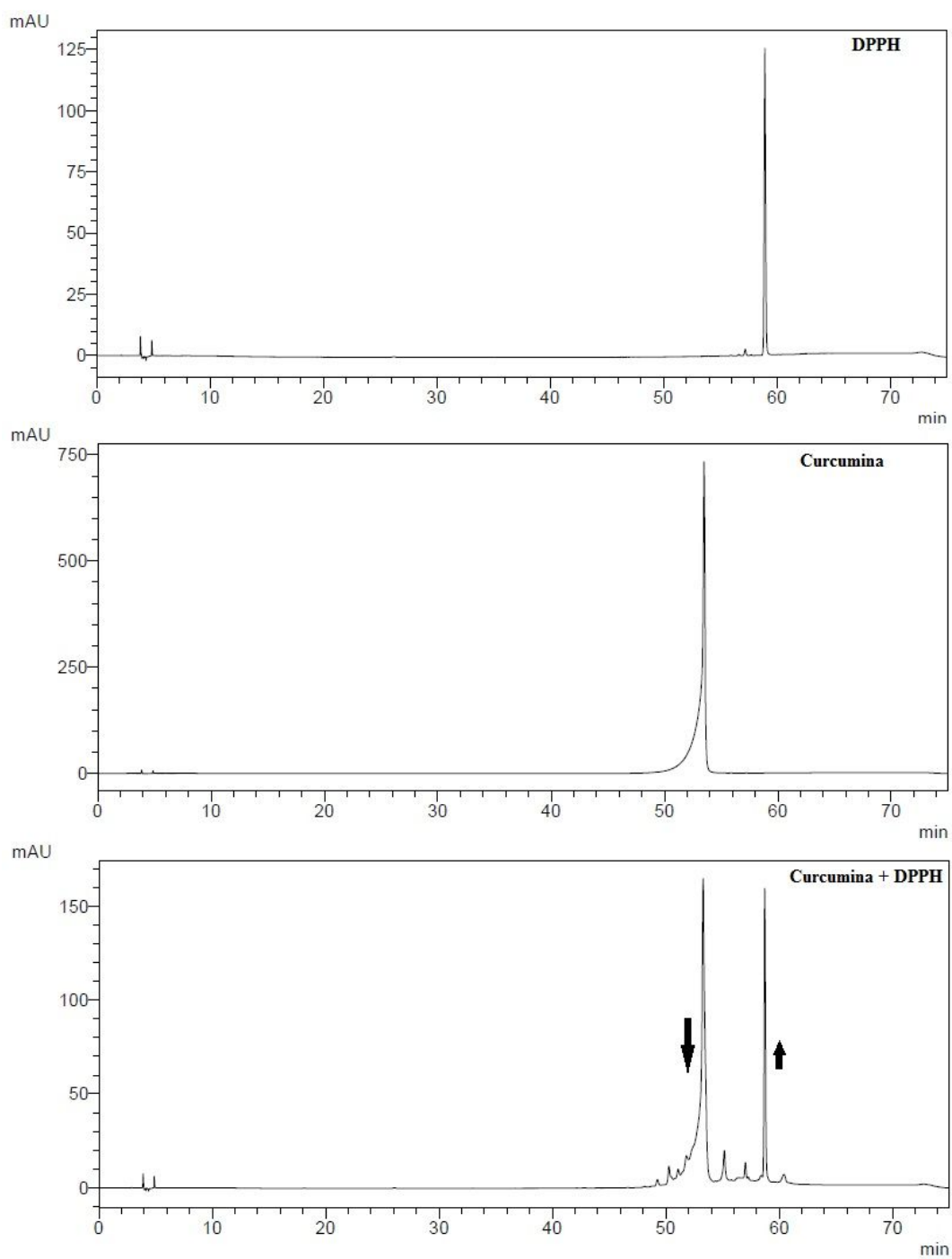


Figura 51 - Cromatogramas do DPPH[•], do Trolox e do Trolox+DPPH[•] após a reação, por 30 min, a 281 nm.

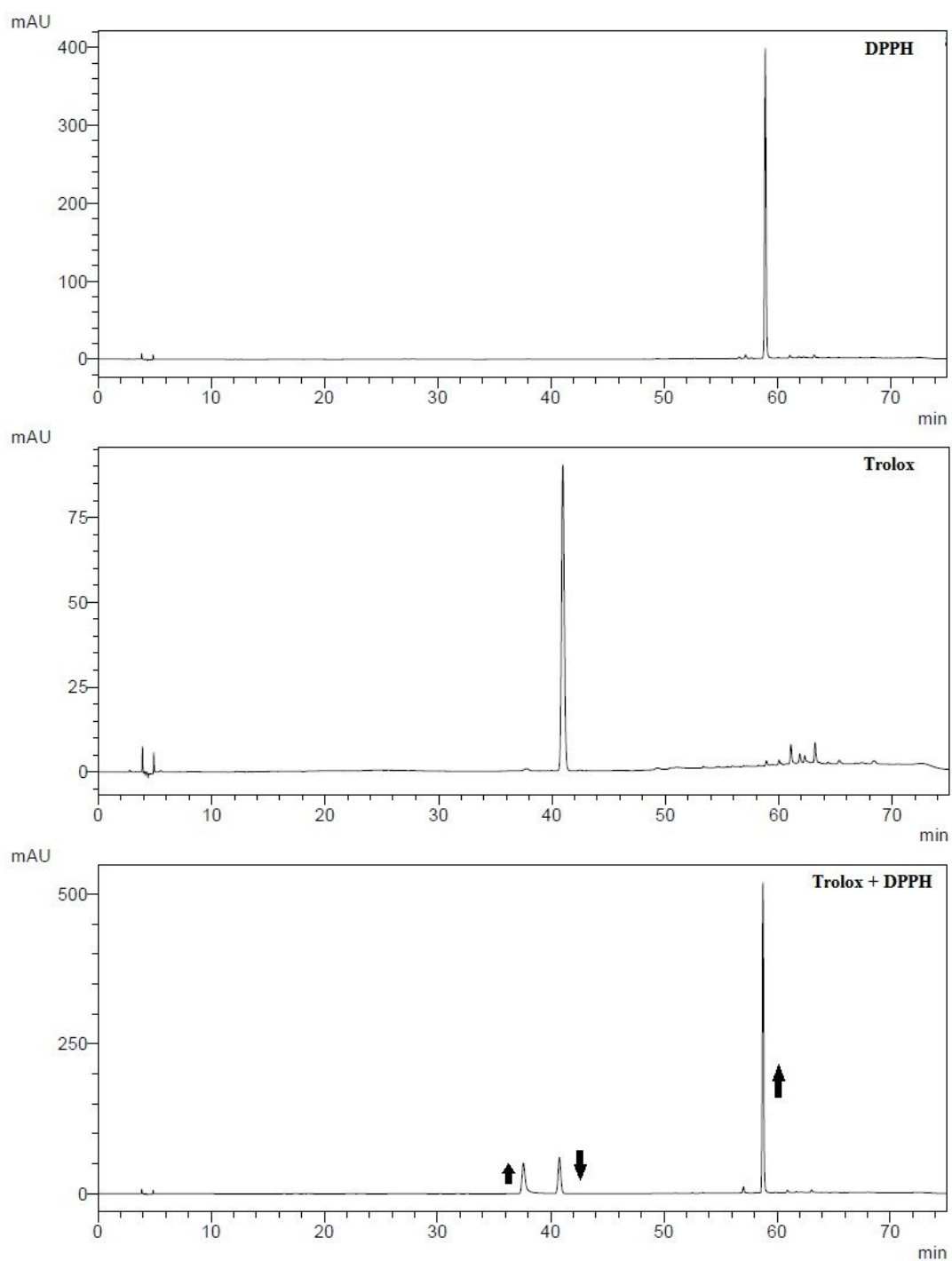


Figura 52 - Cromatogramas do DPPH[•], do ácido cafeico e do ácido cafeico + DPPH[•], após a reação, por 30 min, a 325 nm.

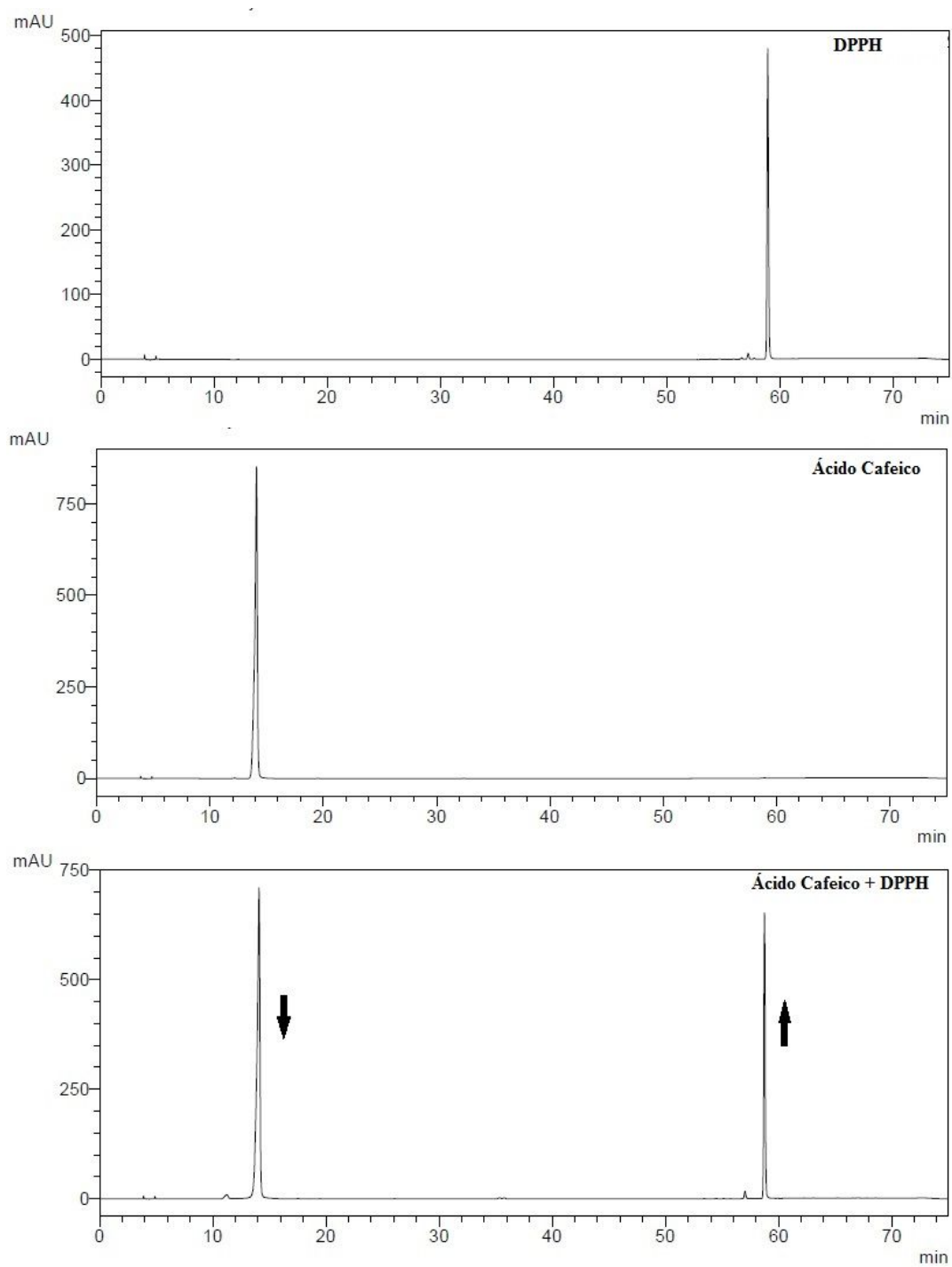


Figura 53 - Cromatogramas do DPPH[•], da quercetina e da quercetina + DPPH[•] após a reação, por 30 min, a 260 nm.

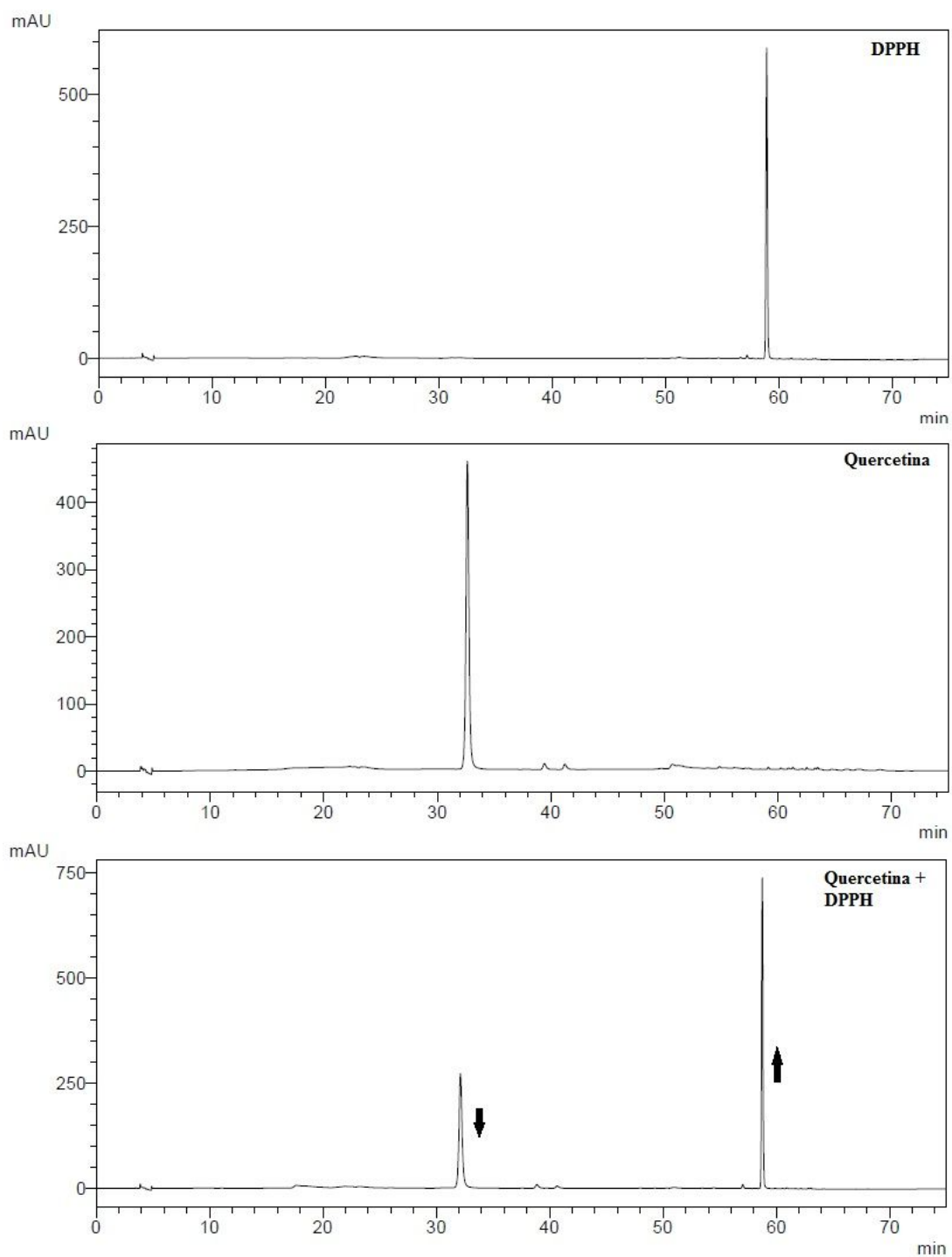


Figura 54 - Cromatogramas do DPPH[•], do ácido ascórbico e do ácido ascórbico+DPPH[•] após a reação, por 30 min, em 260 nm.

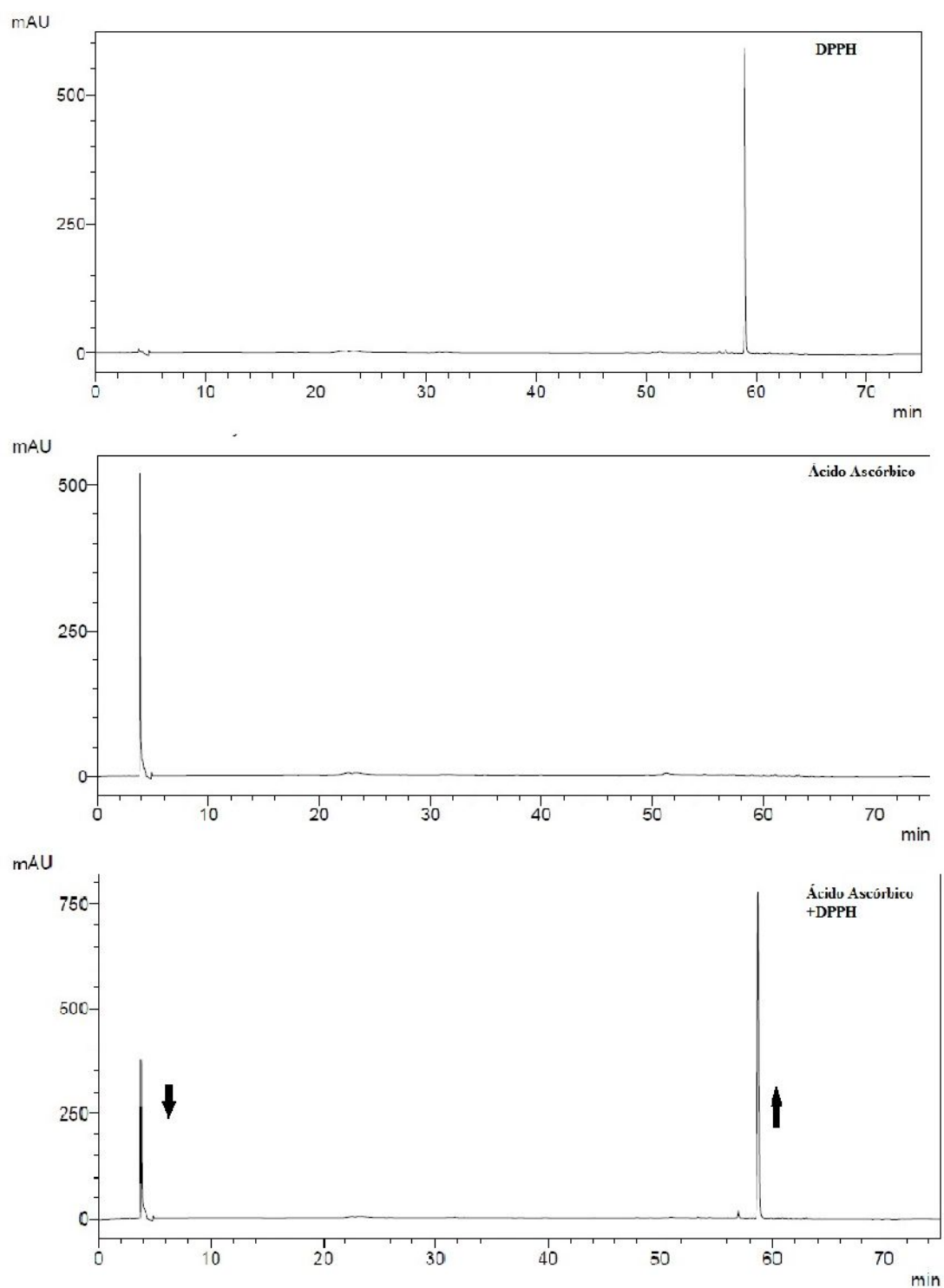


Figura 55 - Cromatogramas do DPPH[•], do ácido gálico e do ácido gálico+DPPH[•] após a reação, por 30 min, a 281 nm.

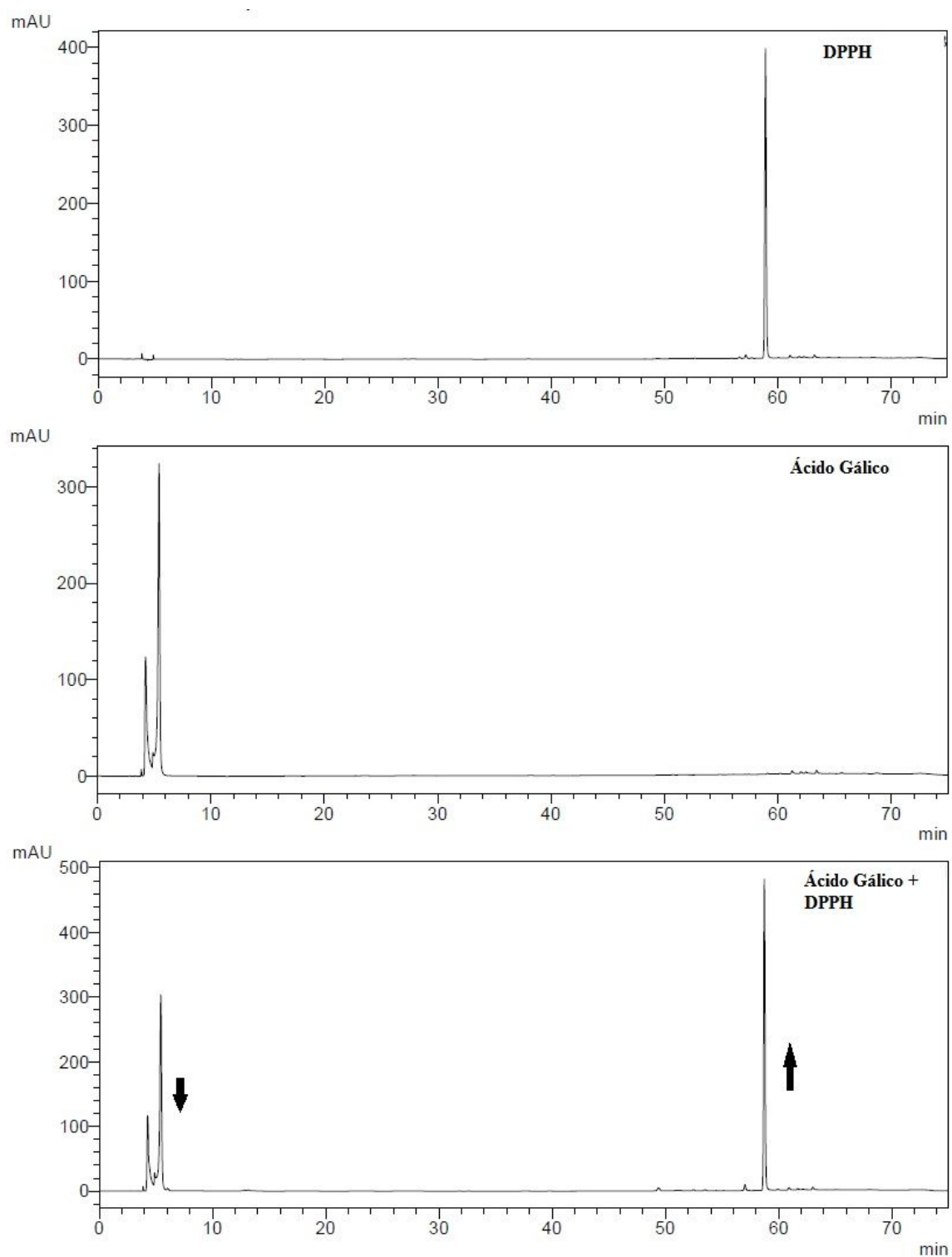
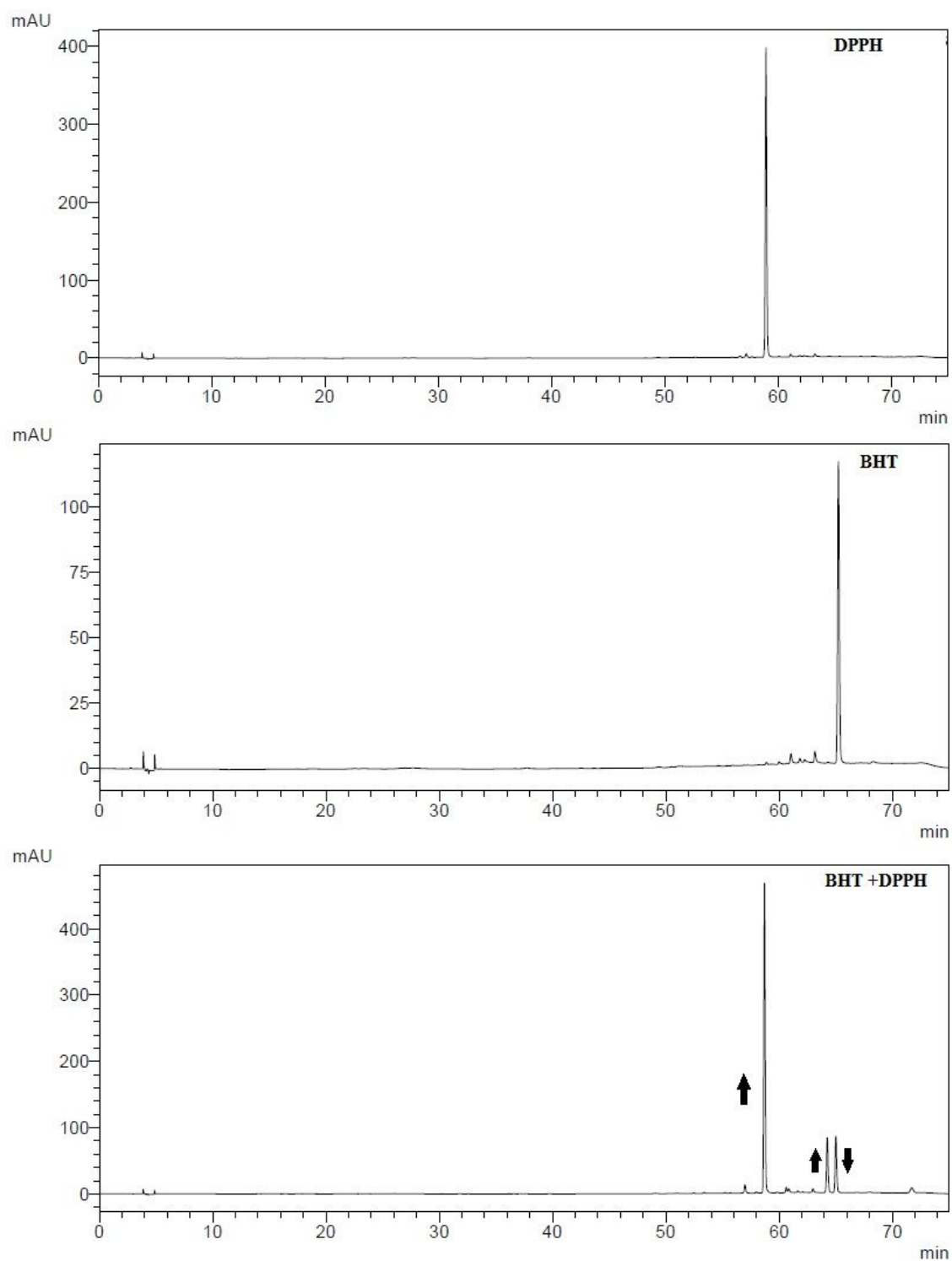


Figura 56 - Cromatogramas do DPPH[•], do BHT e do BHT+DPPH[•] após a reação, por 30 min, em 281 nm.



5.6 Ensaios de capacidade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio

Para os ensaios de capacidade sequestradora de EROs e ERNs, escolheu-se o extrato etanólico (CE), em razão dos melhores resultados apresentados frente às análises de atividade antioxidante com radicais não biológicos. Além disto, a utilização de etanol é mais adequada, em relação aos extratos hexânico e metanólico, para utilização nutracêutica. O ExtFarC apesar de ter apresentado resultados superiores não se torna adequado, visto não conhecermos o processo de extração do mesmo.

Os dados referentes ao extrato CE e aos curcuminoides identificados no extrato em relação à reatividade frente às EROs e ERNs são mostrados a seguir.

O Quadro 15 lista os resultados para atividade sequestradora de EROs para o extrato CE de *C. longa*, os curcuminoides e o controle positivo (quercetina). Nenhuma atividade de inibição em relação ao $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 foi encontrada para o CE e curcuminoides isolados, nas concentrações utilizadas para análise. Concentrações mais elevadas mostraram efeitos diretos dos extratos e curcuminoides, inviabilizando a análise. Entretanto, a falta de atividade do extrato e dos compostos para essas duas espécies pode não ser considerada um aspecto negativo. Algumas espécies reativas são produzidas naturalmente no organismo com funções importantes para o mesmo; apesar dos efeitos danosos, o $O_2^{\bullet-}$ tem importância vital para as células de defesa e sem ele, o organismo pode ficar desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos, ele é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, afim de combater corpos estranhos, assim como o H_2O_2 que também é utilizado pelos fagócitos na produção de ácidos hipoclorosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Desta forma, antioxidantes que não tenham ação contra as duas espécies reativas citadas, mas que possuam capacidade sequestradora seletiva, frente às outras espécies podem se tornar de maior relevância no combate ao estresse oxidativo, sem interferir em funções indispensáveis do organismo, como o sistema de defesa.

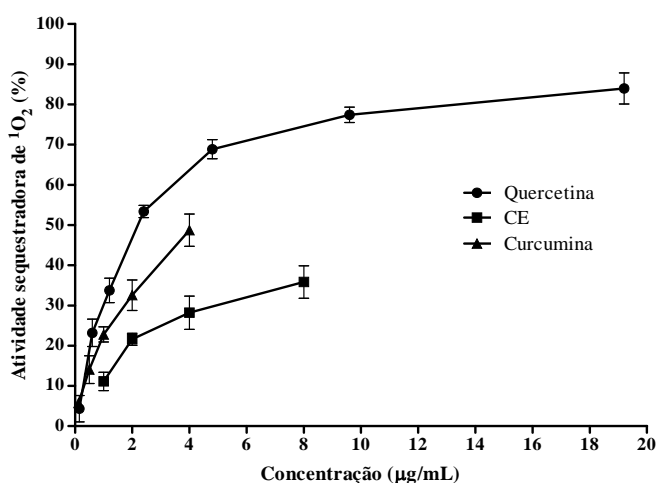
Quadro 15 - Atividade sequestradora de $O_2^{\bullet-}$, HOCl, 1O_2 e H_2O_2 (IC₅₀, média \pm SEM) do CE de *C. longa*, curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina).

Amostra	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)			
	$O_2^{\bullet-}$	HOCl	1O_2	H_2O_2
CE	NA ^{1,88} $\mu\text{g/mL}$	$0,91 \pm 0,11^b$	36%* ⁸ $\mu\text{g/mL}$	NA ⁸ $\mu\text{g/mL}$
Curcumina	NA ^{1,88} $\mu\text{g/mL}$	$0,32 \pm 0,03^a$	49%* ⁴ $\mu\text{g/mL}$	NA ⁴ $\mu\text{g/mL}$
Desmetoxicurcumina	NA ^{1,88} $\mu\text{g/mL}$	$0,27 \pm 0,03^a$	NA ⁴ $\mu\text{g/mL}$	NA ⁴ $\mu\text{g/mL}$
Bisdesmetoxicurcumina	NA ^{1,88} $\mu\text{g/mL}$	$0,26 \pm 0,03^a$	NA ⁴ $\mu\text{g/mL}$	NA ⁴ $\mu\text{g/mL}$
Quercetina	$13,6 \pm 2,5$	$0,20 \pm 0,03^a$	$2,22 \pm 0,10$	318 ± 16

NA^ANenhuma atividade foi encontrada na maior concentração testada (em sobrescrito). *Efeito de sequestro (média %) na maior concentração testada (em sobrescrito). Valores médios seguidos pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente, para $p < 0,05$ no teste de Tukey.

Para o 1O_2 , apenas o extrato CE e a curcumina mostraram resultados positivos, no entanto, apenas 36% e 49% de atividade, respectivamente, nas concentrações mais elevadas que a análise permitiu. Maiores concentrações causavam interferência na análise, não produzindo dados confiáveis (Figura 57). O 1O_2 é uma das formas mais deletérias do oxigênio, entretanto, a sua meia-vida em meio aquoso é muito pequena, pois ele se choca com moléculas de H_2O , desativando-se e retornando à forma de oxigênio tripleto, dessa forma, extratos ou compostos que não tenham atividade ou tenham baixa atividade ainda podem ser considerados como bons antioxidantes, se apresentarem atividade para outras espécies reativas.

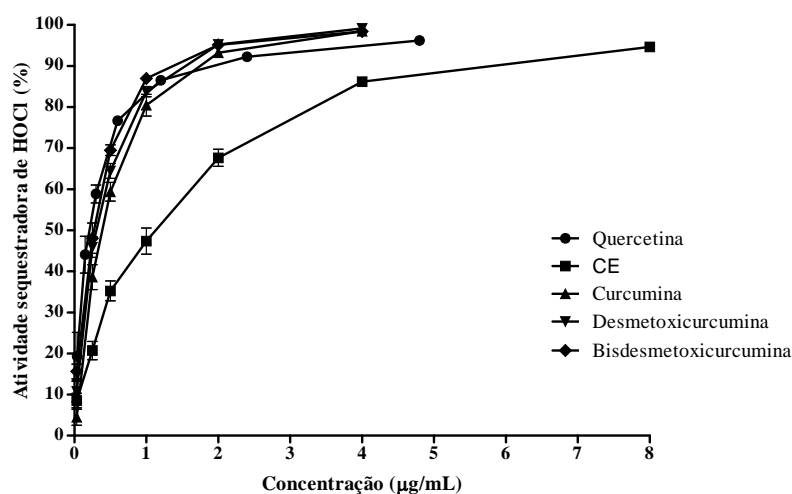
Figura 57 - Atividade sequestradora do extrato CE de *C. longa*, da curcumina e do controle positivo (quercetina) contra o oxigênio singlete (1O_2).



*Cada ponto mostra a média e as barras do erro padrão da média (SEM) e representa os valores obtidos a partir de quatro ensaios realizados em triplicata.

No ensaio de eliminação do HOCl, os curcuminoides mostraram atividade significativa, quando comparados ao controle positivo (quercetina) (Figura 58). O extrato CE apresentou valor mais elevado de IC₅₀ ($0,91 \pm 0,11 \mu\text{g/mL}$) em comparação aos curcuminoides e o controle positivo (quercetina); os curcuminoides mostraram IC₅₀ semelhante entre eles, $0,32 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, $0,27 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ e $0,26 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ para curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina, respectivamente, sem diferença significativa em comparação com o controle positivo ($0,20 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$).

Figura 58 - Atividade sequestradora do extrato CE de *C. longa*, dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ácido hipocloroso (HOCl).



*Cada ponto mostra a média e as barras do erro padrão da média (SEM) e representa os valores obtidos a partir de seis ensaios, realizados em triplicata.

Yue et al. (2014) propôs que o mecanismo de ação contra o HOCl da curcumina seria por meio da metoxila, conforme abordado anteriormente nos mecanismos de ação antioxidante da curcumina frente ao HOCl, entretanto observa-se que a ação contra o HOCl foi similar para os três curcuminoides estudados incluindo a bisdesmetoxicurcumina que não possui as duas metoxilas da curcumina, dessa forma, o mecanismo de ação direto contra o HOCl pode estar relacionado ao grupo CH₂ ou às hidroxilas fenólicas, comuns entre as três moléculas.

Como abordado anteriormente, o HOCl é importante e potente agente no processo de defesa do organismo contra agentes microbianos, porém se o mesmo é produzido de forma exacerbada pode gerar uma série de complicações por reagir com uma série de moléculas,

causando modificações e produzindo outras espécies reativas como já discutido (HAWKINS; PATTISON; DAVIES, 2003; PANASENKO; GORUDKO; SOKOLOV, 2013).

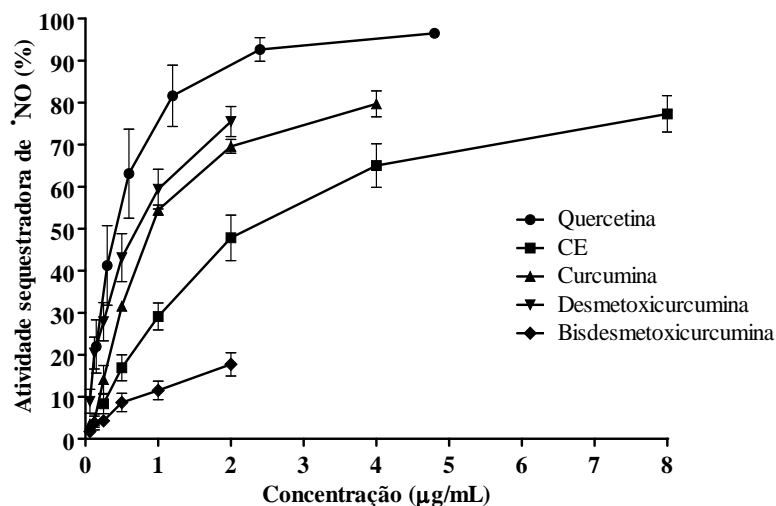
Os resultados para atividade sequestradora de ERNs são mostrados no Quadro 16 e nas Figuras 59, 60 e 61, para o extrato CE de *C. longa*, curcuminoides identificados no extrato e controle positivo (quercetina). Para o $\bullet\text{NO}$, apenas o bisdesmetoxicurcumina não apresentou atividade nas concentrações permitidas para a análise deste composto. O extrato CE apresentou atividade com valor de IC_{50} de $2,43 \pm 0,42 \mu\text{g/mL}$, maior que a quercetina, porém, a curcumina e a desmetoxicurcumina apresentaram valores de $0,98 \pm 0,06$ e $0,71 \pm 0,13 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, sem diferença estatística em comparação com o controle positivo ($0,48 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$).

Quadro 16 - Atividade sequestradora de $\bullet\text{NO}$ e ONOO^- (com e sem 25 mM NaHCO_3) (IC_{50} , média \pm SEM) do CE de *C. longa*, curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina).

Amostra	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	$\bullet\text{NO}$	ONOO^- sem NaHCO_3	ONOO^- com NaHCO_3
CE	$2,43 \pm 0,42^b$	$1,49 \pm 0,35^b$	$0,72 \pm 0,05^b$
Curcumina	$0,98 \pm 0,06^a$	$0,45 \pm 0,11^a$	$0,32 \pm 0,06^a$
Desmetoxicurcumina	$0,71 \pm 0,13^a$	$0,40 \pm 0,07^a$	$0,37 \pm 0,07^a$
Bisdesmetoxicurcumina	NA ² $\mu\text{g/mL}$	$0,88 \pm 0,23^{ab}$	$0,37 \pm 0,05^a$
Quercetina	$0,48 \pm 0,12^a$	$0,29 \pm 0,02^a$	$0,28 \pm 0,05^a$

^{NA}Nenhuma atividade foi encontrada na maior concentração testada (em sobrescrito). Valores médios seguidos pelas mesmas letras em cada coluna não diferem significativamente a $p < 0,05$ no teste de Tukey.

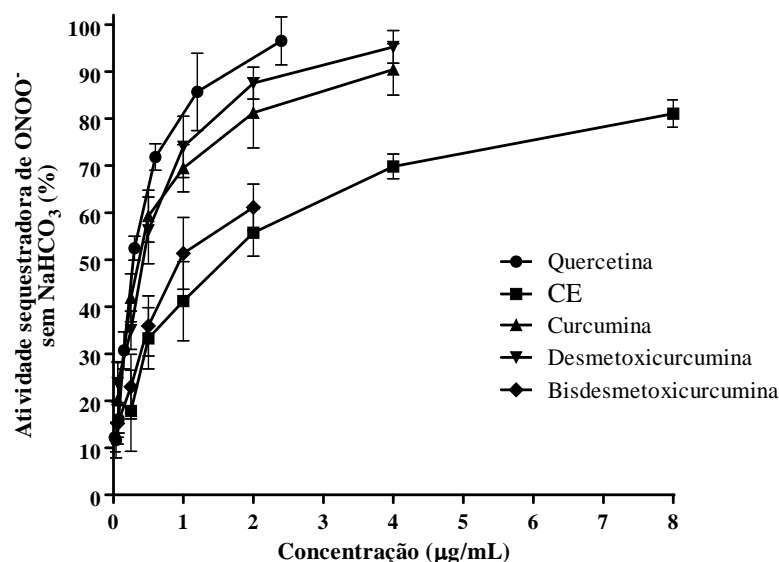
Figura 59 - Atividade sequestradora do extrato CE de *C. longa*, dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o \bullet NO.



*Cada ponto mostra a média e as barras do erro padrão da média (SEM) e representa os valores obtidos a partir de quatro ou mais ensaios realizados em triplicata.

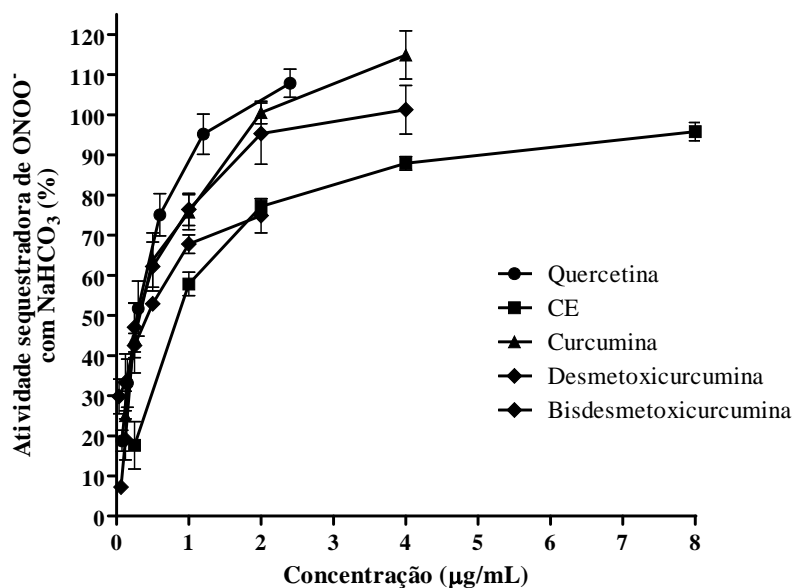
Para a atividade de eliminação do ONOO^- , os ensaios foram realizados com e sem NaHCO_3 . Os ensaios realizados com NaHCO_3 são importantes para simular as concentrações fisiológicas de CO_2 , pois a reação entre o CO_2 e o ONOO^- é predominante (GOMES et al., 2007). Em geral, no ensaio com NaHCO_3 , o extrato CE, os curcuminoides e o controle positivo (quercetina) mostraram valores de IC_{50} mais baixos do que os testes realizados sem NaHCO_3 (Quadro 16). O extrato CE mostrou valor de IC_{50} superior aos curcuminoides e ao controle positivo (quercetina) para ambos os ensaios, mostrando diferença estatística em relação a curcumina, a desmetoxicurcumina e ao controle positivo (quercetina), mas não houve diferença estatística em relação a bisdesmetoxicurcumina para os ensaios sem NaHCO_3 . No entanto, os curcuminoides isolados mostraram uma atividade semelhante à quercetina para ambos os ensaios sem nenhuma diferença estatística do controle positivo em termos de valores de IC_{50} (Quadro 16).

Figura 60 - Atividade sequestradora do extrato CE de *C. longa*, dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ONOO^- , sem NaHCO_3 .



*Cada ponto mostra a média e as barras do erro padrão da média (SEM) e representa os valores obtidos a partir de quatro ou mais ensaios realizados em triplicata.

Figura 61 - Atividade sequestradora do extrato CE de *C. longa*, dos curcuminoides identificados no extrato (curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina) e do controle positivo (quercetina) contra o ONOO^- , com NaHCO_3 .



*Cada ponto mostra a média e as barras de erro padrão da média (SEM) e representa os valores obtidos a partir de quatro ou mais ensaios realizados em triplicata.

A partir da análise dos resultados referentes à captação das EROs e ERNs em relação ao extrato CE de *C. longa* e dos curcuminoides, verifica-se que os curcuminoides apresentam melhores resultados, com valores de IC₅₀ mais baixos que o extrato, sendo os curcuminoides estatisticamente similares ao controle positivo (quercetina) nos ensaios do HOCl, \bullet NO e ONOO⁻. Entretanto ressalta-se que o extrato não tem 100% de curcuminoides como no ensaio realizado com as substâncias puras. Na identificação e quantificação dos curcuminoides por CLAE-UV, o extrato CE apresentou 43,51% de conteúdo em curcuminoides (Quadro 8).

Sadowska-Bartosz; Adamczyk; Bartosz (2014) estudaram a atividade antioxidante de flavonóides contra o ONOO⁻, verificando diferentes eficiências protetoras por varios tipos de ensaios e afirmaram que uma mistura de flavonóides presentes nos alimentos pode ser mais eficaz do que a suplementação com um único flavonóide. Além disso, de um modo geral, porém com exceções perigosas, extratos obtidos de produtos naturais são mais seguros na utilização diária na dieta de humanos e animais, sendo também mais acessíveis, principalmente do ponto de vista econômico, quando comparados com substâncias isoladas e purificadas. Esses dados podem indicar que a utilização do produto natural ou do extrato advindo do mesmo, contra os danos que as EROs e ERNs podem gerar, podem ser a chave para o combate a doenças relacionadas ao desbalanço redox de uma forma simples e segura, podendo haver benefícios de múltiplos compostos de forma individual ou sinérgica, neste caso dos curcuminoides presentes no rizoma de *C. longa*.

No Quadro 17, faz-se a comparação entre valores de IC₅₀ encontrados no presente estudo com valores encontrados por alguns autores que estudaram atividade sequestradora de EROs e ERNs de extratos vegetais, pelos mesmos métodos.

Os valores de IC₅₀ no ensaio de inibição do ácido hipocloroso foram menores que os valores encontrados por Ribeiro et al (2014) para polpa e casca de araçá-rosa, mas com tendência semelhante aos resultados de Chisté et al. (2011) e Berto et al. (2015) para os extratos de colorau e bixina, araçá-rosa e pajurá, respectivamente. Para o \bullet NO e ONOO⁻ (com e sem NaHCO₃) destacam-se os valores de IC₅₀ apresentados pelo extrato CE, quando comparados com os demais. O presente extrato apresentou valores menores quando comparados com os extratos dos demais. Isso indica uma maior atividade do extrato de *C. longa* e dos curcuminoides, indicando maior eficiência no sequestro das espécies reativas em menores concentrações, quando comparadas com outros tipos de plantas.

Quadro 17 - Comparação entre resultados obtidos em relação à capacidade sequestradora do presente estudo, com dados registrados, a partir dos mesmos métodos.

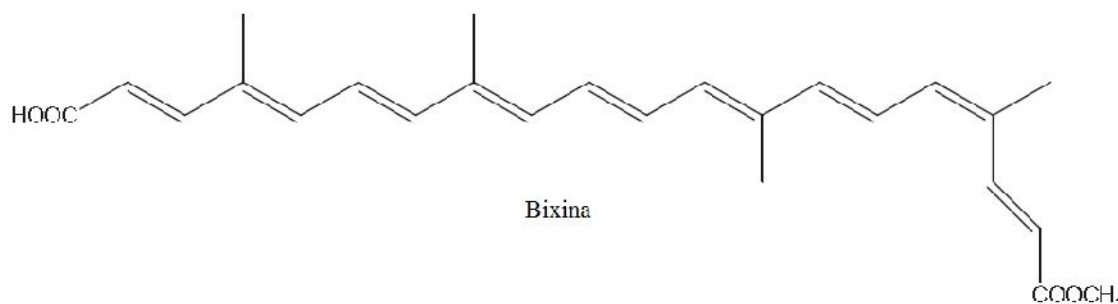
Espécie Reativa	Autora (2016)	Chisté et al. (2011)	Ribeiro et al. (2014)	Berto et al. (2015)
	Amostras			
	Extrato de Açafrão-da-terra (<i>C. longa</i>) e curcuminoides	Extratos de semente de colorau (<i>Bixa orellana</i> L.) e composto bixina	Extratos de polpa e casca de araçá-rosa (<i>Psidium cattleianum</i>)	Extratos de polpa, casca e sementes de pajurá (<i>Couepia bracteosa</i>)
$O_2^{\bullet-}$	NA	NA (extratos) 26,0 $\mu\text{g/mL}$ (bixina)	20,6 – 84 $\mu\text{g/mL}$	NA polpa e casca 11,5 $\mu\text{g/mL}$ semente
HOCl	0,26 – 0,91 $\mu\text{g/mL}$	0,3 – 3,0 $\mu\text{g/mL}$	18,7 – 32 $\mu\text{g/mL}$	0,39 – 47,1 $\mu\text{g/mL}$
1O_2	36% e 49% ^a	1,0 – 19 $\mu\text{g/mL}$	22,8 – 83 $\mu\text{g/mL}$	-
H_2O_2	NA	3 – 47 $\mu\text{g/mL}$	378 – 431 $\mu\text{g/mL}$	29,4% ^b polpa 894 $\mu\text{g/mL}$ casca 426 $\mu\text{g/mL}$ semente
$\bullet\text{NO}$	0,71 – 2,43 $\mu\text{g/mL}$	3 – 9 $\mu\text{g/mL}$	2,2 – 6,8 $\mu\text{g/mL}$	36,1% ^b polpa 485 $\mu\text{g/mL}$ casca 18 $\mu\text{g/mL}$ semente
ONOO^- (sem NaHCO_3)	0,40 – 1,49 $\mu\text{g/mL}$	1 – 7 $\mu\text{g/mL}$	5,6 – 12,1 $\mu\text{g/mL}$	2,64 – 167 $\mu\text{g/mL}$
ONOO^- (com NaHCO_3)	0,32 – 0,72 $\mu\text{g/mL}$	0,4 – 8 $\mu\text{g/mL}$	26 – 55 $\mu\text{g/mL}$	4,9 – 35 $\mu\text{g/mL}$

^{NA} Nenhuma atividade foi encontrada na maior concentração testada.

^a Efeito de sequestro (média %) na maior concentração testada, 8 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

^b Efeito de sequestro (média %) na maior concentração testada, 1000 $\mu\text{g/mL}$

Comparando com o estudo de Chisté et al. (2011), que analisou uma planta utilizada para o mesmo propósito que a *C. longa* se propõe, tempero e corante de alimentos, observa-se similaridade, principalmente quando se analisam os resultados referentes aos compostos puros. A bixina, substância encontrada no colorau é um carotenoide, e como os curcuminoides, a bixina possui ligações duplas conjugadas, grupo metoxila como a curcumina e a desmetoxicurcumina e uma hidroxila, porém não anel fenólico, como os curcuminoides (Figura 62).

Figura 62 - Estrutura da bixina.

Fonte: Chisté et al. (2011).

A comparação dos dados obtidos para os curcuminoides, a quercetina e a bixina, para o sequestro de HOCl (Quadro 17) revelou similaridade entre os compostos, mas há diferenças estruturais entre os compostos. Dessa forma, além das metoxilas propostas, a presença de ligações duplas conjugadas e de hidroxilas, feição comum entre os compostos, indicam como susceptíveis à reação com HOCl (STANI, 2017).

Para as espécies $\bullet\text{NO}$ e ONOO^- , os curcuminoides foram mais ativos que os apresentados por Chisté et al. (2011), apresentando valores de IC_{50} menores. Para essas espécies, o grupo fenólico presente nos curcuminoides e na quercetina, parece exercer papel importante na atividade antioxidante, com maior eficiência no sequestro de $\bullet\text{NO}$ e ONOO^- , que compostos que não possuem essa função.

Os estudos realizados acerca das propriedades funcionais da *C. longa* geralmente atribuem tais funções à curcumina (AKRAM et al., 2010; NAMRATHA et al., 2013; TOKUSOGLU et al., 2015), que sempre é apresentada como composto majoritário nos extratos obtidos do rizoma, independente do lugar de cultivo ou do solvente utilizado na extração (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2002; NAMRATHA et al., 2013; REVATHY et al., 2011). Em relação às propriedades da desmetoxicurcumina e da bisdesmetoxicurcumina, no entanto, os dados são escassos. Essas não são, normalmente, consideradas, em trabalhos sobre extratos de *C. longa*. Entretanto, os presentes dados indicam uma contribuição da desmetoxicurcumina e da bisdesmetoxicurcumina na atividade antioxidante de extratos de *C. longa*.

Inicialmente a análise de DPPH \bullet -CLAE-UV demonstrou uma redução dos picos dos três curcuminoides, sendo a curcumina, de fato, a que apresentou maior percentual de redução, mas houve redução também da desmetoxicurcumina e em menor percentual de

bisdesmetoxicurcumina, indicando atividade apesar de ser em menor escala. Apesar desses resultados, destaca-se que nos ensaios de capacidade sequestradora do HOCl e do ONOO⁻, na ausência e na presença de NaHCO₃, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina apresentaram valores de IC₅₀ que não diferiram estatisticamente da curcumina e do controle positivo (quercetina), indicando assim, uma atividade antioxidante relevante desses compostos frente a essas espécies reativas, de forma direta. No ensaio de captura do •NO, a bisdesmetoxicurcumina não apresentou atividade nas concentrações permitidas para a análise, entretanto a desmetoxicurcumina apresentou valor de IC₅₀, estatisticamente semelhante à curcumina e ao controle positivo.

5.7 Sumário de resultados

Em resumo, o presente estudo evidenciou a capacidade sequestradora de extrato de *C. longa* e dos curcuminoides identificados no rizoma, frente a EROs e ERNs.

Os extratos obtidos a partir do pó do rizoma de *C. longa* com metanol e etanol apresentaram os três curcuminoides descritos na literatura como constituintes da *C. longa*, curcumina, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina e o ExtFarC apresentou curcumina, majoritariamente na sua composição, não sendo detectada a presença de desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina por CLAE-UV.

Os extratos CE e ExtFarC apresentaram maior conteúdo total de fenóis pelo método de Folin-ciocalteu e maior atividade antioxidante pelo método de FRAP e também apresentaram os menores valores de IC₅₀ frente ao DPPH•.

A análise DPPH•-CLAE-UV indicou maior redução dos picos referentes aos compostos curcumina e desmetoxicurcumina dos extratos, indicando maior atividade antioxidante destes compostos frente a este radical.

A curcumina apresentou IC₅₀ similar ao ácido ascórbico e menor que o BHT e o Trolox, mostrando-se mais efetiva que estes compostos na eliminação do DPPH•.

Nos experimentos de capacidade de eliminação das EROs e ERNs, a curcumina, a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina apresentaram atividade semelhante ao controle positivo (quercetina) frente ao HOCl, •NO e ONOO⁻, mostrando-se eficientes de forma direta contra essas espécies. O extrato CE apesar de exibir maiores valores de IC₅₀ para essas espécies, quando comparado aos curcuminoides e ao controle positivo (quercetina),

apresentou valores de IC₅₀ inferiores quando comparados com extratos de outras plantas estudados pelos mesmos métodos.

Dessa forma, os dados expostos acima podem indicar que a utilização dos extratos ou o consumo do alimento na sua forma *in natura*, pode ser de grande relevância na prevenção e no combate a doenças relacionadas ao estresse oxidativo, além de indicar que a desmetoxicurcumina e a bisdesmetoxicurcumina podem ter um papel essencial nos mecanismos de ação antioxidante e assim no combate aos danos oxidativos ocasionados pelas EROs e ERNs.

5.8 Obstáculos

É necessário relatar alguns obstáculos que foram encontrados, durante a execução do trabalho e com isso deixaram respostas não respondidas para as atividades dos extratos e compostos em questão.

Os extratos de *C. longa* e os curcuminoides possuem características químicas que dificultam diversos tipos de análises; como a baixa solubilidade de alguns extratos e dos curcuminoides, que dificultou ensaios em meio aquoso.

Ainda, as moléculas apresentam absorção em uma ampla faixa do espectro UV-Vis e em região em que muitas análises são realizadas, dificultando a aplicação de diversas técnicas, ou, as concentrações possíveis de trabalho foram muito baixas, a ponto de não apresentarem atividade, como aconteceu no ensaio de eliminação do O₂^{•-}.

Assim como na absorção, a fluorescência dos curcuminoides pode influenciar em análises que utilizem a fluorescência como leitura; muitas sondas fluorescentes são utilizadas em análises antioxidantes, como no caso do ensaio da peroxidação lipídica onde o comprimento de excitação e emissão da sonda (Bodipy) utilizada coincidiram com o das amostras (excitação = 581 nm, emissão = 600) (DE OLIVEIRA et al., 2009) e do ensaio de eliminação do ¹O₂, onde não foi possível utilizar concentrações maiores do extrato e dos curcuminoides e assim, não houve atividade, na faixa de concentração trabalhada. Ainda sobre a fluorescência, uma das análises mais comuns para verificar o potencial de compostos e extratos para atividade antiglicante, utiliza a leitura de compostos AGEs fluorescentes (excitação = 355 nm, emissão = 460 nm), não sendo possível determinar a atividade antiglicante dos extratos e compostos, por essa técnica (BEAULIEU et al., 2009).

A impossibilidade da utilização de análises por métodos químicos mais simples e menos dispendiosos que análises em células e *in vivo*, mas que fornecem importantes

informações da atividade biológica dos compostos, acaba deixando lacunas e dúvidas sobre o papel deles na prevenção/tratamento de doenças relacionadas ao desbalanço redox e novos métodos devem ser implantados, ou novas formulações hidrossolúveis ou passíveis de serem administradas, devem ser preparadas, de modo a superar estes obstáculos.

5.9 Perspectivas

Implantar e desenvolver novos métodos de ensaio antioxidantes e antiglicantes, afim de, esclarecer o papel do extrato de *C. longa* e dos curcuminoides referente às análises com limitações ou que não puderam ser realizadas.

Verificar a estabilidade dos compostos isolados, comparando com sua estabilidade como extrato de *C. longa*.

Realizar estudos de formulação em matrizes biodisponíveis e seguras biologicamente, para solucionar o problema da insolubilidade em meio aquoso dos compostos.

Analisar e comparar toxicidade frente a células normais e alteradas dos curcuminoides de forma isolada e do extrato de *C. longa*.

Aplicar a *C. longa* na sua forma *in natura*, extratos e compostos isolados em modelos animais, afim de verificar o papel antioxidante dos mesmos no sistema biológico.

Realizar estudos em humanos com os curcuminoides, extratos e rizoma de *C. longa in natura*, verificando o impacto nas defesas antioxidantes de indivíduos normais e em pacientes acometidos com doenças ligadas ao desbalanço redox.

6 CONCLUSÃO

Apesar dos muitos estudos realizados sobre a *C. longa*, ainda existe campo para investigações, no tocante, principalmente, à definição sobre qual constituinte é realmente o mais importante em termos de atividade biológica. Como mostrado no presente trabalho, frente, sobretudo, a espécies reativas biologicamente importantes, os curcuminoides principais são ativos e não apenas a curcumina, o que valoriza o uso do pó de *Curcuma* e seus respectivos extratos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-LATEEF, E. et al. Bioactive chemical constituents of *Curcuma longa L.* rhizomes extract inhibit the growth of human hepatoma cell line (HepG2). **Acta Pharmaceutica**, v. 66, n. 3, p. 387–398, 2016.
- AGGARWAL, B. et al. Prevention and treatment of colorectal cancer by natural agents from mother nature. **Current Colorectal Cancer Reports**, v. 9, n. 1, p. 37–56, 2013.
- AKRAM, M. et al. *Curcuma longa* and Curcumin: a Review Article. **Rom. J. Biol. – Plant Biol.**, v. 55, n. 2, p. 65–70, 2010.
- ALEXANDROW, M. G. et al. Curcumin. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 21, n. 5, p. 407–412, 2012.
- ALI, S. S. et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p. 1–15, 2008.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- AMATORE, C.; ARBAULT, S. Oxidative Stress at the Single Cell Level. In: MICHAEL, A.C.; BORLAND, L.M. (editores). **Electrochemical Methods for Neuroscience**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- AMORATI, R.; VALGIMIGLI, L. Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants. **Free Radical Research**, v. 49, n. 5, p. 633–649, 2015.
- ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, n. 11, p. 1590–1611, 2008.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.
- ANUBALA, S.; SEKAR, R.; NAGAIAH, K. Development and validation of an analytical method for the separation and determination of major bioactive curcuminoids in *Curcuma longa* rhizomes and herbal products using non-aqueous capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 123, p. 10–17, 2014.
- AOUACHERI, O. et al. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, n. 1, p. 44–49, 2015.
- ARYA, N. et al. Variation in antioxidant potential of *Curcuma longa L.* collected from different ecological niches of western Himalayan region. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 7, p. 85–89, 2015.
- AVCI, G. et al. Curcumin Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Skeletal Muscle. **Journal of Surgical Research**, v. 172, n. 1, p. 39–46, 2012.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BALIGA, M. S. et al. Curcumin, an active component of turmeric in the prevention and treatment of ulcerative colitis: preclinical and clinical observations. **Food & Function**, v. 3, n. 11, p. 1109–1117, 2012.

BARBOSA, J. H. P. et al. Determination of advanced glycation (AGEs) and lipoxidation (ALEs) end products in foods and biological systems: advances, challenges and perspectives. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608–620, 2016.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453–460, 2014.

BARCLAY, L. R. et al. On the antioxidant mechanism of curcumin: classical methods are needed to determine antioxidant mechanism and activity. **Organic letters**, v. 2, n. 18, p. 2841–2843, 2000.

BARIK, A. et al. Evaluation of a new copper(II)–curcumin complex as superoxide dismutase mimic and its free radical reactions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 39, n. 6, p. 811–822, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BEAULIEU, L.-P. et al. Inhibitory effect of the cree traditional medicine wiishichimanaanh (*Vaccinium vitis-idaea*) on advanced glycation endproduct formation: identification of active principles. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 21, p. 741–747, 2009.

BECHARA, E. J. H.; VIVIANI, V. R. Living Light in the Darkness: Facts and Stories. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 3–40, 2015.

BERTO, A. et al. Bioactive compounds and scavenging capacity of pulp, peel and seed extracts of the Amazonian fruit *Quararibea cordata* against ROS and RNS. **Food Research International**, v. 77, p. 236–243, 2015.

BHAGAVATHULA, N. et al. A combination of curcumin and ginger extract improves abrasion wound healing in corticosteroid-impaired hairless rat skin. **Wound Repair and Regeneration**, v. 17, n. 3, p. 360–366, 2009.

BOUDIER, A. et al. High-performance liquid chromatographic method to evaluate the hydrogen atom transfer during reaction between 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl radical and antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 711, p. 97–106, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRANEN, A. L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 52, n. 2, p. 59–63, 1975.

BRASH, A. R. Lipxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 34, p. 23679–23682, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Anvisa - Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. 48p., 2001.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BRUCK, R. et al. Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. **Liver International**, v. 27, n. 3, p. 373–383, 2007.

CAMATARI, F. et al. Antioxidant Potential of Flours from Cereals, Tubers, Beans and Seeds Chemical Profile of *Curcuma longa* Flour. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 6, n. 2, p. 7–12, 2016.

CAMPOS, F. M. et al. Estabilidade de compostos antioxidantes em hortaliças processadas: uma revisão. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 481–490, 2008.

CASTELLANO, G.; TENA, J.; TORRENS, F. Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of *Posidonia oceanica* (L.) delile. **MATCH: Communications in Mathematical and in Computer Chemistry**, v. 67, p. 231–250, 2012.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 1, p. 173–187, 2011.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. DE; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHAVARRIA, D. F. **Desenvolvimento de Novos Antioxidantes Lipofílicos como Solução Terapêutica para Doenças Neurodegenerativas**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em em Bioquímica) - Universidade do Porto, PO, 2014.

CHISTÉ, R. C. et al. *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

CICCO, N. et al. A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 107–110, 2009.

COHLY, H. H. . et al. Effect of Turmeric, Turmerin and Curcumin on H₂O₂-Induced Renal Epithelial (LLC-PK1) Cell Injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 24, n. 1, p. 49–54, 1998.

COSTA, D. et al. New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, n. 6, p. 2071–2081, 2007.

COUSINS, M. et al. Antioxidant capacity of fresh and dried rhizomes from four clones of turmeric (*Curcuma longa L.*) grown *in vitro*. **Industrial Crops and Products**, v. 25, n. 2, p. 129–135, 2007.

DALL'ACQUA, S. et al. Changes in urinary metabolic profile after oral administration of curcuma extract in rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 100, p. 348–356, 2014.

DAMASCENO, J. P. L. et al. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 395–400, 2015.

DANCIU, C. et al. Evaluation of phenolic profile, antioxidant and anticancer potential of two main representants of *Zingiberaceae* family against B164A5 murine melanoma cells. **Biological Research**, v. 48, n. 1, p. 1–9, 2015.

DE OLIVEIRA, A. C. et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 469–475, 2009.

ERGIN, V. Carbonyl Stress in Aging Process: Role of Vitamins and Phytochemicals as Redox Regulators. **Aging and Disease**, v. 4, n. 5, p. 276–294, 2013.

ESATBEYOGLU, T. et al. Curcumin-From Molecule to Biological Function. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 51, n. 22, p. 5308–5332, 2012.

ESATBEYOGLU, T. et al. Thermal stability, antioxidant, and anti-inflammatory activity of curcumin and its degradation product 4-vinyl guaiacol. **Food Funct.**, v. 6, n. 3, p. 887–893, 2015.

EVERETTE, J. D. et al. Thorough Study of Reactivity of Various Compound Classes toward the Folin-Ciocalteu Reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8139–8144, 2010.

FARHANGKHOEE, H. et al. Differential effects of curcumin on vasoactive factors in the diabetic rat heart. **Nutrition & Metabolism**, v. 3, n. 27, 8p., 2006.

FAROMBI, E. O. et al. Curcumin and Kolaviron Ameliorate Di-n-Butylphthalate-Induced Testicular Damage in Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 100, n. 1, p. 43–48, 2007.

FAROMBI, E. O. et al. Curcumin attenuates dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats through Nrf2-mediated induction of heme oxygenase-1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 4, p. 1279–1287, 2008.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239–247, 2000.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, n. 1, p. 8–23, 2009.

FURTMÜLLER, P. G. et al. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide and chloride ion. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 19, p. 5858–5864, 2000.

GARAGUSO, I.; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 336–342, 2015.

GIANNESSE, F. et al. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 14, n. 11, p. 237-242, 2008.

GLIGOROVSKI, S. et al. Environmental implications of hydroxyl radicals (HO[•]). **Chemical Reviews**, v. 115, n. 24, p. 13051–13092, 2015.

GOMES, A. et al. 2-Styrylchromones: Novel strong scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6027–6036, 2007.

GÜLÇİN, . Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 803–811, 2006.

HANAI, H.; SUGIMOTO, K. Curcumin has bright prospects for the treatment of inflammatory bowel disease. **Current pharmaceutical design**, v. 15, n. 18, p. 2087–2094, 2009.

HATCHER, H. et al. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 11, p. 1631–1652, 2008.

HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3, p. 259–274, 2003.

HENNING, C.; GLOMB, M. A. Pathways of the Maillard reaction under physiological conditions. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 4, p. 499–512, 2016.

HIRUN, S.; UTAMA-ANG, N.; ROACH, P. D. Turmeric (*Curcuma longa L.*) drying: an optimization approach using microwave-vacuum drying. **Journal of food science and technology**, v. 51, n. 9, p. 2127–33, 2014.

HOLT, P. R.; KATZ, S.; KIRSHOFF, R. Curcumin Therapy in Inflammatory Bowel Disease: A Pilot Study. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, n. 11, p. 2191–2193, 2005.

HONG, J. H. et al. The effects of curcumin on the invasiveness of prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. **Prostate Cancer and Prostatic Diseases**, v. 9, n. 2, p. 147–152, 2006.

HUANG, W.; ZHANG, X.; CHEN, W. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review). **Biomedical Reports**, v. 4, n. 5, p. 519–522, 2016.

HUANG, Z. et al. Curcumin reverses corticosterone-induced depressive-like behavior and decrease in brain BDNF levels in rats. **Neuroscience Letters**, v. 493, n. 3, p. 145–148, 2011.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin–Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1811–1815, 2003.

ISMAEL, F. O. et al. Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants HOCl and HOSCN with low-density lipoprotein (LDL): Implications for foam cell formation in atherosclerosis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 573, p. 40–51, 2015.

ITO, N. et al. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, n. 2, p. 343–52, 1983.

JAGETIA, G. C.; RAJANIKANT, G. K. Acceleration of wound repair by curcumin in the excision wound of mice exposed to different doses of fractionated radiation. **International Wound Journal**, v. 9, n. 1, p. 76–92, 2012.

JAYAPRAKASHA, G. K.; RAO, L. J. M.; SAKARIAH, K. K. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 13, p. 3668–3672, 2002.

JEE, S.-H. et al. Curcumin Induces a p53-Dependent Apoptosis in Human Basal Cell Carcinoma Cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 111, n. 4, p. 656–661, 1998.

JEITNER, T. M. et al. Linking Inflammation and Parkinson Disease: Hypochlorous Acid Generates Parkinsonian Poisons. **Toxicological Sciences**, v. 151, n. 2, p. 388–402, 2016.

JONES, P.; SUGGETT, A. The catalase–hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations. **Biochemical Journal**, v. 110, n. 4, p. 617–620, 1968.

JURENKA, J. S. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: A review of preclinical and clinical research. **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 2, p. 141–153, 2009.

KAKKAR, V.; KAUR, I. P. Evaluating potential of curcumin loaded solid lipid nanoparticles in aluminium induced behavioural, biochemical and histopathological alterations in mice brain. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2906–2913, 2011.

KALAPOPOS, M. P. Methylglyoxal in living organisms. **Toxicology Letters**, v. 110, n. 3, p. 145–175, 1999.

KALOGIANNIS, M.; DELIKATNY, E. J.; JEITNER, T. M. Serotonin as a putative scavenger of hypohalous acid in the brain. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1862, n. 4, p. 651–661, 2016.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 244–257, 2013.

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. **Food Analytical Methods**, v. 2, n. 1, p. 41–60, 2009.

KARIOTI, A. et al. Analysis and stability of the constituents of *Curcuma longa* and *Harpagophytum procumbens* tinctures by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 3, p. 479–486, 2011.

KESI, A.; IBRIŠIMOVIĆ, N.; MEHMEDINOVIĆ, N.; ŠESTAN, A. Phytochemical Profile of Honey. In: RAO, A. V.; RAO, L. G. (editores). **Phytochemicals - Isolation, Characterisation and Role in Human Health**. InTech, 2015.

Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/phytochemicals-isolation-characterisation-and-role-in-human-health/phytochemical-profile-of-honey>

KIM, H. J. et al. Curcumin dye extracted from *Curcuma longa L.* used as sensitizers for efficient dye-sensitized solar cells. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 8, n. 6, p. 8320–8328, 2013.

KRASUSKA, U. et al. meta-Tyrosine induces modification of reactive nitrogen species level, protein nitration and nitrosogluthathione reductase in tomato roots. **Nitric Oxide**, no prelo, 2016.

KRUMOVA, K.; COSA, G. Overview of Reactive Oxygen Species. In: NONELL, S.; FLORS, C. (editores). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences**. Vol. 1. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016.

KRUP, V.; PRAKASH L, H.; A, H. Pharmacological Activities of Turmeric (*Curcuma longa linn*): A Review. **Journal of Homeopathy & Ayurvedic Medicine**, v. 2, n. 4, p. 1–4, 2013.

KUMAR, A. et al. Antioxidant efficacy and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa L.*) flower. **International Journal of Current Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 3, p. 112–114 2016.

KUMAR, G. S. et al. Free and bound phenolic antioxidants in amla (*Embllica officinalis*) and turmeric (*Curcuma longa*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 5, p. 446–452, 2006.

LANTZ, R. C. et al. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6–7, p. 445–452, 2005.

LEE, J.; KOO, N.; MIN, D. B. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, n. 1, p. 21–33, 2004.

LEV-ARI, S. Curcumin synergistically potentiates the growth-inhibitory and pro-apoptotic effects of celecoxib in osteoarthritis synovial adherent cells. **Rheumatology**, v. 45, n. 2, p. 171–177, 2005.

LI, X. et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediate the lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in human gingival fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 347, n. 1, p. 212–221, 2016.

LI, Y.; CHEN, Z.; LI, Y. Effects of curcumin on the epithelial mesenchymal transition and TGF-beta/Smads signaling pathway in unilateral ureteral obstruction rats. **Chinese journal of integrated traditional and Western medicine**, v. 31, n. 9, p. 1224–1228, 2011.

LIM, K. J. et al. A polymeric nanoparticle formulation of curcumin inhibits growth, clonogenicity and stem-like fraction in malignant brain tumors. **Cancer biology & therapy**, v. 11, n. 5, p. 464–473, 2011.

LIN, S.-S. et al. Curcumin inhibits the migration and invasion of human A549 lung cancer cells through the inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 127–133, 2009.

LIU, L. et al. Curcumin protects brain from oxidative stress through inducing expression of UCP2 in chronic cerebral hypoperfusion aging-rats. **Molecular Neurodegeneration**, v. 7 Suppl 1, n. S10, 2012.

LIU, Y.; NAIR, M. G. *Curcuma longa* and *Curcuma mangga* leaves exhibit functional food property. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 634–640, 2012.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LONG, Y. et al. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa L.* by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 5, p. 325–330, 2014.

LOPACHIN, R. M.; GAVIN, T. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 1081–1091, 2014.

LÜ, J. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 4, p. 840–860, 2010.

LÜER, S. et al. Topical curcumin can inhibit deleterious effects of upper respiratory tract bacteria on human oropharyngeal cells *in vitro*: potential role for patients with cancer therapy induced mucositis? **Supportive Care in Cancer**, v. 19, n. 6, p. 799–806, 2011.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.

MADHAVI, K.; KUMAR, R. *In vivo* toxicological evaluation of organophosphate pesticide on female albino mice: therapeutic effect of curcumin. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 9, p. 86–92, 2010.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, n. 1, p. 1–19, 2008.

MAHESH, T.; SRI BALASUBASHINI, M. M.; MENON, V. P. Photo-irradiated curcumin supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats: effect on lipid peroxidation. **Therapie**, v. 59, n. 6, p. 639–44, 2004.

MALASONI, R.; SRIVASTAVA, A. Development and validation of improved HPLC method for the Quantitative determination of Curcuminoids in Herbal Medicament. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, n. February, p. 88–91, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51. Disponível em: <http://www.defesaagropecuaria.sp.gov.br/www/legislacoes/popup.php?action=view&idleg=665> Acesso em: 22.04.2016.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. Composition and antimalarial activity of extracts of *Curcuma longa* L. obtained by a combination of extraction processes using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 119, p. 122–129, 2017.

MATHURIA, N.; VERMA, R. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced toxicity in mice spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 3, p. 775–780, 2008.

MESSNER, D. J.; SIVAM, G.; KOWDLEY, K. V. Curcumin reduces the toxic effects of iron loading in rat liver epithelial cells. **Liver International**, v. 29, n. 1, p. 63–72, 2009.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016.

MORIMOTO, T. et al. The dietary compound curcumin inhibits p300 histone acetyltransferase activity and prevents heart failure in rats. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 3, p. 868–878, 2008.

MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox Biology**, v. 6, p. 617–639, 2015.

NA, L.-X. et al. Curcumin improves insulin resistance in skeletal muscle of rats. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 7, p. 526–533, 2011.

NAMRATHA, K. et al. Antioxidant and Anticancer effects of curcumin – A Review. **Ça da Tip Dergisi**, v. 3, n. 2, p. 136–143, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NG, C. F. et al. The rate of cellular hydrogen peroxide removal shows dependency on GSH: Mathematical insight into *in vivo* H₂O₂ and GPx concentrations. **Free Radical Research**, v. 41, n. 11, p. 1201–1211, 2007.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–25, 2001.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos fenton e foto-fenton. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 400–408, 2007.

NONN, L.; DUONG, D.; PEEHL, D. M. Chemopreventive anti-inflammatory activities of curcumin and other phytochemicals mediated by MAP kinase phosphatase-5 in prostate cells. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 6, p. 1188–1196, 2007.

NOORAFSHAN, A. et al. Ameliorative effects of curcumin on the structural parameters of seminiferous tubules and Leydig cells in metronidazole-treated mice: A stereological approach. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 63, n. 7–8, p. 627–633, 2011.

NOORAFSHAN, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. A Review of Therapeutic Effects of Curcumin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 11, p. 2032–2046, 2013.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLMOS, A.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S. Drugs modulating the biological effects of peroxynitrite and related nitrogen species. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 1, p. 1–64, 2007.

OMENA, C. M. B. et al. Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 334–344, 2012.

PANASENKO, O. M.; GORUDKO, I. V.; SOKOLOV, A. V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, n. 13, p. 1466–1489, 2013.

PARK, B.-S. et al. *Curcuma longa* L. Constituents Inhibit Sortase A and Staphylococcus aureus Cell Adhesion to Fibronectin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9005–9009, 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v. 39, n. 7, p. 791–800, 2006.

PETEU, S. F.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Nitro-oxidative species *in vivo* biosensing: Challenges and advances with focus on peroxynitrite quantification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 58, p. 359–373, 2014.

PRASAD, S.; TYAGI, A. K.; AGGARWAL, B. B. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice. **Cancer Research and Treatment**, v. 46, n. 1, p. 2–18, 2014.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 797–810, 2015.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 2005.

PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 10, n. 2, p. 81–95, 2009.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

PULIDO-MORAN, M. et al. Curcumin and Health. **Molecules**, v. 21, n. 3, 22p., 2016.

PURKAYASTHA, S. et al. Curcumin blocks brain tumor formation. **Brain Research**, v. 1266, p. 130–138, 2009.

QIU, P. et al. Overdose Intake of Curcumin Initiates the Unbalanced State of Bodies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 13, p. 2765–2771, 2016.

QUIDEAU, S. et al. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J. Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. **Glycoconjugate Journal**, v. 33, n. 4, p. 513–525, 2016.

REIS GIADA, M. DE L. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In: MORALES-GONZÁLEZ, J. A. (editor). **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**. InTech, 2013.

Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/food-phenolic-compounds-main-classes-sources-and-their-antioxidant-power>

REUTERS, T. **Web of Science**. Disponível em: <<https://webofknowledge.com/>>. Acesso em: 03.03. 2017.

REVATHY, S. et al. Isolation , Purification and Identification of Curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.) by Column Chromatography. **Journal of Experimental Sciences**, v. 2, n. 7, p. 21–25, 2011.

RIBEIRO, A. B. et al. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient *in vitro* scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 165, p. 140–148, 2014.

RIBEIRO, D. et al. Modulation of human neutrophils' oxidative burst by flavonoids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 280–292, 2013.

ROHMAN, A. Analysis of curcuminoids in food and pharmaceutical products. **International Food Research Journal**, v. 19, n. 1, p. 19–27, 2012.

ROSELLÓ, D. M. et al. Oxidative stress and hippocampus in a low-grade hepatic encephalopathy model: protective effects of curcumin. **Hepatology Research**, v. 38, n. 11, p. 1148–1153, 2008.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; ADAMCZYK, R.; BARTOSZ, G. Protection against peroxynitrite reactions by flavonoids. **Food Chemistry**, v. 164, p. 228–233, 2014.

SALEM, M.; ROHANI, S.; GILLIES, E. R. Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery. **RSC Advances**, v. 4, n. 21, p. 10815, 2014.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 153–166, 2007.

SEMCHYSHYN, H. M. Reactive Carbonyl Species *In Vivo*: Generation and Dual Biological Effects. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHAHIDI, F.; HO, C.-T. Phenolics in Food and Natural Health Products: An Overview. In: SHAHIDI, F.; HO, C. (editores). Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products. Vol. 909. American Chemical Society, P. 1–8, 2005.

SHANKAR, T. N. et al. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. **Indian journal of experimental biology**, v. 18, n. 1, p. 73–5, 1980.

SHARMA, S. et al. Dietary curcumin supplementation counteracts reduction in levels of molecules involved in energy homeostasis after brain trauma. **Neuroscience**, v. 161, n. 4, p. 1037–1044, 2009.

SHARMA, S.; KULKARNI, S. K.; CHOPRA, K. Curcumin, the active principle of turmeric (*Curcuma longa*), ameliorates diabetic nephropathy in rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, n. 10, p. 940–945, 2006.

SHUKLA, P. K. et al. Anti-ischemic Effect of Curcumin in Rat Brain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 6, p. 1036–1043, 2008.

SIES, H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SILVA, N. DA et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4^a ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SINGH, M.; SINGH, N. Curcumin counteracts the proliferative effect of estradiol and induces apoptosis in cervical cancer cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 347, n. 1, p. 1–11, 2011.

SONI, K. B.; KUTTAN, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. **Indian journal of physiology and pharmacology**, v. 36, n. 4, p. 273–5, 1992.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1755–1774, 2008.

SPICKETT, C. M. et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. **Acta biochimica Polonica**, v. 47, n. 4, p. 889–99, 2000.

STANI, Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 1–12, 2017.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁK, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, v. 71, n. 4, p. 1741–1751, 2007.

SUBRAMANIAN, R.; SUBBRAMANIYAN, P.; RAJ, V. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power. **SpringerPlus**, v. 2, n. 28, p.1-11, 2013.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumina, o pó dourado do açafreão-da-terra: introspecções sobre química e atividades biológicas. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015.

SURYANARAYANA, P. et al. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 13, n. 12, p. 286-292, 2007.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American journal of physiology - Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 6, p. 1005-1028, 2000.

THONGCHAI, W.; LIAWRUANGRATH, B.; LIAWRUANGRATH, S. Flow injection analysis of total curcuminoids in turmeric and total antioxidant capacity using 2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl assay. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 494–499, 2009.

TIAN, M. et al. Curcumin promotes cholesterol efflux from brain through LXR/RXR-ABCA1-apoA1 pathway in chronic cerebral hypoperfusion aging-rats. **Molecular Neurodegeneration**, v. 7 Suppl 1, n. S7, 2012.

TOKUSOGLU, O. et al. Turmeric Curcuminoid Polyphenolics as Antioxidant and Anticarcinogenic Agents. **Natural Science and Discovery**, v. 1, n. 3, p. 56-61, 2015.

TRUJILLO, J. et al. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 448–456, 2013.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.

UHLENHUT, K.; HÖGGER, P. Pitfalls and limitations in using 4,5-diaminofluorescein for evaluating the influence of polyphenols on nitric oxide release from endothelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 11–12, p. 2266–2275, 2012.

USDA, The United States Department of Agriculture. **Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Curcuma* L.** Disponível em:

<<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=CURCU>>.

Acesso em: 20.01. 2016.

VAN NONG, H. et al. Fabrication and vibration characterization of curcumin extracted from turmeric (*Curcuma longa*) rhizomes of the northern Vietnam. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1147, p. 1–9, 2016.

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

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. sup1, p. 3–27, 2013.

WANG, H. Development of fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 181–202, 2016.

WANG, L. et al. An Anticancer Effect of Curcumin Mediated by Down-Regulating Phosphatase of Regenerating Liver-3 Expression on Highly Metastatic Melanoma Cells. **Molecular Pharmacology**, v. 76, n. 6, p. 1238–1245, 2009.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 240–248, 2009.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytoprotective, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4–5, p. 434–456, 1998.

WONDRAK, G. T. et al. Identification of α -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 361–373, 2002.

WU, P. et al. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 194–202, 2015.

XU, J. et al. Absolute Configurations and NO Inhibitory Activities of Terpenoids from *Curcuma longa*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5805–5812, 2015.

YOUSEF, M. I. et al. Potential protective effects of quercetin and curcumin on paracetamol-induced histological changes, oxidative stress, impaired liver and kidney functions and haematotoxicity in rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 11, p. 3246–3261, 2010.

YOUSEF, M. I.; EL-DEMERDASH, F. M.; RADWAN, F. M. E. Sodium arsenite induced biochemical perturbations in rats: Ameliorating effect of curcumin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 3506–3511, 2008.

YU, E. P. K.; BENNETT, M. R. Mitochondrial DNA damage and atherosclerosis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 25, n. 9, p. 481–487, 2014.

YUE, Y. et al. The application of natural drug-curcumin in the detection hypochlorous acid of real sample and its bioimaging. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 202, p. 551–556, 2014.

ZAGO, A. S.; ZANESCO, A. Óxido nítrico, doenças cardiovasculares e exercício físico. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, n. 6, p. 264–270, 2006.

ZHANG, Y. et al. Target-guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by offline coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 2, p. 191–196, 2011.

ZHAO, H.-M. et al. Curcumin Suppressed Activation of Dendritic Cells via JAK/STAT/SOCS Signal in Mice with Experimental Colitis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 25, p.1-11, 2016.

ZHENG, L.; TONG, Q.; WU, C. Growth-inhibitory effects of curcumin on ovary cancer cells and its mechanisms. **Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical sciences]**, v. 24, n. 1, p. 55–58, 2004.

ANEXOS

ANEXO A: Laudo do ExtFarC adquirido da Fagron



CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.1.01284-7
Aut.Especial de Funcionamento M.S.1.10238-0

Página 17/22
Impressão 29/08/14 16:59
NF. 014.012 de 29/08/2014

Insumo: **CURCUMA LONGA EXTRATO SECO**

Lote : 14052503A
Lote Fab: CJH20140318
Formula : NADA CONSTA

Origem : China
Procedencia : Hong Kong
PM : N/A
CAS : N/A

Fabric : 03/2014
Validade : 03/2017
Frac : 468314 01/07/2014


Ensaio	Especificação	Resultado	Referencia
* DESCRIÇÃO	PÓ FINO LARANJA, COM ODOR CARACTERÍSTICO	PÓ FINO LARANJA, COM ODOR CARACTERÍSTICO	FABRICANTE
* SOLUBILIDADE	INSOLÚVEL EM ÁGUA	CONFORME	FABRICANTE
* UMIDADE	MÁXIMO: 5,0%	0,26%	FABRICANTE
IDENTIFICAÇÃO	HPTLC	CONFORME	FABRICANTE
* CINZAS TOTAIS	MÁXIMO: 5,0%	0,15%	FABRICANTE
* SOLVENTE RESIDUAL	ETANOL: 5000 ppm	1389,41 ppm	FABRICANTE
* SOLVENTE RESIDUAL	METANOL: 3000 ppm	144,25 ppm	FABRICANTE
IMPUREZAS ELEMENTARES	CHUMBO: MÁXIMO 3 mg/Kg	0,0450 mg/Kg	FABRICANTE
IMPUREZAS ELEMENTARES	ARSÊNICO: MÁXIMO 2 mg/Kg	0,0156 mg/Kg	FABRICANTE
IMPUREZAS ELEMENTARES	CÁDMIO: MÁXIMO 1 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg	FABRICANTE
IMPUREZAS ELEMENTARES	MERCÚRIO: MÁXIMO 0,1 mg/Kg	< 0,01 mg/Kg	FABRICANTE
GRANULOMETRIA	PASSA 100% NA MALHA 80	CONFORME	FABRICANTE
* TEOR (BASE ANIDRA)	CURCUMINÓIDES: MÍNIMO 96,0%	98,80%	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS: MÁXIMO 1000 UFC/g	< 100 UFC/g	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	FUNGOS E LEVEDURAS: MÁXIMO 100 UFC/g	< 10 UFC/g	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	SALMONELLA: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* MICROBIOLOGIA	ESCHERICHIA COLI: NEGATIVO	NEGATIVO	FABRICANTE
* DENSIDADE APARENTE	INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,36 g/mL	MET.GERAL FB V

NOMENCLATURA : CURCUMA LONGA EXTRATO SECO
OBSERVAÇÃO : NOME DA PLANTA: CURCUMA LONGA
PARTE DA PLANTA UTILIZADA: RAIZ

Ficha de Segurança

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DO CALOR E UMIDADE

OBS (*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA CNPJ: 44.015.477/0006-20 e os demais ensaios foram transcritos conforme o Certificado de Análise do Fabricante


Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales
Farmacêutica Responsável Técnica
CRF-SP:65.711

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

R Jose Semiao Rodrigues Agosti,1370
Cep 06833-300 Centro Log. Embu - SP

Fone 11 4785-5800
www.fagron.com.br

ANEXO B: Quadro Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos. Quantidade inoculada da amostra: 1:10, 1:100 e 1:1000g ou mL.

Combinação de tubos +	NMP/g ou mL	Intervalo de confiança 95%		Combinação de tubos +	NMP/g ou mL	Intervalo de confiança 95%	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<0,3	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: Silva et al. (2010)