

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO AQUOSO DA SALSA CRESPA (*Petroselinum crispum* var.
crispum)**

Neide Mara de Menezes Epifanio

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO
EXTRATO AQUOSO DA SALSA CRESPA (*Petroselinum crispum* var.
***crispum*)**

NEIDE MARA DE MENEZES EPIFANIO

Sob a Orientação do Professor

Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do grau de **Doutora em Química**,
no Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração em
Química

Seropédica, RJ

Dezembro, 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

E64c Epifanio, Neide Mara de Menezes, 1981-
Caracterização química e atividade antioxidante do extrato aquoso da salsa crespa (*Petroselinum crispum* var. *crispum*) / Neide Mara de Menezes Epifanio. - Seropédica, 2020.
172 f.: il.
Orientador: Douglas Siqueira de Almeida Chaves.
1. apiina. 2. flavonoides. 3. antioxidante. 4. CLAE-EM. 5. peroxidação lipídica. I. Chaves, Douglas Siqueira de Almeida, 1981-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pós Graduação em Química III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

NEIDE MARA DE MENEZES EPIFANIO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora**, no
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE APROVADA EM 18/12/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

Membros da banca:

Douglas Siqueira de Almeida Chaves
(Dr.) UFRRJ (Orientador) Presidente da Banca

Rosane Nora Castro
(Dr^a.) UFRRJ – Titular interno

Rogelio Gregorio Pereda Miranda
(Dr.) UNAM-México Titular externo

Silvana Maria Zucolotto Langassner
(Dr^a.) UFRN -Titular externo

Marcos Dias Pereira
(Dr.) UFRJ – Titular externo



Emitido em 18/12/2020

DELIBERAÇÃO Nº 290/2020 - PPGQ (12.28.01.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 23/12/2020 09:37)
DOUGLAS SIQUEIRA DE ALMEIDA CHAVES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptºCF (12.28.01.00.00.00.47)
Matricula: 1705075

(Assinado digitalmente em 27/12/2020 12:11)
ROSANE NORA CASTRO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matricula: 1177598

(Assinado digitalmente em 29/12/2020 03:37)
ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: G31143222

(Assinado digitalmente em 28/12/2020 13:10)
SILVANA MARIA ZUCOLOTTO LANGASSNER
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 819.957.250-72

(Assinado digitalmente em 23/12/2020 09:05)
MARCOS DIAS PEREIRA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 070.325.537-10

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número:
290, ano: **2020**, tipo: **DELIBERAÇÃO**, data de emissão: **23/12/2020** e o código de verificação: **863d3909bc**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por todas as oportunidades que Ele me deu e puderam me trazer até aqui.

Agradeço ao meu esposo Felipe por seu amor, carinho, paciência e apoio em mais essa etapa da minha trajetória profissional. Aos meus filhos Davi e Heitor, que estiveram juntos comigo durante todo o tempo de doutorado, pelo amor que me ensinaram e que não sabia existir e me davam força diariamente para continuar essa caminhada. Amo vocês meu trio de meninos!

Muito obrigada, meus pais Cristina e José Alberto, por seu imenso amor e dedicação em conduzir meu amadurecimento. Seus valores foram essenciais para as minhas conquistas. Agradeço a minha irmã Ana Carolina por seus inúmeros conselhos e momentos de carinho, que foram um apoio fundamental na minha jornada. Ao meu cunhado Leonardo e sobrinha Antônia por tanto amor e cuidado.

Um agradecimento muito especial para o meu orientador Douglas Siqueira de Almeida Chaves, agradeço pelos ensinamentos ao acompanhar seu comprometimento nas pesquisas e sua conduta profissional. Levarei sempre comigo seu grande exemplo de valorização do aluno e compreensão do lado humano das pessoas. A ciência ganha muito tendo profissionais como você.

Um grande obrigada aos meus amigos do Laboratório de Química de Bioativos Naturais Rafaela, Nataly, Juliana, e demais colegas de bancada: a amizade de vocês tornou mais leve e divertida a árdua rotina de experimentos.

Um agradecimento especial ao professor Cristiano Riger e aos alunos do Laboratório de Estresse Oxidativo em Microrganismos onde eu pude desenvolver o estudo in vivo da pesquisa, com a ajuda principalmente da aluna Karine, que tanto me ajudou com os experimentos. Obrigada professora Rosane Nora, por ceder os compostos utilizados neste trabalho e suas contribuições no desenvolvimento do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

EPIFANIO, Neide Mara de Menezes. **Caracterização química e atividade antioxidante do extrato aquoso da salsa crespa (*Petroselinum crispum* var. *crispum*)**. 2020. 169p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

O estresse oxidativo, resultante do desequilíbrio entre a produção e eliminação de radicais livres, oriundos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tem grande importância nos processos de envelhecimento e morte celular. A ingestão de ervas condimentares, como substitutos do sal, tem sido estimulada pelo fato delas conterem compostos bioativos capazes de desativar os radicais livres. O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais (método de Folin-Ciocalteu e Cloreto de Alumínio, respectivamente), avaliar a capacidade antioxidante (métodos do DPPH e FRAP), e promover uma triagem fitoquímica do extrato aquoso das folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum* (salsa) por CLAE-EM. Um alto teor de fenólicos ($12,49 \pm 1,70$ mg GAE/g de extrato de salsa) e flavonóides totais ($15,05 \pm 2,20$ mg de equivalentes de quercetina/g de extrato de salsa) foram quantificados na salsa, além de alta atividade antioxidante ($EC_{50} - 15,50$ mg.mL⁻¹, método DPPH) e (189,8 mM Fe (II)/mg de extrato vegetal seco - método FRAP). Vinte e sete flavonoides glicosilados foram identificados no extrato, sendo a apiina, o composto principal; a partir da hidrólise ácida da apiina foi obtida a aglicona apigenina (90% de pureza) e ambas foram utilizadas para os ensaios *in vivo* com células de *Saccharomyces cerevisiae*. O extrato aquoso da salsa crespa mostrou baixa toxidez, porém revelou alto potencial antioxidante dose-dependente, principalmente no ensaio de peroxidação lipídica. O flavonoide glicosilado apiina também apresentou ação antioxidante nas células de levedura sob estresse oxidativo no ensaio de viabilidade celular (0,1 mM) e peroxidação lipídica (0,01 e 0,1 mM), enquanto apigenina foi levemente antioxidante, demonstrando resultados diferente aos já relatados anteriormente na literatura em ensaios *invitro*. A apiina mostrou ser o composto fenólico mais abundante no extrato, portanto, é provável que a atividade antioxidante da apiina esteja relacionada à capacidade antioxidante total da salsa.

Palavras-chave: CLAE-EM; flavonoides; apiina; antioxidantes; peroxidação lipídica

ABSTRACT

EPIFANIO, Neide Mara de Menezes. **Chemical characterization and antioxidant activity in vivo of parsley (*Petroselinum crispum* var. *crispum*) aqueous extract.** 2020. 169p. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Oxidative stress, resulting from the imbalance between the production and elimination of free radicals, originating from reactive oxygen and nitrogen species, is of great importance in the processes of aging and cell death. The intake of condiment herbs, as salt substitutes, has been stimulated by the fact that they contain bioactive compounds capable of deactivating free radicals. The objective of this work was to determine the content of phenolic compounds and total flavonoids (Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride method, respectively), to evaluate the antioxidant capacity (DPPH and FRAP methods), and to promote a phytochemical screening of the aqueous leaf extract of *Petroselinum crispum* var. *crispum* (parsley) by HPLC-MS. A high content of phenolics (12.49 ± 1.70 mg GAE / g of parsley extract) and total flavonoids (15.05 ± 2.20 mg of quercetin equivalents / g of parsley extract) were quantified in parsley, in addition to high antioxidant activity (EC₅₀ - 15.50 mg.mL^{-1} , DPPH method) and ($189.8 \text{ mM Fe (II) / mg}$ of dry plant extract - FRAP method). Twenty-seven glycosylated flavonoids were identified in the extract, with apiine, the main compound; from the acid hydrolysis of the apiine, the aglycone apigenin (90% purity) was obtained and both were used for the *in vivo* tests with *Saccharomyces cerevisiae* cells. The aqueous extract of the parsley showed low toxicity, however it revealed a high dose-dependent antioxidant potential, mainly in the lipid peroxidation test. The glycosylated flavonoid apiine also showed antioxidant action on yeast cells under oxidative stress in the cell viability assay (0.1 mM) and lipid peroxidation (0.01 and 0.1 mM), while apigenin was slightly antioxidant, showing different results to previously reported in the literature in *in vitro* trials. Apiine has been shown to be the most abundant phenolic compound in the extract, so it is likely that the antioxidant activity of apiine is related to the total antioxidant capacity of parsley.

Keywords: HPLC-MS; flavonoids; apiine; antioxidants; lipid peroxidation

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Exemplos de substâncias presentes nas plantas e suas categorias.....	7
Figura 2 – Rota biossintética de metabólitos secundários a partir de metabólitos primários.....	9
Figura 3 – Classificação dos flavonoides baseada em sua estrutura química.....	15
Figura 4 – Relação Estrutura Atividade (REA) antioxidante dos flavonoides.....	18
Figura 5 – <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i>	20
Figura 6 – Compostos isolados a partir de <i>P. crispum</i>	21
Figura 7 – Estruturas de flavonóis e flavonas em forma de aglicona.....	22
Figura 8 – Estrutura química da apigenina (aglicona) e seus derivados glicosídeos.....	24
Figura 9 – A natureza como fonte de ER: fontes relacionadas ao meio externo, geradores de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, enxofre e cloro.....	25
Figura 10 – Classificação dos antioxidantes.....	28
Figura 11 – Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.....	31
Figura 12 - Reação química que descreve a produção de Fe ²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução de Fe ³⁺ (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)-FRAP.....	33
Figura 13 - Redução do ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Ação de estabilização do radical ABTS.....	34
Figura 14 - Biomarcadores do processo de estresse oxidativo (diretos e indiretos).....	36
Figura 15 - Diagrama esquemático dos efeitos das EROs nos processos celulares e suas consequências.....	39
Figura 16 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	40

Figura 17 - Etapas esquemáticas de formação do malonaldeído (MDA) a partir de ácidos graxos insaturados.....	41
Figura 18 - Processos celulares humanos conservados em <i>S. cerevisiae</i> , relacionados à membrana lipídica, funcionamento das mitocôndrias, geração dos EROs, proteínas, controle do ciclo celular e mecanismos de morte celular programada.....	44
Figura 19 - Etapas da cinética de crescimento de leveduras, de acordo com a fonte energética.....	46
Figura 20 - Estrutura da quercetina (ex. de flavonoide) e o mecanismo de sequestro de radicais livres (estruturas formadas em equilíbrio).....	48
Figura 21 - Mecanismos de ação antioxidante dos flavonoides por: a) inibição das EROs, b) imobilização leucocitária, c) inibição de óxido nítrico, d) inibição da xantina oxidase.....	49
Figura 22 - Modelo esquemático do espectrômetro de massas.....	52
Figura 23 - Clivagem da porção glicosídica em flavonoide- <i>O</i> -glicosilado.....	55
Figura 24 - Fragmentação de flavonoides- <i>O</i> -glicosilados, representação em kaempferol-7- <i>O</i> -rutinosídeo.....	56
Figura 25 - Diluições seriadas para posterior plaqueamento.....	63
Figura 26 - Esquema do tratamento inicial das células: (1) células + extrato de salsa + peróxido de hidrogênio ;(2) células + apiina 0.1mM + peróxido de hidrogênio; (3) células + peróxido de hidrogênio + apiina 0,1mM; (4) células + apigenina 0,1mM +peróxido de hidrogênio; (5) células + peróxido de hidrogênio + apigenina 0,1mM.....	64
Figura 27 - Ensaio de peroxidação lipídica pelo método TBARS.....	65
Figura 28 - Estrutura química das agliconas, açúcares (apiosilglicosídeo e ramnose) e resíduo de malonil identificados no extrato aquoso de <i>P. crispum</i> var <i>crispum</i>	71

Figura 29 - A - Estrutura orto-di-hidroxi (catecol) no anel B; B - Ligação 2,3-dupla em conjugação com uma função 4-oxo no anel C; C - Grupos hidroxila nas posições 3 e 5.....97

Figura 30 - Eliminação de espécies reativas de oxigênio (R •) por flavonóides. O radical livre Fl-O • pode reagir com um segundo radical, adquirindo uma estabilidade através da estrutura de quinona.....99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos compostos fenólicos.....	12
Tabela 2 - Metabólitos secundários identificados em folhas de <i>Petroselinum crispum</i> var <i>crispum</i> por CLAE-DAD-EM.....	72
Tabela 3 - Conteúdos fenólicos e flavonoides totais e avaliação da capacidade antioxidante <i>in vitro</i> do EAF de <i>P. crispum</i> var. <i>crispum</i>	102

ÍNDICE DE CROMATOGRAMAS

Cromatograma 1 - Espectro de massas da apigenina-6,8-di- <i>C</i> -glucosídeo e esquema de fragmentação.....	75
Cromatograma 2 - Espectro de massas para caracterização experimental da isorramnetina-dimalonil-diglucosídeo.....	76
Cromatograma 3: Espectro de massas e etapas de fragmentação do kaempferol- <i>O</i> -pentosil-hexosídeo	77
Cromatograma 4: Espectro de massas e etapas de fragmentação para caracterização do composto 12.....	79
Cromatograma 5 - Espectro de massas e etapas de fragmentação do composto 16.....	81
Cromatograma 6: Espectro de massas e etapas de fragmentação do composto 18.....	82

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Origem dos novos fármacos aprovados de 1981 a 2019.....	5
Gráfico 2 – Curva de calibração padrão de ácido gálico para determinação do conteúdo fenólico total no EAF de <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i>	86
Gráfico 3 – Curva de calibração padrão de quercetina para determinação do conteúdo total de flavonoides no EAF de <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i>	91
Gráfico 4 – Curva de calibração para determinação da atividade antioxidante total (AAT) do EAF de <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i> no ensaio DPPH.....	96
Gráfico 5 – Curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante total (AAT) do EAF de <i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i> no ensaio FRAP.....	100
Gráfico 6: Exposição de células de levedura ao extrato de salsa (E1 e E2) com ou sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 hora. Os resultados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).....	102
Gráfico 7: Quantificação dos níveis de peroxidação lipídica de células sob estresse oxidativo (H_2O_2 1,0 mM) pré-tratadas com concentrações crescentes de extratos de salsa E3 (0,339 $mg.mL^{-1}$), E4 (0,452 $mg.mL^{-1}$) e E5 (0,565 $mg.mL^{-1}$). Os resultados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.....	104
Gráfico 8: Exposição de células de levedura a cinco condições diferentes: controle (apenas células), DMSO (solvente) e diferentes concentrações de apiina (0,01 mM, 0,1 mM e 1,0 mM). As colônias foram contadas após um período de 48 horas.....	106
Gráfico 9: Exposição de células de levedura a duas condições diferentes. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) por 1 hora e tratamento subsequente com apiina (0,1 mM) por 1 hora. Pré-tratamento com apiina (0,1 mM) por 1 hora e tratamento subsequente com peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) por 1 hora.....	108

Gráfico 10: Exposição de células de levedura a duas concentrações diferentes de H₂O₂ (0,5 mM e 1,0 mM), com tratamento subsequente com apigenina (0,1 mM); e apiina (0,1 mM) + apigenina (0,1 mM) durante 1 h.....110

Gráfico 11: A peroxidação lipídica foi medida como pmol de MDA (malondialdeído) pelo método de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico). As células sobre estresse foram incubadas com apiina (0,01 mM e 0,1 mM); apigenina (0,01 mM e 0,1 mM); e apiina + apigenina (0,1 mM + 0,1 mM) durante 1h.....112

LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

CL	cromatografia líquida
EM	espectrômetro de massas
Var.	variedade
APG	apigenina
EROs	espécies reativas de oxigênio
SOD	superóxido dismutase
ER	espécie reativa
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
CAT	catalase
GPx	glutathione peroxidase
GR	glutathione reductase
G6PDH	glicose-6-fosfato-desidrogenase
GST	glutathione-S-transferase
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	butil-hidroxi-tolueno
TBHQ	terc-butil-hidroquinona
PG	propil galato
AA	atividade antioxidante
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
FRAP	<i>ferric reducing antioxidant power</i>
ORAC	<i>oxygen radical absorbance capacity</i>
A	espécie antioxidante
AUC	área sob a curva cinética
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
YPD	<i>Yeast/Peptone/Dextrose</i>
LPO	peroxidação lipídica
MDA	malondialdeído
TBA	<i>thiobarbituric acid</i> (ácido 2-tiobarbitúrico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
UV	ultravioleta
DAD	detector de arranjo de diodos
ESI	ionização por eletrospray
APCI	ionização química por pressão atmosférica
CID	dissociação induzida por colisão
HNE	hidroxi-2-nonenal
DMSO	dimetilsulfóxido
PC	<i>Petroselinum crispum</i> var. <i>crispum</i>
UFC	unidade formadora de colônia
TCA	ácido tricloroacético
t _R	tempo de retenção
Ag	aglicona
MM	massa molecular

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1.	A História do Uso de Plantas Medicinais	3
2.2.	Metabólitos Secundários	6
2.3.	Flavonoides: Aspectos Químicos e Importância Biológica.....	12
2.4.	A Família Apiaceae e o Gênero <i>Petroselinum</i>	17
2.5.	Radicais Livres e o Estresse Oxidativo	22
2.5.1.	Antioxidantes Endógenos e Exógenos	25
2.5.2.	Métodos para Determinação da Atividade Antioxidante (AA) <i>in vitro</i>	28
2.5.3.	Métodos para Determinação da Atividade Antioxidante (AA) <i>in vivo</i>	34
2.5.4.	Atividade Antioxidante de Plantas Medicinais.....	45
2.6.	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria De Massas No Estudo De Flavonoides Glicosilados.....	49
3.	OBJETIVOS.....	57
3.1.	Objetivo Geral.....	57
3.2.	Objetivos Específicos.....	57
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	58
4.1.	Reagentes, Materiais E Equipamentos.....	58
4.2.	Preparo Do Extrato Aquoso E Isolamento Da Apiina.....	58
4.3.	Hidrólise Ácida Da Apiina (Obtenção Da Apigenina)	58
4.4.	Cromatografia Líquida De Ultraeficiência Acoplada A Espectrometria De Massas.....	59
4.5.	Quantificação De Fenólicos Totais.....	60
4.6.	Quantificação De Flavonoides Totais.....	60
4.7.	Avaliação da Capacidade Antioxidante <i>in vitro</i>	60
4.7.1.	Método DPPH.....	61
4.7.2.	Método FRAP.....	61
4.8.	Avaliação da Atividade Antioxidante <i>in vivo</i>	61

4.8.1. Cultivo Celular.....	61
4.8.2. Ensaio de Toxicidade Celular do Extrato de Salsa e da Apiina.....	62
4.8.3. Avaliação da Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular.....	62
4.8.4. Avaliação da Atividade Antioxidante por Peroxidação Lipídica.....	64
4.8.5. Testes Estatísticos.....	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1. Preparação Do Extrato, Isolamento Da Apiina E Hidrólise Para Obtenção Da Apigenina.....	66
5.2. Identificação Dos Metabólitos (Flavonoides Glicosilados) Por Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Acoplada À Espectrometria De Massas (CLAE-DAD-EM).....	68
5.3. Quantificação De Compostos Fenólicos E Flavonóides Totais.....	84
5.4. Avaliação Da Capacidade Antioxidante <i>In Vitro</i>	94
5.5. Avaliação Da Capacidade Antioxidante <i>In Vivo</i> - Modelo Em Células Da Levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	101
6. CONCLUSÕES	114
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
8. ANEXOS	144

1. INTRODUÇÃO

A ampliação no conhecimento sobre os alimentos funcionais e suas propriedades medicinais têm estimulado diversos estudos *in vitro* e *in vivo* para avaliar os meios pelos quais seus componentes interferem na homeostase do organismo. Dietas ricas em alimentos funcionais podem reduzir o risco associado a diversas doenças relacionadas ao processo de desequilíbrio homeostático, sendo extremamente relevante associar o aparecimento e a progressão de doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e do câncer ao aumento do estresse oxidativo durante a patogênese, que interfere diretamente na manutenção de componentes estruturais vitais nas células (SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2013; BASU & MAIER, 2016; UDENSI & TCHOUNWOU, 2016).

Processos como a respiração mitocondrial podem gerar espécies reativas de oxigênio como produtos do metabolismo celular; com efeitos geralmente deletérios nos sistemas nervoso e cardiovascular devido ao estresse oxidativo causado por essas espécies altamente reativas. Para reduzir os níveis de estresse oxidativo, as células possuem defesas endógenas e exógenas de alimentos que contêm compostos bioativos, conhecidos como alimentos funcionais (FU et al., 2016).

Os flavonoides são amplamente distribuídos em plantas medicinais, frutas, vegetais e diversos alimentos funcionais, com atividades relacionadas a processos bioquímicos endógenos, podendo atuar principalmente como agentes antioxidantes, estabilizando os radicais livres por reações redox como agentes redutores. É comum associar a oxidação de biomoléculas a esses radicais livres, criando danos como fragmentação de fitas de DNA, lipoperoxidação da membrana plasmática e inativação de proteínas por carbonilação das cadeias laterais, resultando em lesão celular e possivelmente morte por apoptose (KASOTE et al., 2015; BEZERRA et al., 2016; TAN et al, 2018; AHN-JARVIS et al., 2019).

Petroselinum crispum var. *crispum* (Apiaceae), conhecida como salsa crespa, é originária da Grécia e hoje é amplamente cultivada em todo o mundo por suas folhas aromáticas, que podem ser usadas frescas ou secas como tempero em diversos alimentos. Existem relatos de algumas propriedades terapêuticas, sendo indicado por sua ação diurética, antiinflamatória, antioxidante, antiplaquetária e antiurolitíase, como no caso de um estudo realizado com extratos aquosos de folhas de salsa mostrou seu efeito na inibição da migração de células cancerígenas e na proteção do DNA, incluindo a elucidação dos constituintes atribuídos a essas atividades (EZER & ARISAN, 2006; CAMPOS et al., 2009;

CHAVES et al., 2011; TANG et al., 2015; AL-YOUSOFY et al., 2017; ABU-SERIE et al., 2019).

O *Petroselinum crispum* contém grande quantidade da flavona apigenina e baixa concentração de outros flavonoides nesta planta tornando adequado para um estudo de intervenção com uma fonte natural de apigenina. As folhas frescas e secas são fonte rica em compostos fitoquímicos com atividade antioxidante, sendo relatado em diversos estudos que os dois principais compostos fenólicos extraídos de folhas de salsa foram identificados como apiina e malonilapiina, flavonoides glicosilados, da aglicona apigenina (JUSTESEN et al., 1998).

Estudos sugerem que a apigenina é responsável pela atividade antiinflamatória e antitumoral em diferentes modelos celulares, além de ter relevante ação antioxidante. No entanto, existem poucos estudos sobre a atividade biológica exercida pela apiina (um dos principais compostos da salsa), como a interferência na atividade antiplaquetária. Devido a isso este estudo avaliou a composição química dos flavonoides glicosilados da salsa crespa e seu potencial antioxidante, bem como o potencial antioxidante da apigenina e apiina *in vitro* (por ensaios DPPH e FRAP) e *in vivo* por ensaios citotóxicos em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), modelo unicelular que possui processos enzimáticos que se assemelham, em certa medida, a células de mamíferos superiores, incluindo mecanismos relacionados às defesas antioxidantes intracelulares. Não há relatos na literatura de estudos de avaliação da atividade antioxidante da *Petroselinum crispum* var. *crispum* em modelos celulares, além de poucos relatos em modelos *invitro* para o extrato aquoso da salsa crespa (RIGER et al., 2011; HAN et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.A HISTÓRIA DO USO DE PLANTAS MEDICINAIS

A utilização das plantas como alimento sempre existiu na História, pois os homens sempre buscaram utilizar recursos da natureza para a sua subsistência, mas também passou a ser utilizado com o intuito de melhoria na sua qualidade de vida ou de minimizar alguns sintomas durante período de doenças (TOSCANO RICO, 2011).

No decorrer da História, o uso de plantas com potencial terapêutico, sempre foi admirado pela humanidade. Existe um amplo histórico relatado, transmitido entre gerações do uso benéfico de diversos produtos de origem natural, principalmente referente as civilizações antigas como a China e a Índia, que propiciaram um grande arsenal de conhecimentos sobre o uso de medicamentos tradicionais (PATWARDHAN et al., 2005).

Existem evidências de nosso passado paleolítico sugerindo um conhecimento detalhado e aplicado de plantas medicinais. O estudo dos ossos humanos são uma boa fonte de informação do passado e o registro arqueológico pré-histórico é rico em evidências de acidentes, doenças e traumas e de sobrevivência de indivíduos com patologias, inclusive entre as populações paleolíticas Hardy et al. (2012) extraíram evidências biomoleculares para duas plantas ricas em óleo volátil da família Asteraceae, *Achillea millefolium* L. e *Matricaria chamomilla* (L.) Rydb., ambos com propriedades medicinais, mas sem propriedades nutricionais, em um cálculo dentário de um homem de Neandertal de 49.000 anos de El Sidrón.

O corpo mumificado de um homem de 4.500 anos, provavelmente entre 40-50 anos quando ele morreu, foi encontrado em 1991 nos Alpes italianos. Apelidado de Ötzi, ele tinha várias patologias, incluindo periodontite, fraturas de costelas curadas, parasitas intestinais e cálculos biliares. Ele também tinha alguma doença degenerativa das articulações, osteoartrite leve e uma costela quebrada curada bem como várias lesões peri-mortem, sendo encontrado relatos do uso de plantas medicinais (HARDY, 2020).

Evidência arqueológica para o uso de drogas psicotrópicas no Paleolítico é limitada, sendo a mais antiga de um site de 13.000 anos em Timor, onde restos de videira de bétele (*Areca catechu* L., Arecaceae) foram encontrados. A presença de *Cannabis* foi identificada na cerâmica de Taiwan (10.000 anos AC) e está presente como matéria-prima (cânhamo) nos primeiros contextos agrícolas da China, mas a planta mais comum é *Papaver*

somniferum L., sendo encontrada principalmente em sítios pré-históricos posteriores a ao sexto milênio AC em toda a Europa, e no Egito Antigo (HARDY, 2020).

O papiro de Ebers é considerado um dos mais antigos e importantes tratados médicos conhecidos, foi escrito no Egito Antigo e é datado de aproximadamente 1550 a.C. Enumera em torno de 100 doenças e descreve muitos produtos de origem natural utilizados por essa civilização para diminuir sintomas ou cura. Na Grécia Antiga, grande parte do conhecimento sobre plantas deve-se a Hipócrates, denominado “pai da medicina”. Ele reuniu em sua obra *Corpus Hipocratium*, uma síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando, para cada enfermidade, um remédio vegetal e um tratamento adequado. Além disso, Hipócrates afirmava que o tratamento para muitas doenças poderia ser feito por meio de dieta alimentar adequada (GURIB-FAKIM, 2006).

No começo da Era Cristã, o grego Dioscórides, catalogou e ilustrou cerca de 600 diferentes plantas usadas para fins medicinais, descrevendo a utilização terapêutica de muitas delas. Esta obra, onde esses registros foram reunidos, é chamada de *Materia Medica*, considerada a principal referência ocidental sobre plantas medicinais até período do Renascimento. Dentre seus diversos relatos, já era descrito a utilização do ópio como medicamento e como veneno, utilizado por Nero para eliminar seus inimigos. Também há relato do uso do salgueiro branco (*Salix alba L.*), fonte mais antiga do ácido acetilsalicílico, para dor (MISHRA et al., 2011; NEWMANN et al., 2016).

Um dos principais responsáveis pelo avanço da terapêutica na idade moderna foi Paracelso, que descreveu as bases da medicina natural e afirmou que cada doença específica deveria ser tratada por um tipo de medicamento. Disse ainda que a dose certa define se uma substância química é um medicamento ou um veneno e foi responsável pela teoria da assinatura dos corpos, segundo a qual, a atividade farmacológica de uma planta estaria relacionada com seu aspecto morfológico.

Mas foi a partir do século XIX que a fitoterapia teve maior avanço, devido ao progresso científico na área da química, o que permitiu analisar, identificar e separar os princípios ativos das plantas. O principal exemplo foi que em 1806, Friedrich Sertürner isolou a morfina do *Papaver somniferum* e a partir desse evento, diversos produtos naturais foram selecionados para estudo de possíveis medicamentos (DEVIENNE et al., 2004).

A partir da segunda metade do século XX, houve um grande avanço tecnológico e evolução na medicina, com o desenvolvimento das indústrias farmacêuticas, reduzindo significativamente o uso de plantas com fins medicinais. No entanto, em países em desenvolvimento, as plantas ainda apresentam uma grande contribuição como profilático e para o tratamento de diversas enfermidades, sendo um dos principais motivos, as condições de pobreza e a falta de acesso aos medicamentos a maioria da população, associados à fácil utilização de plantas com fins medicinais (FIRMO et al., 2011).

De acordo com Newman e Cragg (2020) os produtos naturais desempenham um papel dominante na descoberta de pistas para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento de diversos problemas de saúde. A partir dos dados apresentados nesta revisão, a utilização de produtos naturais e suas variações sintéticas, e a construção de novos arcabouços a partir de suas estruturas, com a finalidade de descobrir e desenvolver uma droga para fins terapêuticos continua em crescimento pelo mundo. Nesta revisão, os dados foram analisados em termos de números e classificados de acordo com sua origem usando as principais categorias utilizadas anteriormente pelo grupo, conforme podemos ver no **Gráfico 1**. Para melhor entendimento, apenas a primeira aprovação de qualquer medicamento é contabilizada, independentemente de quantos "biossimilares" ou aprovações foram posteriormente identificadas.

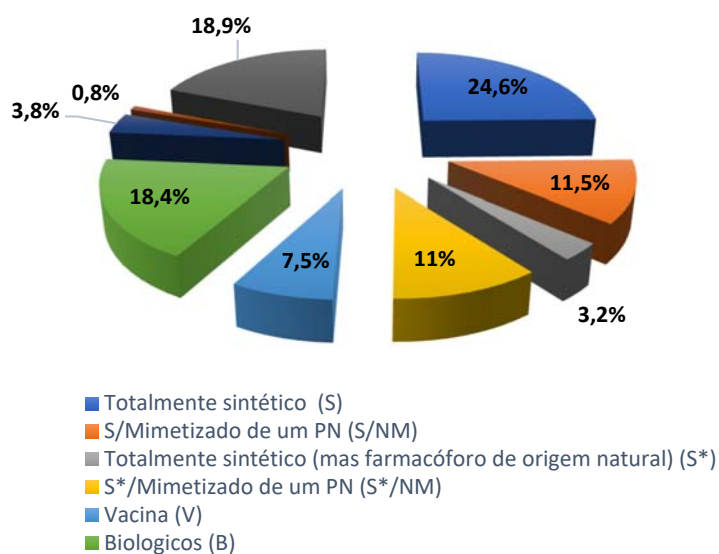


Gráfico 1: Origem dos novos fármacos aprovados de 1981 a 2019, adaptado de NEWMAN & CRAGG, 2020.

Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2019, cerca de 67% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes. O artigo relata da grande influência das estruturas de produtos naturais em algumas áreas da farmacologia, como no caso dos anti-infecciosos, embora ainda existam classes farmacológicas, para as quais não existem medicamentos derivados de produtos naturais, como anestésicos e antianginosos.

A descoberta de drogas, no século XXI, envolve a geração de uma diversidade molecular nova a partir de produtos de origem natural, que combinadas com metodologia de química sintética e combinatória, incluindo a manipulação de vias biossintéticas, tem propiciado o fornecimento de novas fontes de fármacos, sendo a melhor solução para a atual crise de produtividade enfrentada pela comunidade científica., visto a falta de inclusão de novas classes e novos fármacos por mais de uma década no mercado farmacêutico, como no caso dos anti-infecciosos.

Embora as técnicas de química combinatória tenham tido êxito como métodos de otimização de estruturas e tenham sido usadas com muito sucesso na otimização de muitos agentes aprovados recentemente, os compostos oriundos de produtos naturais são fundamentais para o desenvolvimento de novos agentes anti-infecciosos, combatendo os genes de resistência que vem sendo transmitidos por plasmídeos em toda a população mundial, restringindo a cada ano a escolha de uma farmacoterapia adequada ao combate desses microrganismos (NEWMANN et al., 2020)

É importante salientar a importância de investimento nessa área de pesquisa, que oferece grande potencial no descobrimento de novas estruturas que podem levar a identificação de agentes eficazes em uma grande diversidade de doenças humanas.

2.2.METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo é definido como o conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre em células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a sua continuidade. Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula (PEREIRA et al., 2012).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, o reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química conhecida e registrada na literatura. A variedade e a complexidade das micromoléculas, podem ser divididas de acordo com a sua função na planta (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

As plantas produzem uma diversidade de metabólitos estrutural e funcionalmente diversos que desempenham muitos papéis diferentes no crescimento e desenvolvimento das plantas e na resposta das plantas às condições ambientais em constante mudança, bem como às tensões abióticas e bióticas. Esta diversidade metabólica é, em grande parte, devido à modificação química dos esqueletos básicos dos metabólitos.

De fato, plantas e fungos apresentam uma diversidade metabólica muito maior do que outros organismos, com o reino vegetal comumente sendo declarado contendo entre 20000 e 1 milhão de metabólitos. O metabolismo primário central da maioria das espécies vegetais é altamente semelhante ao de espécies não-vegetais e consiste em substâncias presentes em todas as células dos organismos e que desenvolvem papel importante no processo de metabolismo e reprodução desses seres. No entanto, plantas e fungos têm capacidade adicional para sintetizar um enorme repertório de compostos especializados (ou secundários) que constituem a maioria de seus metabólitos. Este arsenal de compostos fornece a esses organismos um meio eficaz de defesa contra o estresse biótico e abiótico que eles potencialmente enfrentarão durante sua vida (WANG et al., 2019).

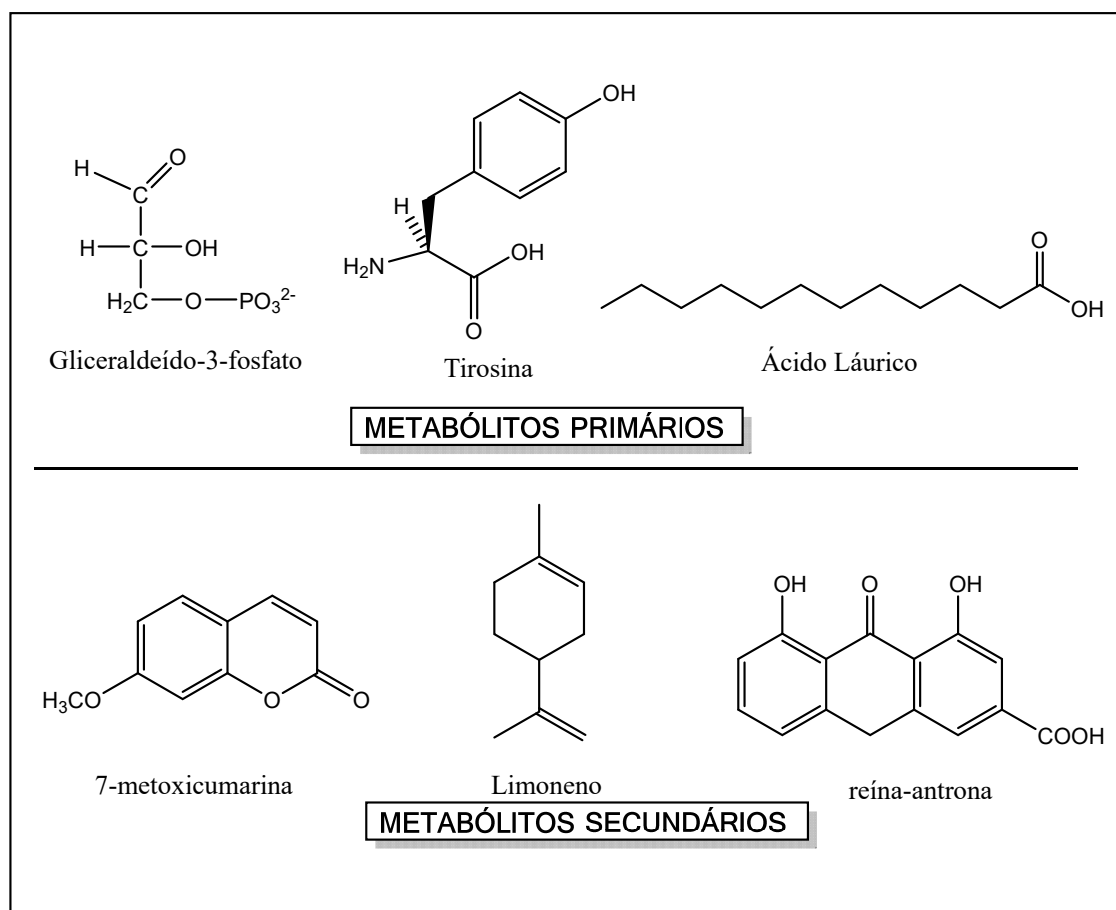


Figura 1: Exemplos de substâncias presentes nas plantas e suas categorias

Os metabólitos primários são essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas e é comum encontrar em todas as plantas, enquanto os metabólitos prioritários agem frequentemente como moléculas de defesa e protegem as plantas de várias condições frente ao meio externo e já foram consideradas não essenciais para o crescimento das plantas e o seu desenvolvimento (PATRA et al., 2013).

As plantas produzem uma quantidade vasta e diversa desses compostos orgânicos, mas o estudo dos metabólitos prioritários apenas deu início no final do século XIX, com foco, principalmente, nas substâncias relacionadas com medicamentos, venenos e cosméticos. Atualmente, a procura por novas substâncias que possam ser utilizadas para melhorar a qualidade de vida do homem tem despertado o interesse das indústrias farmacêuticas, aumentando o interesse de pesquisadores na comercialização dos metabólitos secundários, obtida de plantas empregadas na medicina popular (TIWARI et al., 2015).

Os metabólitos prioritários, também chamados de especiais ou secundários, são geralmente produzidos após o crescimento da planta e possuem uma ampla gama de estruturas químicas e atividades biológicas e se apresentam como derivados por vias biossintéticas únicas a partir de metabólitos e intermediários primários. Os metabólitos secundários pertencem a um número restrito de famílias no grupo taxonômico dos produtos naturais, sendo cada qual com características estruturais particulares, decorrentes da sua biossíntese. Uma classificação simples pode ser apresentada conforme demonstrado na **Figura 2** (ROZE et al., 2011; VERMA et al., 2015).

O metabolismo secundário vegetal, através das substâncias formadas no metabolismo primário, forma vários compostos orgânicos; que por sua vez possuem atividade biológica. As principais classes de metabólitos secundários identificados em espécies vegetais são os compostos nitrogenados, compostos fenólicos ou fenóis e terpenos ou terpenóides (CUNHA et al, 2016).

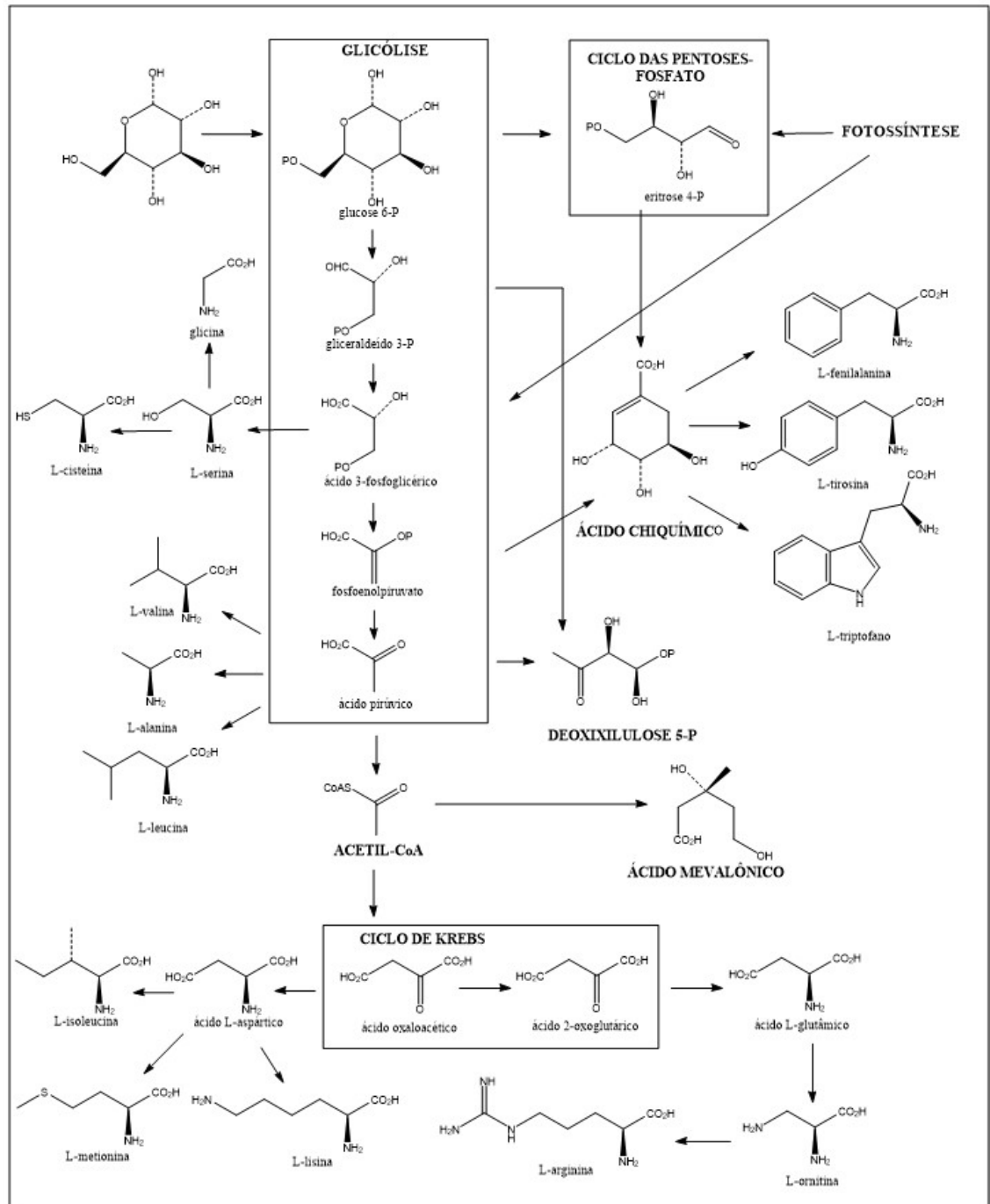


Figura 2: Rota biossintética de metabólitos secundários a partir de metabólitos primários, adaptado de DEWICK, 2002.

O segundo maior grupo de metabólitos prioritários são os compostos fenólicos e são comumente encontrados em plantas, e a sua distribuição não é homogênea, sendo principalmente encontrados na parede celular e a sua distribuição depende de diversos fatores supracitados como espécie, variedade, exposição direta aos raios solares, altas temperaturas, umidade, agressões ambientais e fatores genéticos (DEGÁSPARI et al.,



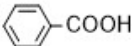
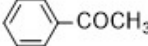
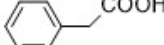
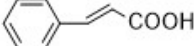
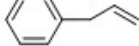
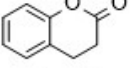
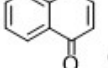

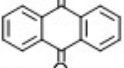
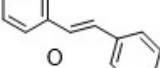
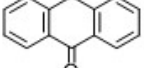
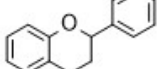
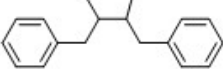
2004). Em resposta a essas mudanças podem ocorrer um aumento ou diminuição na produção de alguns destes compostos, fazendo com que sejam produzidos com características diferenciadas, tornando certos alimentos uma fonte específica ou abundante de determinados compostos fenólicos (YILDIZ, 2009).

Muitas publicações evidenciam a ação dos compostos fenólicos na fisiologia da planta como, reprodução, crescimento e defesa contra diferentes estresses ambientais, atividade alelopática pela qual reduzem o crescimento de plantas vizinhas, além de ação sobre a fotossíntese, síntese de proteínas, atividade enzimática, absorção de nutrientes nas plantas. Verificou-se que os fenólicos também podem ser utilizados como indicadores de estresse, porque seu teor é aumentado pela exposição das plantas a produtos químicos tóxicos e outros agentes estressantes a elas (ACHAKZAI et al., 2009; SHARMA et al., 2012).

Os compostos fenólicos são moléculas heterogêneas que incluem mais de 10.000 compostos com grande diversidade estrutural, e são basicamente formados por vias metabólicas a partir do ácido malônico e chiquímico, sendo a via do ácido malônico, altamente significativo em bactérias e fungos, enquanto o caminho do ácido chiquímico é muito comum em plantas. Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas ligadas a anéis aromáticos, tendo sido divididos em diferentes classes, que depende de sua estrutura química básica, conforme visualizado na **Tabela 1** (GARCIA-SALAS et al., 2010; VERMA et al., 2015).

Os polifenóis constituem substâncias ativas encontradas em várias plantas que modificam as atividades de uma grande variedade de enzimas e receptores celulares. Os polifenóis são os mais abundantes e mais comuns fitoconstituintes vegetais em diversos alimentos como frutas, cereais, legumes secos, vegetais, chocolate e bebidas como chá, cacau, café e vinho. Na natureza, podemos categorizar compostos polifenólicos em classes diferentes de compostos naturais com base no número dos anéis fenólicos presentes nele (PATEL et al., 2018).

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos, adaptado de GARCIA-SALAS et al., 2010.

NÚMERO DE CARBONOS	CLASSES	ESTRUTURA BÁSICA
C ₆	Fenólicos Simples	
	Benzoquinonas	
C ₆ -C ₁	Ácido Benzoico	
C ₆ -C ₂	Acetofenonas	
	Ácido Fenilacético	
C ₆ .C ₃	Ácido Cinâmico	
	Fenilpropenos	
	Cumarinas	
	Cromonas	
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	
	Antraquinonas	
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides	
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanas e neolignanas	
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos Hidrolisáveis	Polímero Heterogêneo
(C ₆ -C ₃) _n	Ligninas	Polímeros Aromáticos

Os compostos fenólicos geralmente estão envolvidos com diversos papéis fisiológicos nas plantas, incluindo fotossíntese, síntese de proteínas, atividade enzimática, absorção de nutrientes nas plantas, reprodução, crescimento e defesa contra diferentes agentes estressantes e na proteção de diversas plantas contra a radiação ultravioleta. Verificou-se que os polifenóis podem ser utilizados como indicadores de estresse, porque

seus níveis se apresentam aumentados pela exposição de produtos químicos tóxicos e estresse nas plantas (BOUDET, 2007).

De forma geral, os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção do auto oxidação celular. Estes mecanismos de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetal e animal e, quando incorporados na alimentação humana, não conservam apenas a qualidade do alimento, mas também reduzem o risco de desenvolvimento de patologias. Este processo ocorre devido às propriedades redox que os tornam doadores de hidrogênio, agentes redutores e inibidores de oxigênio singlete, desempenhando um papel considerável na redução do risco ao câncer em humanos. Os polifenóis são antioxidantes abundantes na dieta humana, sendo a classe dos flavonoides, a mais estudada dentre esses (KÄHKÖNEN et al., 1999; MILIAUSKAS et al., 2004; HUANG et al., 2011).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides se apresentam como classe majoritária e desempenham um papel importante no crescimento de plantas e mecanismo de defesa contra micróbios e insetos. Os flavonoides são compostos polifenólicos presentes em plantas usualmente consumidas na dieta e estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligada a açúcares (heterosídeos), ácidos e /ou e proteínas (HIDALGO et al., 2010).

2.3.FLAVONOIDES: ASPECTOS QUÍMICOS E A IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

O termo flavonoide é derivado da palavra latina “flavus” que significa amarelo, e por muito tempo definiu essa classe de polifenóis. Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados de origem vegetal que se encontram geralmente em folhas, flores, raízes e frutos das plantas. O mesmo composto pode ainda apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra, influenciadas por diversos fatores naturais como radiação solar, raios UV, estações do ano e ainda outros fatores como poluentes que podem alterar o metabolismo da planta (NAGULA et al., 2019)

Os flavonoides formam um grupo de mais de 4.000 componentes polifenólicos que ocorrem naturalmente nas plantas como pigmentos biossintetizados a partir da fenilalanina, responsáveis pelas cores das pétalas da flor. Os flavonoides atuam na regulação do crescimento, no desenvolvimento das plantas, atuam como antimicrobianos e antivirais

inibindo importantes enzimas, tais como a transcriptase reversa e outras proteases e atuam frente alguns protozoários patogênicos (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Nas plantas, os flavonoides são formados basicamente através da combinação de tirosina e fenilalanina com unidades de acetato, pela via metabólica. Do fenilpropanóide. Estruturalmente flavonoides têm dois anéis de aromáticos que são conectados por um anel de pireno contendo oxigênio, formando um sistema $C_6 - C_3 - C_6$. Modificações no anel central C levam à diferenciação dos subtipos de flavonoides como flavanonas, flavonas, isoflavonas, diidroflavonol, flavonol, flavan-3-ol e antocianinas (**Figura 3**). Para a síntese de seus derivados glicosídicos, diferentes tipos de açúcar são adicionados ao núcleo flavonoídico, sendo os mais encontrados a ramnose, xilose glicose e galactose (CAZOROLLI et al., 2008; WANG et al., 2018).

Os flavonoides são um grande grupo de metabólitos secundários polifenólicos das plantas, presentes em praticamente todas as plantas superiores. Eles estão presentes nos tecidos vegetais em concentrações relativamente altas e ocorrem majoritariamente nas folhas e outras partes externas das plantas, desempenhando papéis importantes como compostos de defesa e sinalização na reprodução, patogênese e simbiose (PATEL et al., 2018).

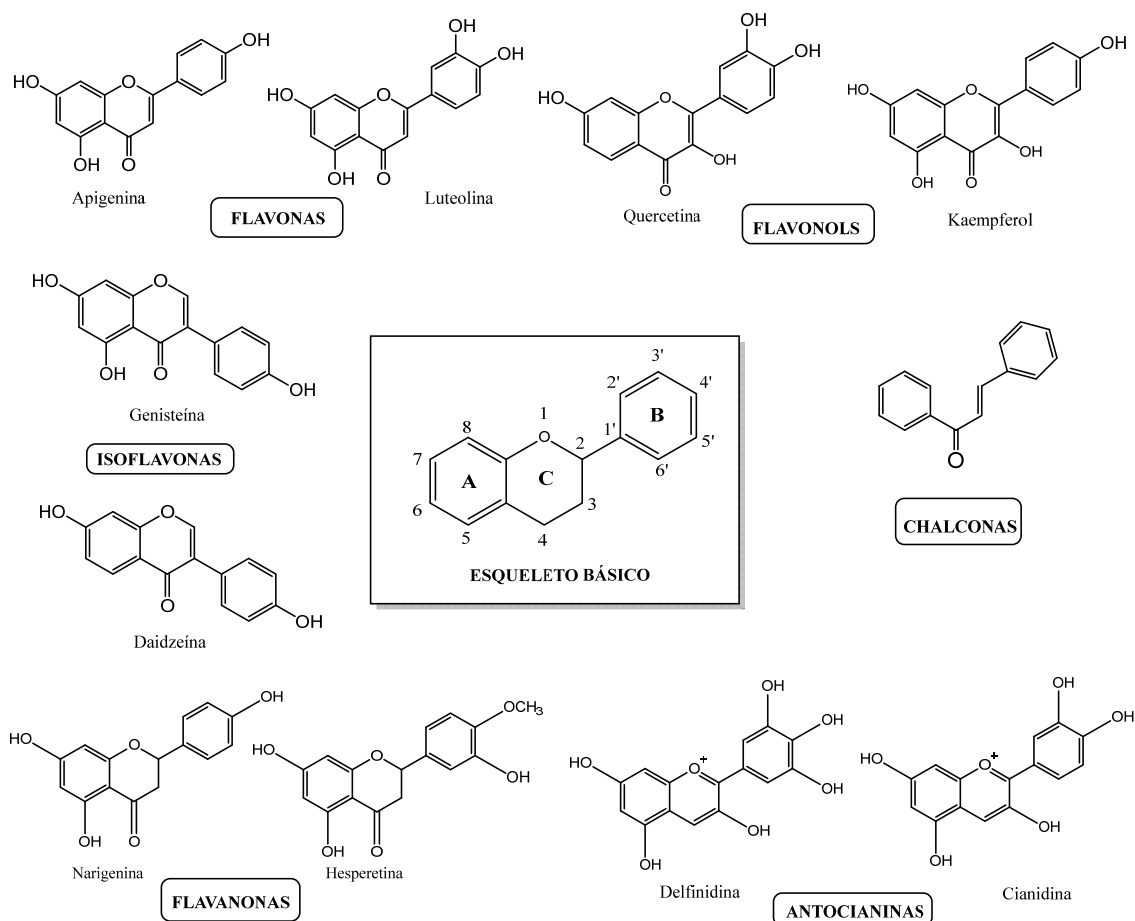


Figura 3: Classificação dos flavonoides baseada em sua estrutura química

Na natureza, algumas das importantes fontes naturais de dieta flavonoides são frutas, sucos de cereais, legumes, chá e vinho. Os principais grupos flavonoides da dieta humana são o kaempferol e quercetina, encontradas principalmente em brócolis, cebola e alho-poró e a apigenina e luteolina que são encontradas na salsa e no aipo. Catequina, epigallocatequina, epicatequina, galato de epigallocatequina são encontrados principalmente no vinho tinto, chá verde e chocolate (COOK et al., 1996; LOTITO et al., 2006; SPENCER et al., 2009; KUMAR et al., 2013).

Os flavonoides vêm despertando um grande interesse devido a estudos epidemiológicos que mostram que uma dieta rica nestes compostos está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer, além de diversos relatos como tendo atividade antibacteriano, anti-inflamatória, antialérgica, antiviral, antitrombótica e vasodilatadora (MIDDLETON et al., 2000; BUCKI et al., 2003; CUSHNIE et al., 2005; GEBHARDT et al., 2005; HUBER et al., 2008; SPENCER, 2008)

Consumo de alimentos ricos em flavonoides, em especial frutas e vegetais, está associado a uma menor incidência de doenças cardíacas, acidente vascular cerebral isquêmico, câncer e outras doenças crônicas. As doenças citadas estão associadas ao aumento do estresse oxidativo e flavonoides são fortes antioxidantes *in vitro*, tendo sido sugerido que a inserção diária na dieta de alimentos ricos em flavonoides exerce benefícios à saúde por meio de mecanismos antioxidantes sendo recomendado o seu uso associado com a proteção contra doenças do envelhecimento. (WANG et al., 2018)

Os flavonoides ocorrem como agliconas, glicosídeos e derivados metilados. A estrutura flavonoide básica é aglicona. Os flavonoides são frequentemente hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 2, 3', 4' e 5'. Os flavonoides da dieta, especialmente os glicosídeos, são os fitoquímicos mais vitais nas dietas e são de grande interesse geral devido à sua bioatividade diversificada. Os flavonoides presentes na natureza, em sua maioria, se encontram acumulados nos caules, flores, folhas e frutos das plantas e existem como seus glicosídeos, na forma de O-glicosídeo ou C-glicosídeo nas plantas, localizada nas posições 3 ou 7, tendo como carboidratos conjugados, glicosídeo, galactosídeo, ramnosídeo, arabinosídeo e rutinosídeo. Os conjugados mais abundantes nas plantas são flavona O/C-glicosídeos e flavonol O-glicosídeos. Várias tecnologias de ponta, incluindo a plataforma metabolômica baseada em CLAE-EM e RMN foi usado para investigar os diferentes padrões de glicosilação dos flavonoides (OHADOMA et al., 2016; XIAO, 2017).

Os conjugados glicosilados podem ser hidrolisados e as agliconas resultantes são de possível identificação e quantificação. O aquecimento dos flavonoides glicosilados, pode levar à hidrólise dos O-heterosídeos e, muitas vezes, interferir na análise estrutural de flavonoides. As hidrólises alcalinas e ácidas facilitam a identificação dos núcleos flavônicos, enquanto a hidrólise enzimática rompe pontos específicos das moléculas, facilitando a identificação dos constituintes da porção glicosídica. É importante salientar que os glicosídeos são mais solúveis em água e menos reativos contra radicais livres do que sua aglicona ou respectivo flavonoide (HAVSTEEN, 2002; MARKHAM & ANDERSEN, 2006).

A atividade antioxidante de um flavonoide depende fortemente de sua estrutura química e é bem aceito que esta atividade marcadamente influenciada pelo número e posição de grupos hidroxilas nos anéis B e A, e pela extensão da conjugação entre os anéis

B e C. Alguns requisitos estruturais gerais favoráveis para um potencial antioxidante dos flavonoides seguem os três Critérios de Bors:

a) A estrutura o-dihidroxi (3',4'-diOH, ou seja, catecol) no anel B, que confere alta estabilidade aos radicais fenoxilas dos flavonoides via ligação de hidrogênio ou por deslocalização eletrônica expandida;

b) O vínculo duplo C2-C3 (em conjugação com o 4-grupo oxo), que determina a coplanaridade do anel heterociclo e participa de estabilização radical via deslocalização eletrônica sobre todos os três sistemas de anéis;

c) A presença de ambos os grupos 3-OH e 5-OH para a capacidade de sequestro de radical livre de intensidade forte.

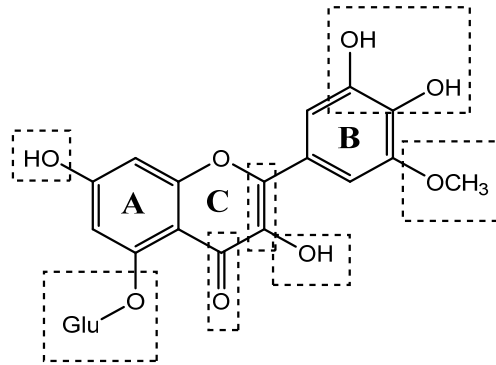
Além disso, um critério adicional poderia ser adicionado:

d) Na ausência de estrutura o-dihidroxi no anel B, substituidores hidroxílicos em uma estrutura de catecol no A o anel é capaz de compensar e se tornar um determinante maior da atividade antiradicalar (AMIC et al., 2007).

As atividades antioxidantes de cinco flavonoides que ocorrem naturalmente foram investigadas por sua capacidade de inibir radicais de superóxido e inibir peroxidação lipídica e dano oxidativo de DNA. Os flavonoides estudados por Jacob et al. (2011), não apresentavam os grupamentos catecol no anel B, mas demonstrava estrutura planar restaurada devido ao duplo vínculo em C2-C3 e o grupo 4-oxo, além da presença de uma hidroxila em C5 do anel A. Este tipo de estrutura molecular, está envolvido com o processo de quelação de metais de transição e pode compensar quando há a ausência da do grupamento catecol, em relação ao aumento da atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos flavonoides, portanto apresenta uma relação estrutura-atividade, a qual depende do número e localização das hidroxilas, a presença de ligação dupla em C2 e C3 em conjugação com uma função 4-oxo presente no anel C, grupamento orto-catecol (no anel B) e a glicosilação (C-glicosídeos ou O-glicosídeos), conforme demonstrado na **Figura 4**. Um estudo teórico investigou a influência da substituição do açúcar na atividade antioxidante dos flavonoides. A substituição de açúcar altera significativamente as cargas de Mulliken nos átomos de oxigênio das hidroxilas. A substituição do átomo de hidrogênio por um açúcar na posição C-3 leva a uma melhoria

na habilidade antioxidante, mas as propriedades antioxidantes mais altas são obtidas com um grupo hidroxila em um dos anéis flavônicos (LESPADE & BERCIÓN, 2012).



GRUPAMENTO	Catecol	Número de - OH	OCH ₃	C2=C3	3'- OH	4- Carbonila	Glicosilação
REA							
ANTIOXIDANTE DOS FLAVONOIDES	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓

Figura 4: Relação Estrutura Atividade (REA) Antioxidante dos flavonoides, adaptado de WANG et al., 2018. Legenda: (↑) – aumento na atividade antioxidante. (↓) – redução na atividade antioxidante em modelo *in vitro*.

2.4. A FAMÍLIA APIACEAE E O GÊNERO *Petroselinum*

Apiaceae (Umbelliferae) é uma família numerosa composta por cerca de 455 gêneros e mais de 3600 espécies dispostas em três subfamílias: Hydrocotyloideae, Saniculoideae e Apioideae. As plantas de Apiaceae apresentam caules ocos nas zonas internodais, com canais secretores contendo óleos essenciais e inflorescências em forma de umbela. Distribui-se de modo alargado pelo mundo, podendo encontrá-la principalmente nas regiões tropicais a regiões temperadas. Muitas das espécies são conhecidas pelos seus constituintes aromáticos, apresentando como característica a produção de muitos metabolitos secundários, como os fenilpropanoides, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo encontrados ao nível dos óleos essenciais das plantas, juntamente com cumarinas e flavonoides, principalmente na forma de flavonóis e flavonas (MENDES, 2007; ABDULMANEA et al., 2012).

As plantas da família Apiaceae são comumente usadas para alimentos, aromatizantes, fragrâncias e no desenvolvimento de produtos farmacêuticos, cosméticos e outros para usos industriais; sendo também conhecido por ser usado como remédios caseiros desde a antiguidade. Recentemente, muitos estudos têm sido realizados a fim de validar as alegações etnomedicinais de plantas pertencentes a esta família (SAYED-AHMAD et al., 2017).

Várias plantas desta família são usadas para tratar várias doenças relacionadas com os sistemas digestivo, endócrino, reprodutivo e respiratório. Esta família é composta por representantes importantes das especiarias, as quais têm ampla utilização como condimentos, não somente úteis para a alimentação, mas também auxiliando na prevenção de enfermidades devido às suas propriedades antioxidantes e/ou farmacológicas. Compreende hortaliças importantes, tais como, cenoura, salsa, mandioquinha-salsa, aipo (salsão), erva-doce (funcho) e o coentro, sendo muitas espécies desta família conhecidas pelo seu uso na medicina tradicional (MATIOLLI, 2014).

As espécies de plantas da família Apiaceae são conhecidas por acumular flavonoides principalmente na forma de flavonas e flavonóis. Muitas espécies da família Apiaceae são cultivadas no Brasil como condimentos e alimentos, como é o exemplo da salsa (*Petroselinum crispum*). Além do seu sabor único, algumas propriedades como antioxidante, antitumoral, antimicrobiano, diurético, antiinflamatória e atividade redutora de risco coronário e de doenças cardiovasculares, são apresentados por diversas referências bibliográficas, sendo que os constituintes que requerem maior atenção são os flavonoides, principalmente na forma glicosídica (GEBHARDT et al., 2005; BOLDIZSARA et al., 2013)

A espécie *Petroselinum crispum* (salsa) é uma planta amplamente difundida e utilizada no Brasil e no mundo, sendo uma das espécies mais estudadas, do ponto de vista biológico, da família *Apiaceae*. Para o gênero *Petroselinum* existem diversas variedades, sendo que iremos estudar neste trabalho o *Petroselinum crispum* var. *crispum* (cultivar crespão). Esta planta é herbácea, condimentar e medicinal, utilizada desde a antiguidade e difundida em todas as áreas de clima temperado e subtropical. Apresenta-se com 60 a 100 cm de altura, apresentando inúmeras hastes, como pequenas touceiras. Suas folhas triangulares e divididas em folíolos. No segundo verão, a planta emite inflorescências altas do tipo umbela, com numerosas flores amarelas a esverdeadas. A planta é muito aromática,

com sabor pungente e ao mesmo tempo refrescante (**Figura 5**). É uma erva anual ou bianual, que possui grande interesse comercial, utilizada principalmente como condimento sendo suas folhas empregadas como intensificador de sabor aos alimentos, tendo relatos de serem utilizadas de forma medicinal para transtornos gastrintestinais, ação anticoagulante sendo úteis em doenças de pele, hipertensão, hiperlipidemia, hepatotoxicidade, diabetes, doença renal e lombalgia (FARZAEI et al., 2013).



Figura 5: *Petroselinum crispum* var. *crispum* (A: Semente/ B: Folhas/ C: Flores)

A salsa embora seja nativa da Europa e do oeste da Ásia, a erva agora é cultivada e consumida em todo o mundo. As folhas e caules, frescos ou secos, bem como as sementes, têm sido empregados em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos. Na medicina popular, a parte aérea de *P. crispum* é usado para tratar hemorroidas, o caule para inflamação uretral e a raiz é usada para passar as pedras nos rins. A composição química e propriedades farmacológicas de *P. crispum* foram relatados anteriormente em vários estudos, apresentando glicosídeos de flavonol e flavona, como quercetina e apigenina, além de terpenos, furanocumarinas, carotenoides, ácido ascórbico e tocoferol (**Figura 6**) (TANG et al., 2015).

Há três principais variedades de salsa, com numerosas cultivares cada uma. Há o tipo plano italiano, o *neapolitanum*, que é a salsa lisa comum. O *crispum* engloba as salsas de folha crespa, com sabor menos acentuado e mais utilizada para decorar pratos, como

guarnição. Já a forma *tuberosum* é a das salsas cultivadas por suas raízes comestíveis, como a salsa-alemã e a de Hamburgo.

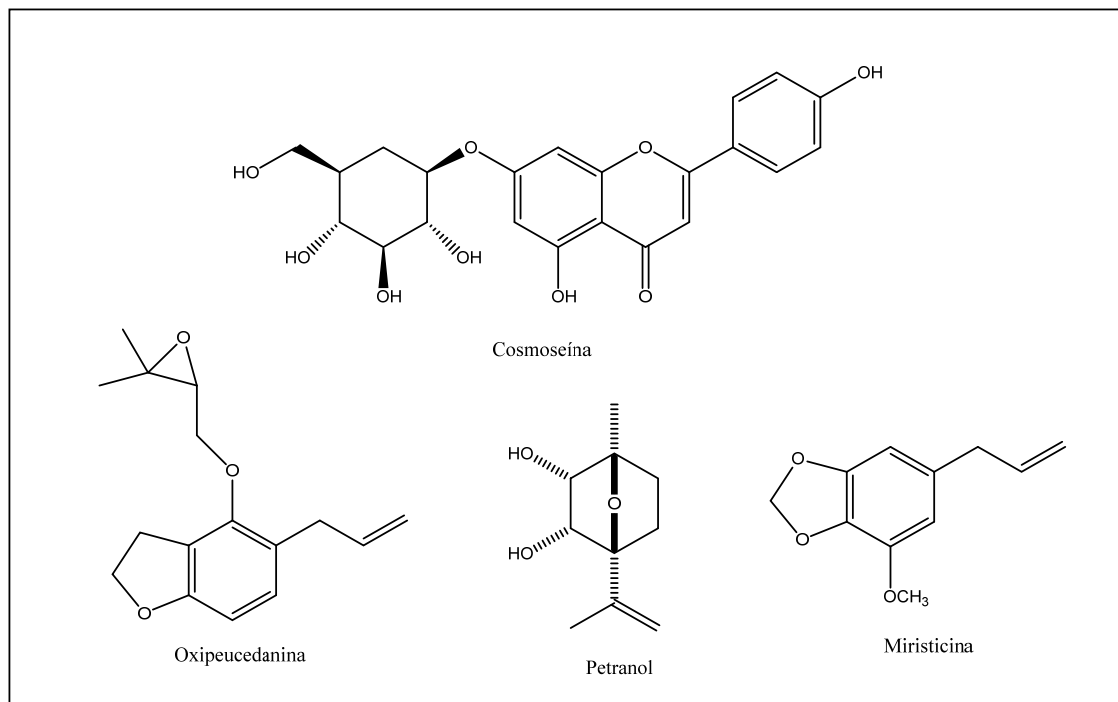


Figura 6: Compostos isolados a partir de *P. crispum*

Os flavonoides são os metabólitos secundários dominantes dessa planta, como a apigenina, luteolina, crisoeriol, quercetina e isoramnetina, tendo estes sido identificados em suspensão aquosa de cultura celular desta espécie. A triagem fitoquímica da salsa (*Petroselinum crispum*) revelou a presença de flavonóis (kempferol e quercetina) e tendo como compostos majoritários a classe de flavona (apigenina e luteolina) na forma de apiosilglicosídeo. Estes constituintes apresentam uma ampla gama de efeitos bioquímicos e farmacológicos e têm sido recomendados como agentes quimiopreventivos ou suplementos nutricionais. Acredita-se que o mecanismo predominante de suas ações biológicas resulte da atividade antioxidante, da inibição enzimática e da capacidade de eliminar os radicais livres. Portanto, especula-se que o efeito promotor do *Petroselinum crispum* pode ser devido aos seus constituintes de majoritários e o teor de compostos flavonoides na salsa é de cerca de 100 mg / 100 g de peso fresco. (HAIDARIA et al., 2011)

Das seis principais classes de flavonoides, os flavonóis (por exemplo, miricetina, quercetina, kaempferol) e flavonas (por exemplo, apigenina, luteolina) são os mais amplamente distribuídos em alimentos vegetais, onde são encontrados na forma de

glicosídeo (**Figura 7**). Na análise de flavonoides, a hidrólise é geralmente realizada e as agliconas resultantes podem ser identificadas e quantificadas, contudo, as condições de hidrólise devem ser otimizadas para que as agliconas sejam completamente liberadas, sem provocar a sua degradação. Os dois principais glicosídeos encontrados na salsa são a apiina (7-O-[β -D-apiofuranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucosil]-5,7,4'-trihidroxi-flavona) e o malonil-apiina (HAHLBROCK et al., 1971; LUTHRIA et al., 2008).

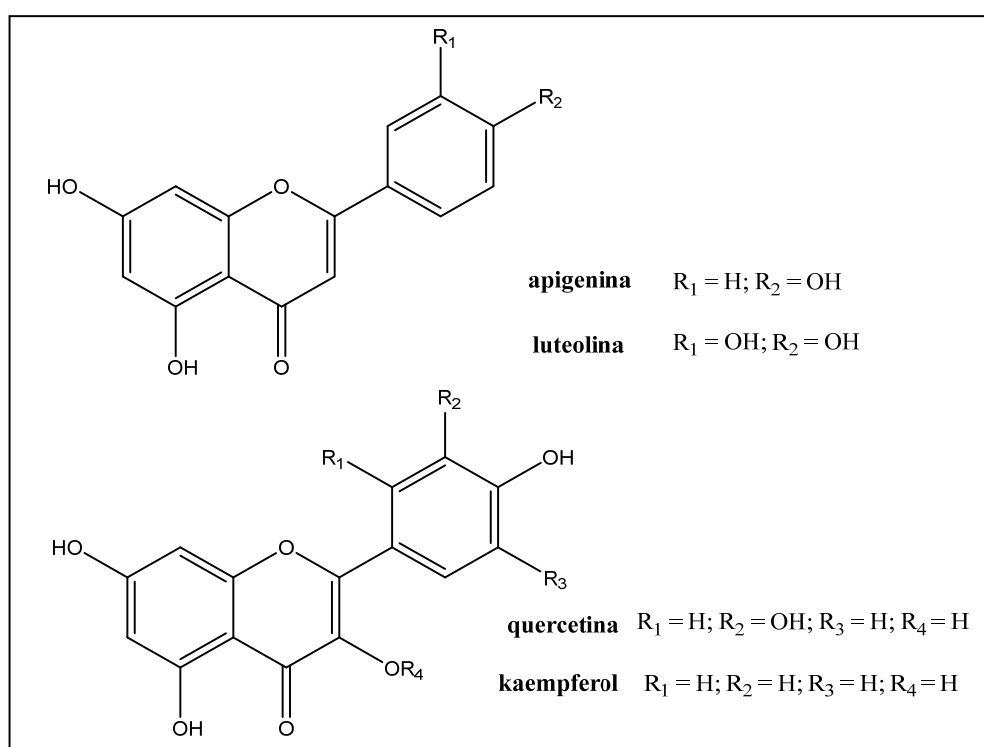


Figura 7: Estrutura de flavonóis e flavonas em forma de aglicona

Huber et al. (2009) avaliaram as fontes de flavonoides entre as hortaliças consumidas no Brasil, analisando inicialmente 20 diferentes hortaliças e verificaram que no caso da salsa há um alto teor de apiina, uma flavona presente em diversas plantas que vem ganhando interesse especial nos últimos anos como um alimento benéfico, proporcionando promoção a saúde devido à sua baixa toxicidade intrínseca e devido a relatos de potentes atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. As vantagens estão relacionadas principalmente aos flavonoides e sua atividade antioxidante, mas o efeito sinérgico de todos os produtos químicos é importante na terapia. Suplementação de dietas com folhas frescas de *P. crispum*

aumenta a capacidade antioxidante do plasma em ratos e diminui o estresse oxidativo em seres humanos (FARZAEI et al., 2013).

A apigenina e seus glicosídeos (apiina e apigenina-7-O-glicosídeo) são os principais flavonoides presentes na folha da salsa, apresentando propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticâncer, o que tornam a salsa um agente preventivo na terapia de degeneração oxidativa celular (**Figura 8**). A apigenina (APG, 4',5,7-trihidroxifavona) é um flavonoide de planta bioativa que pertence à subclasse flavona. As fontes naturais mais ricas do APG incluem flores secas de camomila, salsa, aipo, tomilho, orégano, azeitonas, cebola, cerejas, laranjas, brócolis, tomate, cevada, cenoura e legumes. As principais fontes de APG são apiina glicosilada, apigenina, vitexina, isovitexina ou roifolina. O consumo estimado deste fitoquímico varia de 0,2 a 18,0 mg por dia em humanos (SHUKLA & GUPTA, 2010; DOĞRU et al., 2012; KASHYAPA et al., 2018)

Alguns estudos publicados avaliam o uso da apigenina com potenciais efeitos sobre a saúde, como antioxidantes e atividades anti-inflamatórias, sendo que após o consumo oral de folhas de salsa, por exemplo, a aglicona da apigenina, é capaz de ser absorvida através do intestino, possivelmente por mecanismos de transporte passivo, como outros flavonoides, já citados anteriormente, indicando que os derivados glicosídeos possam ser hidrolisados pela β -glucosidase humana no intestino delgado (PÁPAY et al., 2016).

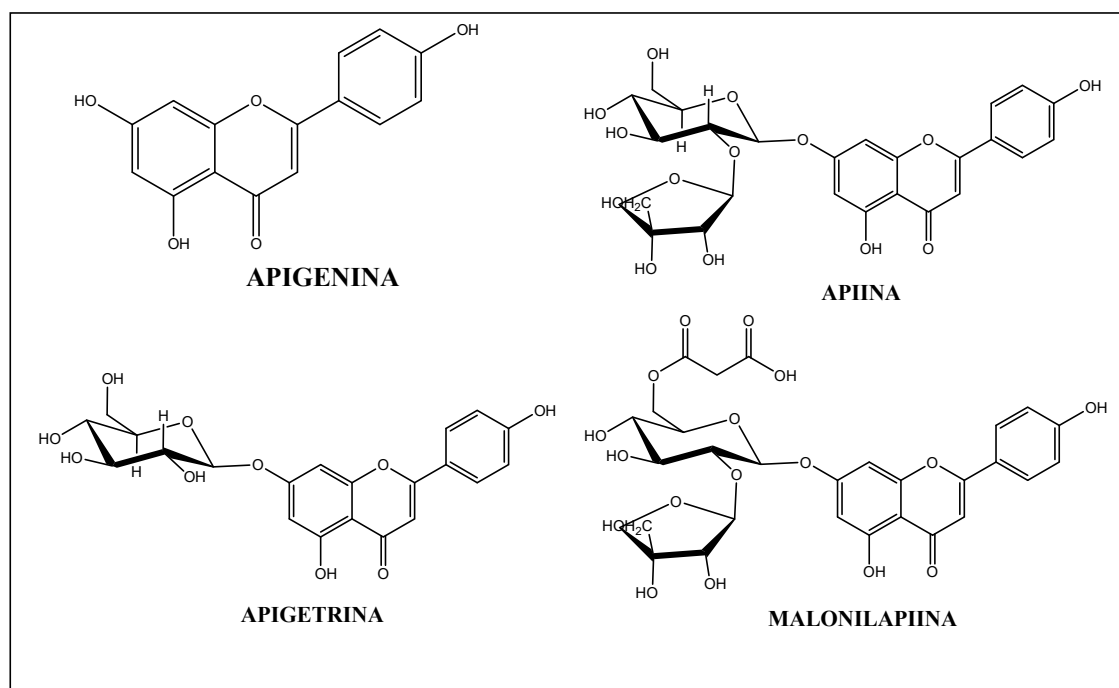


Figura 8: Estrutura química da apigenina (aglicona) e seus derivados glicosídeos

2.5. RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO

Estudos recentes revelam que fatores genéticos e múltiplos adquiridos podem alterar o equilíbrio homeostático no corpo e favorecer diversas doenças, e como forma de prevenir este processo é necessário restaurar este equilíbrio. A maioria dos desequilíbrios ocorre devido a um fenômeno homeostático entre antioxidante e pró-oxidante no organismo, resultante de uma alteração na concentração de radicais livres no corpo (JABEEN et al., 2014).

Os termos oxidante e redutor são denominações químicas, enquanto biologicamente estas moléculas são conhecidas como pró-oxidantes e antioxidantes, respectivamente. O pró-oxidante é uma substância que pode induzir danos oxidativos a vários alvos biológicos, tais como ácidos nucleicos (modificação de bases nitrogenadas quebra de fita dupla), lipídios (lipoperoxidação e alteração na estrutura de ácidos graxos) e proteínas (oxidação de resíduos específicos de aminoácidos com a formação de carbonilas, prejudicando a função de proteínas e enzimas) (MAGALHÃES et al., 2008).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas que agem como agentes pró-oxidantes, podendo interferir em reações normais do organismo, causando alterações fisiopatológicas e desequilíbrio homeostático. Esta alta reatividade é em parte devido à

instabilidade destas moléculas, principalmente por possuir elétrons desemparelhados. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (fatores endógenos) e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta, substâncias com elevada toxidez presentes no fumo e pesticidas, entre outros) (**Figura 9**).

Os radicais livres intracelulares podem também aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas naturalmente na cadeia respiratória durante o processo de respiração celular, alterando significativamente as propriedades da superóxido dismutase (SOD), exacerbando o dano oxidativo nas células e acarretando morte celular (NEHA et al., 2019).

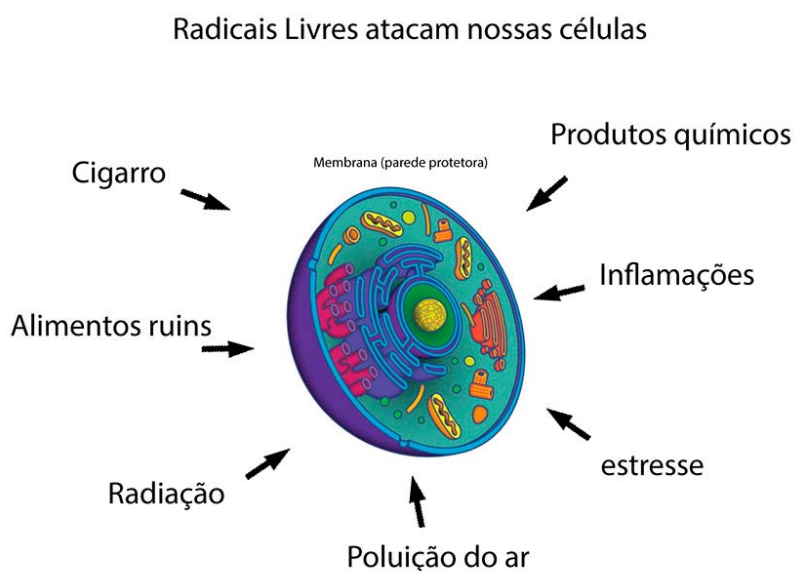


Figura 9: A natureza como fonte de ER: fontes relacionadas ao meio externo, geradores de espécies reativas de oxigênio, de nitrogênio, enxofre e cloro.

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de radicais livres por meio da cadeia transportadora de elétrons, durante a produção de energia a partir da glicose e do oxigênio. Os radicais livres também podem ser gerados na célula através de enzimas oxidantes (aldeído oxidase, flavina desidrogenase, ciclooxigenase, NADPH oxidase e do sistema citocromo P₄₅₀ oxidase), por processo oxidativo de pequenas moléculas (catecolaminas, flavinas e hidroquinonas) e através de um

sistema de carregadores de elétrons microsossomais e das membranas nucleares (ANDRADE JUNIOR et al., 2005; BARBOSA et al., 2010).

As EROs são moléculas capazes de reagir com biomoléculas intracelulares e consequentemente interferir nos processos biológicos e fisiológicos, sendo formadas de diferentes formas. Essas espécies têm a capacidade de ocasionar danos e estão envolvidas numa série de processos degenerativos, devido a propriedade de serem ou gerarem radicais livres. As principais EROs distribuem-se em dois grupos: as radiculares; hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e as não-radicalares; oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (NEHA et al., 2019).

O radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$) é o mais danoso ao organismo por não possuir um sistema enzimático capaz de neutralizá-lo e é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante. Esse radical causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. Em contato com aminoácidos e proteínas, o radical hidroxila pode reagir nas cadeias laterais onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, gerando danos com perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS et al., 2006).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs, porém a membrana celular é um dos principais alvos de ataques em decorrência de um processo denominado de peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas. Como consequência a esse processo ocorrerá a perda da seletividade na troca iônica e a liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e a consequente formação de produtos citotóxicos (FERREIRA et al., 1997).

Devido ao potencial tóxico dessas moléculas, mecanismos de proteção, representados pelos agentes antioxidantes, entram em ação para neutralizar esses compostos e impedir a injúria celular. O desequilíbrio entre o processo oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é conhecido como estresse oxidativo, e seus efeitos adversos na saúde humana estão associados à progressão de diversas patologias. A falta de antioxidantes, para poder “neutralizar” os radicais livres reativos, tem facilitado o desenvolvimento de doenças degenerativas no organismo humano, incluindo

doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e doenças inflamatórias (KRISHNAIAH et al., 2011).

2.5.1. Antioxidantes Endógenos e Exógenos

Os antioxidantes são substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas a do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação deste substrato de maneira eficaz, podendo ser encontrados naturalmente em nosso organismo e em alimentos. Os antioxidantes são capazes de reduzir eficientemente um pró-oxidante com a formação de produtos sem ou com baixa toxicidade, sendo responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, limitando os níveis intracelulares dessas espécies impedindo a indução de danos (COTINGUIBA et al., 2013).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a reação radicalar em cadeia através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis; e/ou reagindo com os radicais livres, formando um complexo que poderá reagir através de uma cascata de reações com outros radicais livres até a etapa de finalização/estabilização. Os antioxidantes secundários atuam retardando as etapas de iniciação da oxidação por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singleto.

As defesas antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas pela dieta, atuando através de estratégias de defesa que incluem diferentes níveis de proteção, podendo ser divididas em três formas principais de atuação: evitar a formação de EROs, neutralizar a ação dessas espécies reativas e reparar os danos ocasionados por elas (LUZIA et al., 2009). Estas substâncias (**Figura 10**) representam a defesa dos organismos contra as espécies reativas de oxigênio e são divididas em dois tipos principais, as não enzimáticas e as enzimáticas. O sistema de defesa enzimático atua por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de radicais livres e espécies não radicais, relacionados aos danos oxidativos às membranas (CANUTO et al., 2010).

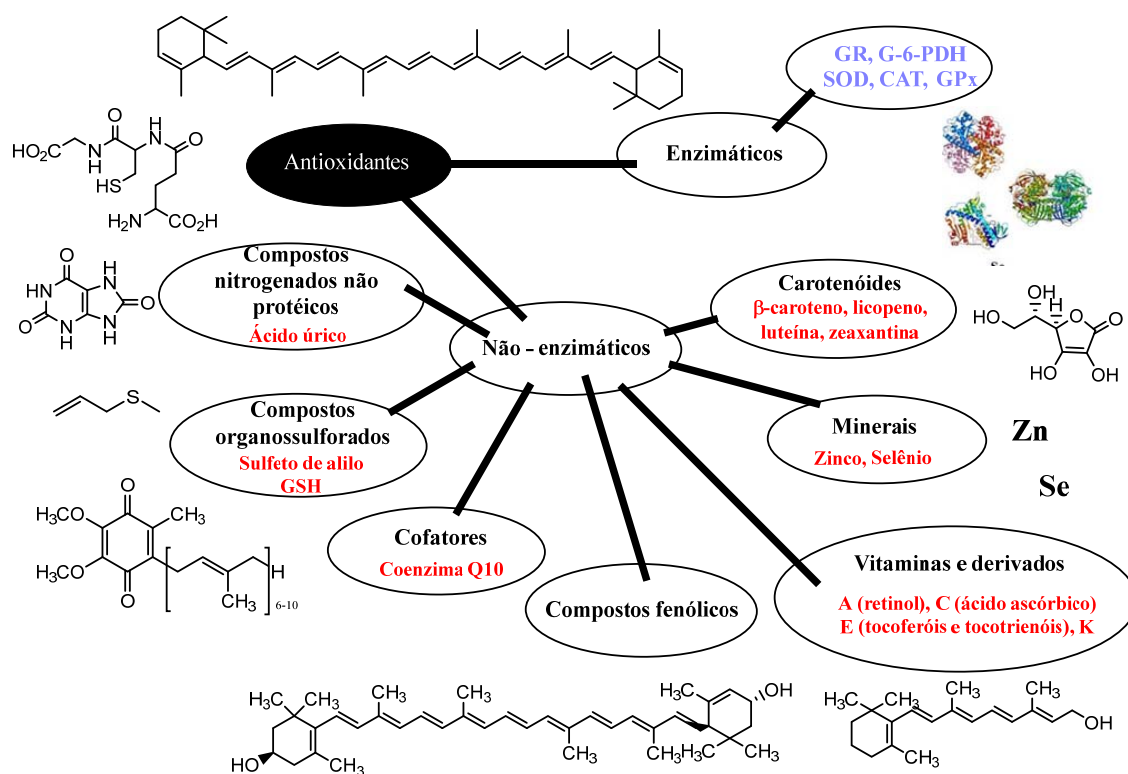


Figura 10: Classificação dos antioxidantes (azul: antioxidantes endógenos; vermelho: antioxidantes exógenos), adaptado de CHAVARRIA, 2014.

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. As defesas antioxidantes enzimáticas incluem a atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), que atuam prevenindo a formação ou neutralizando as EROs; além da glutaciona redutase (GR), glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH), glutaciona S-transferase (GST) (ALAM et al., 2013).

Embora o sistema antioxidante endógeno seja eficiente, em muitos casos isto não é suficiente para controlar o processo de estresse oxidativo, sendo necessário uma suplementação para que as concentrações de EROs permaneçam baixas. Alguns nutrientes essenciais podem atacar diretamente os radicais de oxigênio, atuando como uma defesa antioxidante não-enzimática. A vitamina E (alfa-tocoferol) é o maior antioxidante lipossolúvel presente em todas as membranas celulares e, portanto, atua na proteção contra a lipoperoxidação. Ela pode reagir diretamente com uma variedade de oxiradicais, como o ânion superóxido. Existe, ainda, uma série de outros antioxidantes não enzimáticos que

participam da defesa contra as espécies reativas de oxigênio nos sistemas biológicos, sendo captadores de radicais como, por exemplo, vitamina C, carotenoides, selênio, L-cisteína, curcumina, os flavonoides e outros compostos fenólicos de origem vegetal (SIES et al., 1997).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com sua fonte de obtenção como natural ou sintético. Os antioxidantes sintéticos mais conhecidos deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG); sendo os mais utilizados na indústria e apresentam eficiência no controle das reações de oxidação. Porém, apesar do alto poder antioxidante destas substâncias sintéticas, a partir dos anos 80 aumentou o interesse na busca de antioxidantes naturais, pois foi constatado que os sintéticos podem causar efeitos adversos em humanos devido à sua toxicidade a longo prazo, além de em muitos casos não contribuir com benefícios nutricionais (ZHANG et al., 2006).

Os antioxidantes naturais são moléculas presentes nos alimentos em pequenas quantidades, e possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres por diferentes mecanismos, principalmente reduzindo a velocidade das reações de oxidação dos compostos lipídicos. Existe uma demanda crescente por antioxidantes naturais devido a preocupações de segurança com antioxidantes sintéticos. Portanto, produtos naturais como frutas, sementes, legumes e verduras têm sido cada vez mais reconhecidos como potenciais fontes de agentes antioxidantes, devido à presença abundante de compostos fenólicos, e de outros compostos bioativos (QUIDEAU et al., 2011).

2.5.2. Métodos para Determinação da Atividade Antioxidante (AA) *In Vitro*

Os estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação da atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente nos últimos anos. As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, agindo como causador ou agravante, impulsionou a busca por novas substâncias capazes de prevenir ou minimizar os danos oxidativos às células.

Os testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais gerados, indicador de oxidação escolhido e método usado para sua detecção e quantificação. Em todos esses

ensaios um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência ou outra mudança mensurável (RODRIGUEZ AMAYA, 2010).

Existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas, envolvendo desde ensaios químicos com substratos lipídicos a ensaios mais complexos utilizando as mais diversas técnicas instrumentais. Os testes *in vitro* têm se tornado uma ferramenta importante na busca de substâncias bioativas, no entanto em uma mesma amostra pode haver misturas de diferentes mecanismos de ação, propiciando reações sinérgicas, tornando-se necessário a diversificação das análises para poder avaliar os possíveis mecanismos de ação de todas as substâncias antioxidantes presentes na amostra (PEREZ – JIMENEZ, 2007; ALVES et al., 2010).

Vários ensaios têm sido testados para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, como o sistema β -caroteno/ácido linoleico, o ABTS, o DPPH, o FRAP, ORAC entre outros. Esses ensaios medem a habilidade do antioxidante de sequestrar o radical e impedir a reação dele com o substrato, onde a absorvância da reação decai à medida que os radicais vão sendo consumidos. A seguir encontra-se uma breve descrição de alguns dos principais métodos para a determinação da atividade antioxidante (HUANG et al., 2005; STRATIL et al., 2006; WU et al., 2006).

- MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRIL-HIDRAZIL

O ensaio do DPPH• avalia a atividade de captação de radicais livres por uma molécula antioxidante (AH) através de um ensaio colorimétrico. O princípio consiste na mudança de coloração de uma solução púrpura (DPPH•) para uma coloração amarelada (DPPH) quando em presença de um agente antioxidante, uma vez que ocorre a redução do radical nesse ambiente onde há a presença de uma espécie doadora de hidrogênio (**Figura 11**) (BARROSO et al., 2011).

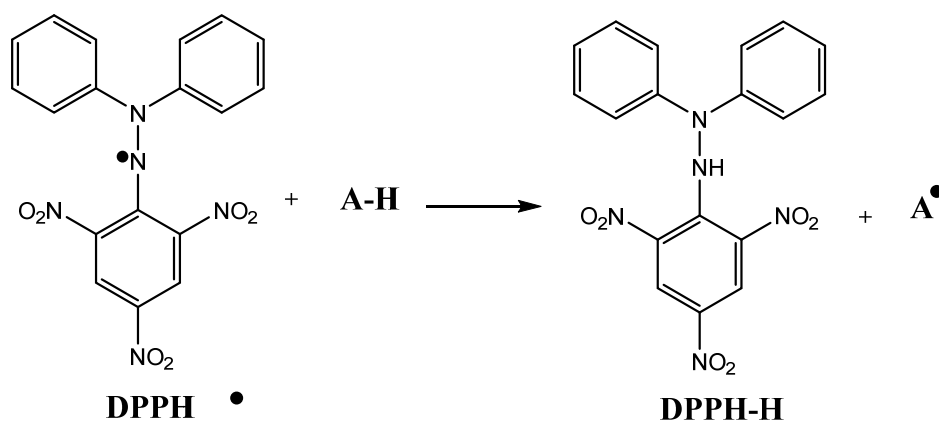


Figura 11: Mecanismo de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio (A representa a espécie antioxidante).

A molécula de DPPH• é caracterizada como um radical livre estável em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula, e a sua capacidade de eliminação é geralmente avaliada em meio orgânico, sendo monitorado o seu consumo a partir da medida da absorvância em 515-528 nm até permanecer constante, tendo como resultado a variação na velocidade do decaimento desta absorvância, estabelecendo-se que quanto mais rápido ocorrer o decaimento maior será o potencial antioxidante da substância avaliada (CHEN et al., 2013).

Este método é considerado um dos mais simples, precisos e reprodutivos na avaliação da atividade antioxidante de sucos de frutas, extratos vegetais e substâncias puras, tais como flavonoides e terpenoides. Os resultados deste método são relatados como a concentração eficiente (EC₅₀), que é a quantidade de antioxidante necessária para diminuir em 50% a concentração inicial de DPPH•; e o tempo necessário para atingir o estado estacionário com a concentração EC₅₀, sendo calculado a partir da curva cinética e definido como TEC₅₀ (MAGALHAES et al., 2008).

- MÉTODO DE CAPTAÇÃO DO RADICAL PEROXIL - MÉTODO ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Neste ensaio o radical peroxil é gerado pela reação do AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)] com o oxigênio atmosférico, que em contato com um indicador fluorescente forma um produto não fluorescente, que pode ser medido por

espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm (B-PE) e 578 nm (R-PE). O método avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peróxil, por transferência de átomos de hidrogênio; podendo-se comparar o decréscimo da fluorescência produzida na presença e na ausência do agente antioxidante (KRISHNAIAH et al., 2011).

O ensaio ORAC baseia-se no dano do radical livre causado por um reagente oxidante, resultando em uma perda de intensidade da fluorescência ao longo do tempo. O dano resultante pode então ser correlacionado com a quantidade de oxidante presente, mas também pode ser relacionada com a capacidade antioxidante do composto. Reações contendo antioxidantes e brancos são normalmente executadas em paralelo com um equivalente (usualmente *Trolox*). As reações são normalmente executadas até a estabilidade permitindo a determinação da área sob a curva cinética resultante (AUC). A proteção antioxidante pode então ser quantificada pela subtração da AUC da reação em branco daquelas reações contendo a substância analisada quanto ao seu potencial antioxidante.

A diferença resultante é considerada a proteção antioxidante conferida pela substância presente numa amostra. Os resultados podem ser expressos como unidades de ORAC ou equivalentes do *Trolox*, principal reagente padrão utilizado. Porém, se o gerador de radicais for o Cu^{2+} , o *Trolox* não pode ser usado como padrão, pois pode atuar como pró-oxidante na presença deste metal. Neste caso, a ação antioxidante será expressa em unidade antioxidante: uma unidade equivale à atividade antioxidante que causa o aumento da área sob a curva de decaimento de fluorescência de PE em 100% (ALVES et al., 2010).

Trolox, um análogo solúvel em água da vitamina E, é usado como controle positivo para este método, sendo o resultado expresso em termos da capacidade antioxidante equivalente do Trolox do extrato (TEAC/mg). Este é um dos ensaios antioxidantes mais amplamente utilizados para amostras de plantas. O método ORAC também pode ser usado para a detecção de $\bullet\text{OH}$ e outros radicais, modificando os iniciadores. Uma das principais vantagens deste ensaio frente aos outros métodos utilizados é a inclusão do uso do radical peróxil como reagente para o processo redox e o tipo de mecanismo de ação com maior semelhança aos processos fisiológicos, incluindo valor de pH semelhante ao do organismo humano (BISBY et al., 2008).

- ENSAIO ANTIOXIDANTE DE REDUÇÃO DO FERRO - MÉTODO FRAP

O ensaio FRAP mede a capacidade dos antioxidantes de reduzir o complexo férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina [Fe (III) - (TPTZ)₂]³⁺ ao complexo ferroso de cor azul intensa [Fe (II) - (TPTZ)₂]²⁺ em meio ácido. Este ensaio foi inicialmente descrito por Benzie e Strain (1996) como forma de medir o poder redutor no plasma, tendo sido posteriormente adaptado para avaliar o poder antioxidante de extratos de plantas. Os valores são calculados medindo-se o aumento da absorbância a 595 nm em meio ácido e relacionando-o a uma solução com poder antioxidante (**Figura 12**). Uma absorbância mais forte indica maior poder redutor do agente antioxidante, utilizando-se como padrão uma mistura de íons ferrosos ou uma solução padrão antioxidante. O ensaio é considerado simples e rápido, podendo ser aplicado de modo manual ou automático, em substâncias hidrofílicas ou lipofílicas (KRISHNAIAH et al., 2011).

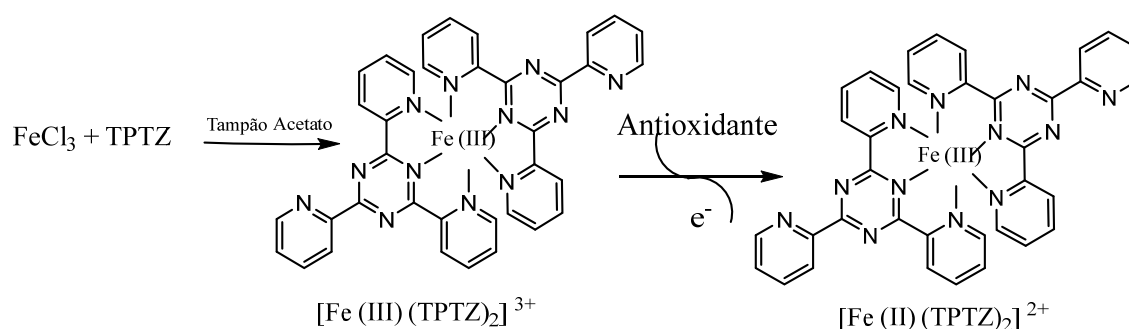


Figura 12: Reação química que descreve a produção de Fe²⁺ (forma ferrosa) a partir da redução de Fe³⁺ (forma férrica) presente no complexo com TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina)-FRAP, adaptado de BENZIE et al., 1996.

Os antioxidantes que reagem no ensaio FRAP são aqueles que podem reduzir, sob as condições usadas, o sal Fe³⁺-TPTZ para a sua forma Fe²⁺-TPTZ, que possui cor azul. Cada molécula de um antioxidante ativo pode doar um, dois ou mais elétrons dependendo de sua natureza, e assim podendo reduzir uma, duas ou mais moléculas Fe³⁺-TPTZ para a sua forma ferrosa. Os resultados do ensaio FRAP são expressos em µmol/L ou mmol/L, tendo como referência um padrão de solução contendo Fe²⁺ como o índice total da atividade antioxidante, pois representa a capacidade redutora de transferência de elétrons presente nos antioxidantes redox ativos na amostra (BENZIE & DEVAKI, 2017).

- MÉTODO DE ENSAIO DE SEQUESTRO DO RADICAL ANTIOXIDANTE ABTS^{•+}
(2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))

O método indireto do sequestro do radical ABTS 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) desenvolvido por Rice-Evans e Miller (1994) e modificado por Re et al. (1999) é amplamente utilizado com o intuito de medir a capacidade sequestrante do radical. Esse método aprimorado gera um cátion radical cromóforo ABTS^{•+} azul/verde através da reação do ABTS e o persulfato de potássio (**Figura 13**).

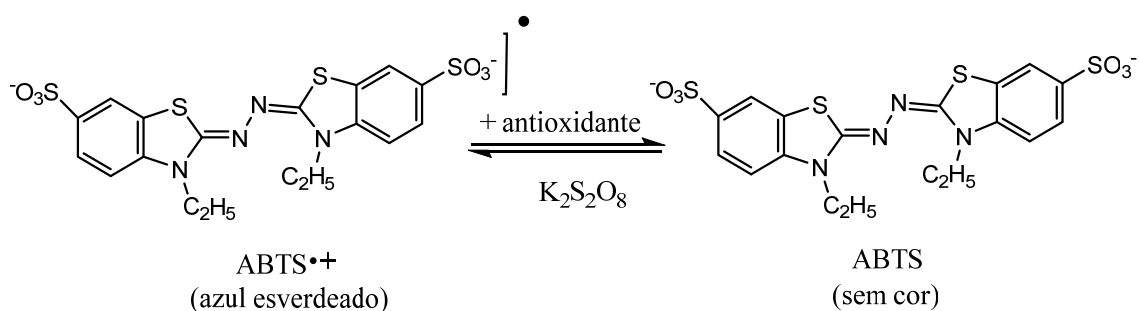


Figura 13: Redução do ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. Ação de estabilização do radical ABTS, adaptado de PRIOR, 2005.

O ABTS^{•+} necessita ser gerado antes por reações químicas ou enzimáticas, sendo solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise em amostras tanto hidrofílicas como lipofílicas. Para fins de ensaio antioxidante esta reação (oxidação e perda de um elétron e formação do radical catiônico ABTS^{•+}) pode ser realizada com o uso de persulfato de potássio (K₂S₂O₈), sendo o radical ABTS pré-formado antes da adição dos agentes antioxidantes, eliminando a possibilidade de que outras substâncias presentes na amostra possam interferir na geração do radical. Na medida que o antioxidante é misturado com esse radical ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional (TIVERON, 2010).

A eliminação do ABTS^{•+} pode ser facilmente detectada quantitativamente devido ao desaparecimento de coloração, e a extensão da descoloração caracteriza a porcentagem de inibição do cátion radical ABTS^{•+}, sendo determinada em função da concentração e do tempo, considerando-se as bandas máximas de absorvância de 730–734 nm para acompanhamento da reação. Os resultados são expressos em função do Trolox, padrão antioxidante geralmente utilizado (MAGALHÃES et al., 2008; ILYASOV et al., 2020).

2.5.3. Determinação da Atividade Antioxidante (AA) *in vivo*

A oxidação para muitos organismos vivos é essencial para a produção de energia necessária em diversos processos biológicos. Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), que são continuamente produzidas *in vivo*, são os principais responsáveis pela oxidação. Esses oxidantes danificam as células por reações em cadeia, como a peroxidação lipídica (LPO), a oxidação do DNA ou de proteínas. Danos ao DNA causam mutações e possivelmente câncer, se não forem revertidos por mecanismos de reparo de DNA; enquanto os danos às proteínas causam inibição enzimática, desnaturação e degradação de proteínas, comprometendo uma série de processos celulares. O cérebro é vulnerável a lesões oxidativas por LPO, devido à sua alta taxa metabólica e níveis elevados de lipídios poli-insaturados (ALAM et al., 2013).

Quando as defesas antioxidantes das células estão sobrecarregadas pela presença de quantidades excessivas de radicais ocorre o estresse oxidativo. Diversos produtos gerados durante as reações químicas são mensuráveis e utilizados como biomarcadores do estresse oxidativo, apresentando-se disponíveis em uma grande variedade de fluidos biológicos (urina, soro, suor, saliva e até mesmo o ar expirado). Embora a maioria desses métodos diagnósticos não se apliquem na prática clínica devido à complexidade e aos custos dos métodos, alguns indicadores indiretos podem ser utilizados com segurança durante a avaliação de pacientes (**Figura 14**) (WOOD et al., 2006).

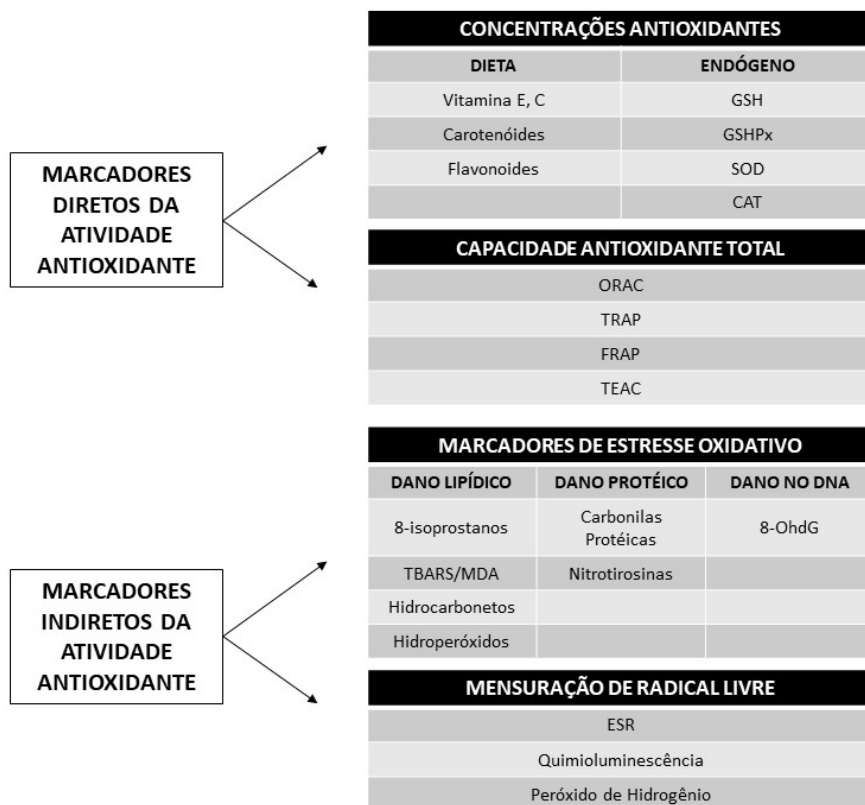


Figura 14: Biomarcadores do processo de estresse oxidativo (diretos e indiretos), adaptado de WOOD et al., 2006.

Alguns biomarcadores podem ser avaliados através de técnicas de ressonância paramagnética, entretanto, o alto custo para a obtenção dos reagentes e aparelhos torna essa mensuração pouco utilizada na prática clínica. Os métodos laboratoriais podem incluir a avaliação do nível de atividade de enzimas antioxidantes ou marcadores diretos da lesão celular. As enzimas antioxidantes comumente avaliadas incluem a SOD, GPx e CAT e podem ser obtidas por espectrofotometria ou cromatografia.

Outros biomarcadores, denominados produtos de danos oxidativos, também podem ser mensurados e o principal deles é o malondialdeído (MDA), formado ao final dos processos de lipoperoxidação. Os marcadores não enzimáticos incluem a dosagem de vitaminas dos complexos E, C e A; e de alguns cofatores como cobre, zinco, manganês e selênio sendo realizado com reagentes obtidos em kits comerciais disponíveis apresentando baixo custo acessível à prática clínica (CAMPOS & LEME, 2018).

O DNA é muito suscetível a danos induzidos por radicais livres, principalmente com a espécie radical hidroxila OH^\bullet , que é adicionado às bases nitrogenadas resultando na formação de bases de DNA modificadas causando quebra na fita. Essa alteração permanente no material genético resultante de dano oxidativo representa o primeiro passo envolvido em mutagênese, carcinogênese e processo de envelhecimento. A reação do OH^\bullet com a guanina dá origem a 8-hidroxi guanina (8-OH-G), onde sua dosagem urinária é um excelente marcador de estresse oxidativo e carcinogênese (OCK et al., 2012; GRAILLE et al., 2020).

A oxidação de proteínas ocorre principalmente pelo ataque de radicais O_2^\bullet e OH^\bullet , gerando como produto principal uma proteína carbonilada, que promove ligação intra/inter molecular e forma agregados proteicos. Esses agregados são incapazes de sofrer degradação via mecanismos proteolíticos, causando inibição desses processos e conseqüentemente promovendo acúmulo de proteínas oxidadas com aumento de disfunção celular; afetando a sinalização e estrutura celulares e processos enzimáticos, como o metabolismo energético e antioxidante. A determinação de proteína carbonilada é um excelente marcador de estresse oxidativo proteico, sendo o mais utilizado o ensaio de detecção de tirosinas modificadas (VALKO et al., 2007; FEENEY & SCHONEICH, 2012).

O processo de oxidação de lipídios é denominado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), que causa alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática, alterações no transporte iônico e inibição de processos metabólicos. A peroxidação lipídica tem recebido atenção nos últimos anos, visto a sua relação com alguns mecanismos biológicos subjacentes de vários distúrbios e doenças, como doenças cardiovasculares, câncer, doenças neurodegenerativas e até envelhecimento; com evidências crescentes mostrando o envolvimento da oxidação *in vivo* nessas condições (AMARAL et al., 2018).

As mitocôndrias são organelas importantes para a manutenção da homeostase celular, gerando e fornecendo energia para as células por meio da fosforilação oxidativa. O processo de fosforilação oxidativa envolve em paralelo a redução parcial do O_2 molecular, resultando na geração de um radical superóxido, que não consegue passar facilmente pelas membranas biológicas. Posteriormente, o radical O_2^\bullet é convertido pela superóxido dismutase mitocondrial ou superóxido dismutase de manganês para formar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na mitocôndria. O H_2O_2 é um composto liberado da mitocôndria no citosol celular e no núcleo, onde contribui para o estresse oxidativo (GUO et al., 2018).

No entanto, a membrana mitocondrial interna, próxima ao local de produção de EROs, está sujeita à peroxidação lipídica, possibilitando o aumento da permeabilidade de prótons pela membrana mitocondrial interna, alterando a fluidez e outras propriedades biofísicas das membranas mitocondriais. Este efeito também prejudica as funções bioquímicas de vários transportadores e enzimas nas membranas interna e externa da mitocôndria, desregulando a produção de ATP pelas células e comprometendo diversas funções celulares (BATTHI et al., 2017).

Além disso, os centros de ferro-enxofre das enzimas da cadeia são propensos a modificação oxidativa e a função de transporte de elétrons da mitocôndria pode ser prejudicada durante o estresse oxidativo. A disfunção mitocondrial se apresenta como uma das principais características do processo de envelhecimento, principalmente em órgãos que requerem uma fonte de alta energia, como coração, músculos, cérebro ou fígado. O cérebro é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo e sofre muitos danos, por causa de seu alto consumo de oxigênio, baixa concentração de defesas antioxidantes e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados muito propensos a serem oxidados (CENINI et al., 2019).

A disfunção mitocondrial é uma característica proeminente das doenças neurodegenerativas, como Doença de Parkinson, Mal de Alzheimer e Esclerose Amiotrófica Lateral. As EROs podem induzir mutações no DNA mitocondrial e danificar a cadeia respiratória mitocondrial, alterando a permeabilidade da membrana, a homeostase do Ca^{2+} e os sistemas de defesa mitocondrial; todos esses aspectos estão implicados no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, que mediam ou amplificam a disfunção neuronal durante o curso da neurodegeneração (**Figura 15**) (GUO et al., 2013).

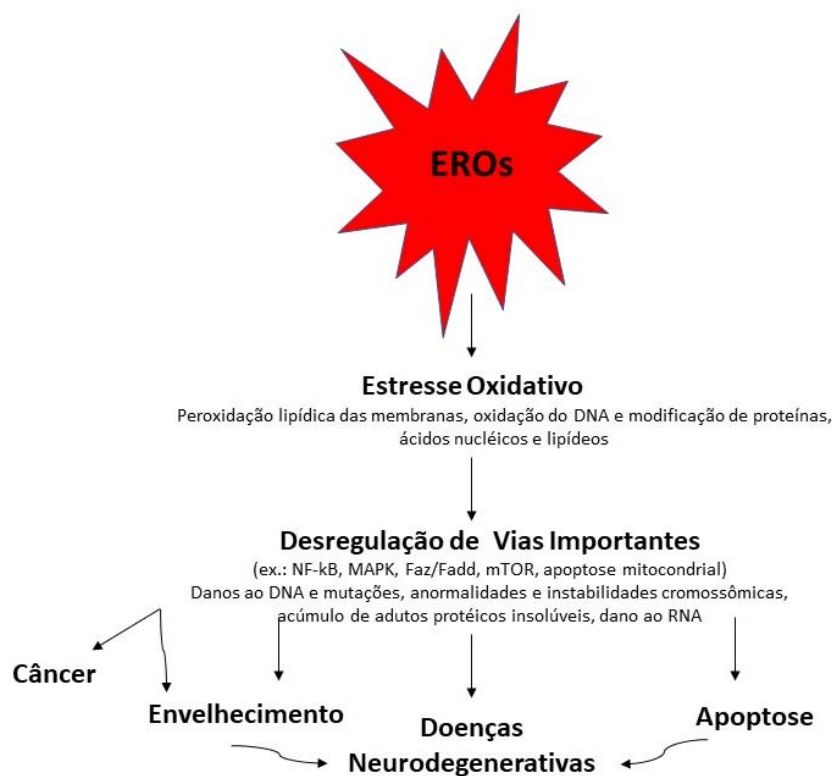


Figura 15: Diagrama esquemático dos efeitos das EROs nos processos celulares e suas consequências, adaptado de KUDRYAVTSEVA et al., 2016.

Os hidroperóxidos lipídicos são formados como produtos primários principais, mas são substratos para várias enzimas e sofrem várias reações secundárias. Substâncias reativas tiobarbitúricas, malonaldeído (MDA), isoprostanos e oxisteróis foram propostos como biomarcadores para avaliar o estresse oxidativo *in vivo* e suas doenças relacionadas. Cada método tem suas próprias vantagens e desvantagens. No entanto, geralmente esses níveis não são medidos simultaneamente em um único indivíduo, tornando difícil comparar os níveis de diferentes produtos de oxidação de lipídios como biomarcadores (YOSHIDA et al., 2013).

A peroxidação lipídica é um processo no qual os radicais livres, como espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio, reagem por reações radicalares com as insaturações presentes nos lipídios, processo que leva a uma mistura de produtos complexos contendo produtos oxidados, principalmente aldeídos, como hexanal, 4-hidróxi-2-nonenal (HNE) e o MDA (**Figura 16**). O malonaldeído é um dialdeído de três carbonos

e é conhecido por sua característica mutagênica em humanos, pois pode formar adutos com proteínas e DNA (PAPASTERGIADIS et al., 2012).

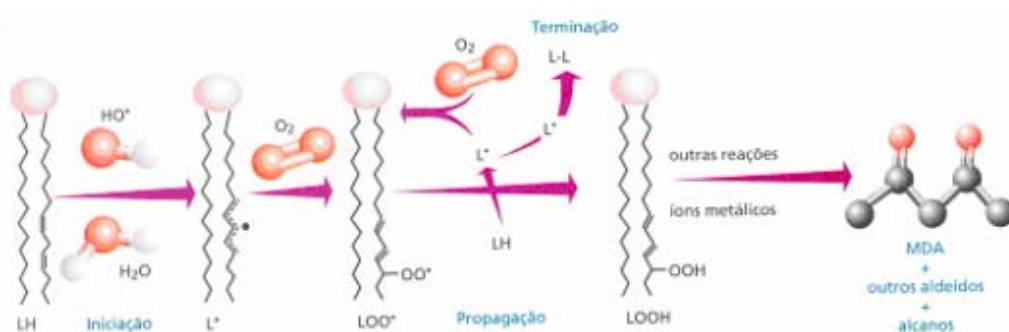


Figura 16: Etapas do processo de peroxidação lipídica, adaptado por OGA, 2003.

- ENSAIO PELO MÉTODO DAS ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

O malonaldeído (MDA) é um dos biomarcadores de estresse oxidativo usados com mais frequência para detecção de diversos problemas de saúde, como câncer, doenças neurodegenerativas, asma ou doenças cardiovasculares. Estudos mostraram que uma quantidade considerável de MDA pode ser potencialmente formada a partir das seguintes fontes: ácidos graxos com menos de três ligações duplas, endoperóxidos envolvidos na síntese de prostaglandinas e a degradação oxidativa dependente de ferro de aminoácidos, carboidratos, pentoses e hexoses por ação de radicais livres (KHOUBNASABJAFARI et al., 2015).

O MDA é um aldeído de três carbonos e baixo peso molecular que pode ser produzido por diferentes mecanismos. Dahle et al. (1962) postularam um mecanismo de formação de MDA baseado no fato de que apenas os peróxidos que possuíam insaturações α ou β para o grupo peróxido poderia ser capazes de sofrer ciclização para finalmente formar MDA. Uma rota de formação de MDA é descrita na **figura 17**. O alvo das espécies reativas é a ligação dupla carbono-carbono dos ácidos graxos poliinsaturados (I). Esta dupla ligação enfraquece a ligação carbono-hidrogênio, permitindo facilmente a abstração do hidrogênio por um radical livre. Em seguida, um radical livre pode abstrair o átomo de hidrogênio e se forma um radical livre lipídico (II), que sofre oxidação gerando um radical peroxila (III). O radical peroxila pode reagir com outros ácidos graxos poliinsaturados, abstraindo um elétron e

produzindo um hidroperóxido lipídico (IV) e outro radical livre lipídico. Este processo pode ser propagado continuamente em uma reação em cadeia. O hidroperóxido lipídico é instável e sua fragmentação produz produtos como o malondialdeído (V) e o 4-hidróxi-2-nonenal.

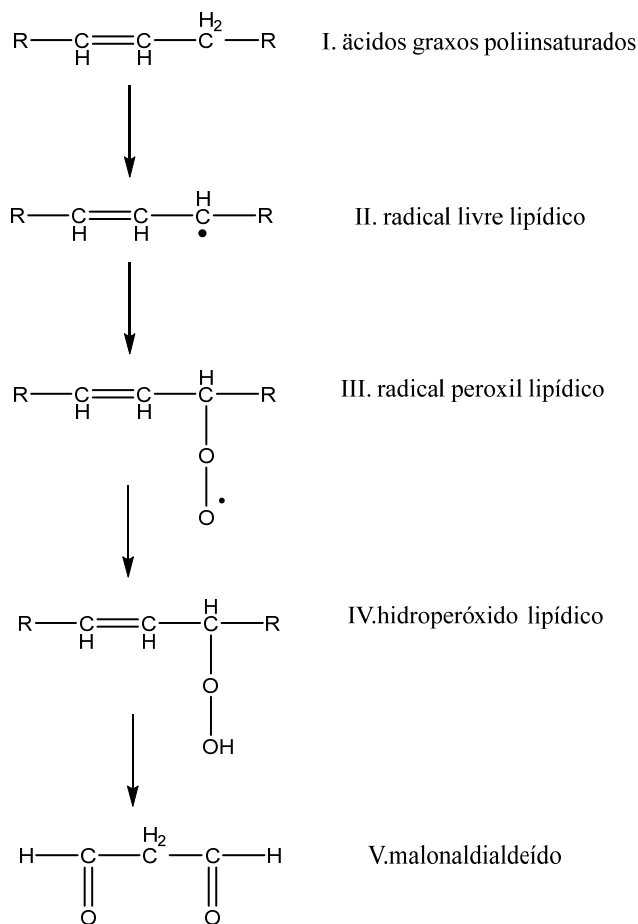


Figura 17: Etapas esquemáticas de formação do malondialdeído (MDA) a partir de ácidos graxos insaturados, adaptado de GROTTTO et al., 2009.

Nos últimos anos, o MDA tem sido reconhecido como um importante indicador de peroxidação lipídica, uma vez que indivíduos acometidos por diversas doenças têm os níveis de MDA aumentados, tendo como um exemplo o envolvimento da peroxidação lipídica no câncer. O câncer resulta do acúmulo de múltiplas mutações nos principais genes reguladores do crescimento, resultante da instabilidade do DNA e dos erros de replicação do DNA que resultam da exposição a genotoxinas exógenas e espécies reativas de oxigênio. O MDA é um contribuinte potencialmente importante para o dano e mutação do DNA que é produzido endogenamente via peroxidação lipídica. Katerji et al. (2019) sugere que o estresse oxidativo encontra-se aumentado em tumores cerebrais malignos, com níveis mais elevados de MDA sérico e tecidual quando comparados a controles saudáveis.

Apesar de sua especificidade analítica limitada e robustez, o ensaio tem sido amplamente utilizado como um método para avaliação da peroxidação lipídica em fluidos biológicos. O ensaio envolve a reação de produtos de peroxidação lipídica, principalmente o MDA, com o ácido tiobarbitúrico (TBA), que leva à formação de adutos MDA-TBA₂ denominados TBARS. TBARS produz uma cor rosa avermelhada que pode ser medida espectrofotometricamente a 532 nm (AGUILAR DIAS DE LEON & BORGES, 2020).

O ensaio TBARS é realizado em condições ácidas (pH = 4) e a 100° C. A rapidez, facilidade de uso e custo do ensaio de TBARS tornaram-no o método mais comum, apesar de algumas considerações e limitações do método, sendo estes principalmente: a) não especificidade da reatividade do TBA com o MDA e produção de MDA não oriundo da peroxidação lipídica; b) possibilidade de reação cruzada com outros aldeídos produzidos a partir da peroxidação lipídica; c) baixa estabilidade do MDA em amostras biológicas devido à sua alta tendência para reagir com proteínas e aminoácidos (KHOUBNASABJAFARI et al., 2015).

Embora existam ensaios químicos relativamente simples para avaliação da capacidade antioxidante, como relatado acima, em sua maioria estes não são representativos das condições celulares do homem. A avaliação da capacidade antioxidante é importante na medicina preventiva, sendo necessário que as informações sejam obtidas a partir de sistemas biológicos, sendo que o uso de experimentos utilizando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos (SOARES et al., 2005).

Também por conta da complexidade dos sistemas biológicos os ensaios químicos de AA estão cada vez mais sendo substituídos pelos celulares, utilizando-se para isso microrganismos; que se apresentam mais fáceis, rápidos e podem utilizar muitas células com as mesmas características genéticas. Várias razões tornaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo, pois seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P₄₅₀) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias (ĐORĐEVIĆ et al., 2018).

- A LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDO

Saccharomyces cerevisiae é um fungo unicelular, pertencente ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas, ou seja, àquelas que obtêm energia por meio da respiração celular ou pela fermentação de hexoses. Este microrganismo é eucariótico, como grande semelhança com células de mamíferos superiores; principalmente no que se referem às macromoléculas, estruturas, organelas e proteínas humanas, por conseguinte são amplamente estudados (SOARES, 2004).

Esta levedura pode ser facilmente cultivada em meio de cultura simples, possui um tempo de geração pequeno comparado às células animais, e por ter seu genoma completamente elucidado é possível a obtenção de cepas de mutantes através de todas as técnicas de genética clássica e molecular, favorecendo que a *S. cerevisiae* seja amplamente utilizada como modelo de estudo eucariótico (FÖRSTER et al., 2003).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um organismo usado como modelo para estudos bioquímicos e genéticos, visto a sua importância biológica no envolvimento de espécies oxidantes, especialmente os hidroperóxidos. As semelhanças das células de *S. cerevisiae* com as células animais, tanto ao nível de suas organelas quanto também de suas biomoléculas, pode ser constatada também pelo fato de que aproximadamente 30% dos genes relacionados a doenças humanas possuem ortólogos nesta levedura. Além disso, vários mecanismos observados em células humanas são conservados em *S. cerevisiae* (**Figura 18**), como a presença de mecanismos metabólicos similares e a existência de um processo de detoxificação, o que torna a utilização da levedura como modelo de estudo para tais processos (KHURANA & LINDQUIST, 2010).

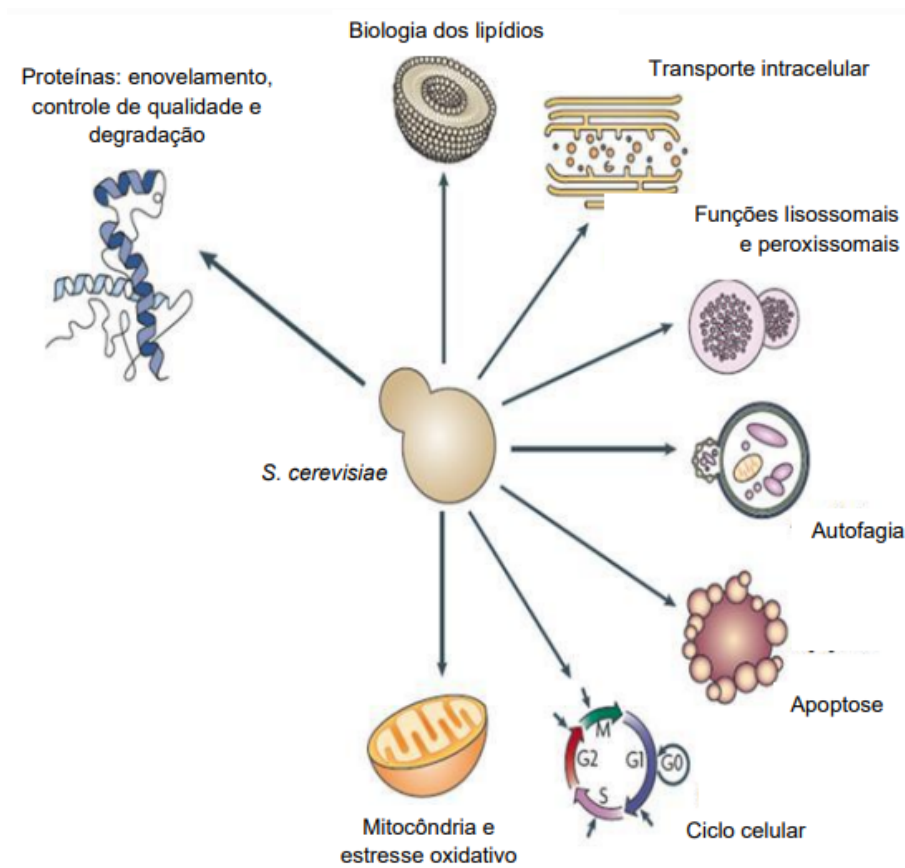


Figura 18: Processos celulares humanos conservados em *S. cerevisiae*, relacionados à membrana lipídica, funcionamento das mitocôndrias, geração dos EROs, proteínas, controle do ciclo celular e mecanismos de morte celular programada, adaptado de KHURANA & LINDQUIST, 2010.

Especificamente em relação a estudos relacionados ao estresse oxidativo as células de levedura são capazes de detectar o aumento de oxidação, causado pelas EROs, e desencadear uma resposta de adaptação que ativa os dois sistemas de defesa antioxidante: enzimático e não-enzimático. A adaptação celular causada pelo aumento dos níveis de EROs consiste na ativação de enzimas pré-existentes bem como na indução da expressão de genes de proteção que promovem o aumento da tolerância celular. É importante ressaltar que o sistema de defesa celular encontrado em *S. cerevisiae* contra as EROs é similar ao apresentado por células humanas (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001; MAGER & WINDERICKX, 2005).

Outra característica da levedura que desperta grande interesse na sua utilização como modelo eucariótico para estudos é o fato de apresentar duas importantes vias metabólicas. Essas vias estão intrinsecamente ligadas à disponibilidade de nutrientes: quando exposta a elevadas concentrações de glicose, seu metabolismo é fermentativo, e parte do seu sistema

respiratório é reprimido por um fenômeno denominado repressão catabólica, que é causada pela glicose. Por outro lado, quando expostas a fontes de carbono não fermentáveis, como o glicerol, por exemplo, passam a apresentar metabolismo respiratório, e é nessa condição que a expressão das enzimas do sistema antioxidante passa a ser completa, para que possam lidar com as EROs produzidas no processo de respiração. Essa característica ganha importância uma vez que, dependendo das condições às quais a *S. cerevisiae* for exposta, pode-se induzir ou não o desenvolvimento de seu sistema antioxidante (MORANO et al., 2012).

Na presença de concentrações superiores a 0,2% de açúcares fermentáveis ocorre o metabolismo anaeróbico; enquanto abaixo deste valor ocorre a ativação das enzimas que participam da biossíntese de moléculas responsáveis pelo funcionamento da mitocôndria e ativação de genes necessários ao metabolismo respiratório. Esta mudança de fonte energética leva a uma alteração na sua cinética de crescimento celular, com um crescimento mais lento (BRAUER et al., 2005).

As leveduras regulam a síntese de antioxidantes de acordo com a sua fase de crescimento. As fases conhecidas são: fase lag, onde as células estão em adaptação às condições de cultivo e estão se preparando para dividir-se; fase logarítmica ou exponencial, onde as células se dividem e proliferam-se; fase estacionária, onde o número de células novas corresponde às que morrem; fase de morte da cultura, onde o número de células mortas é maior do que as que são novas. A maioria dos estudos utiliza as culturas de células nas fases exponencial ou estacionária (**Figura 19**). Na fase exponencial a *S. cerevisiae* utiliza a glicose como fonte de energia e carbono, onde a maior parte da energia é produzida pela glicólise ou fermentação. Nesta fase, a participação da mitocôndria é irrelevante, assim como o consumo de oxigênio é baixo. Desta forma, nesta fase a produção de EROs é reduzida e a atividade de enzimas antioxidantes é baixa (LUSHCHAK, 2010).

Durante a mudança da fase exponencial para a estacionária há um aumento da utilização de etanol, formado na fase anterior, pela cultura de *S. cerevisiae*, como fonte de carbono e energia. Para a oxidação completa do etanol é necessário o funcionamento da mitocôndria acentuando a geração de EROs, o que eleva a atividade de enzimas antioxidantes para manter os níveis de EROs dentro dos limites seguros. Portanto, essa mudança de fase pode potencializar a geração de EROs causando estresse oxidativo (LUSHCHAK, 2010).

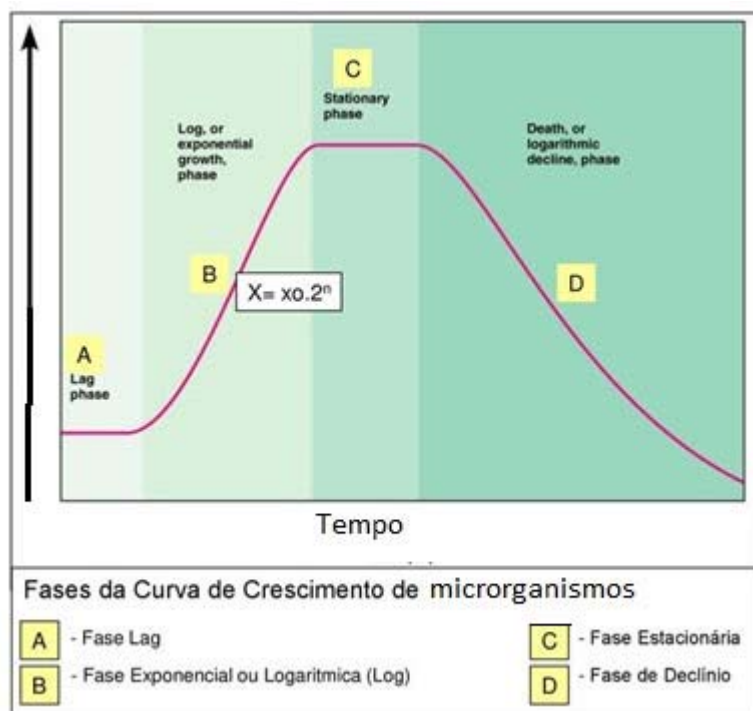


Figura 19: Etapas da cinética de crescimento de leveduras, de acordo com a fonte energética, adaptado de HERMAN, 2002.

2.5.4. Atividade Antioxidante de Plantas Mediciniais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde, e a maior parte dessa terapia envolve o uso de plantas e seus componentes ativos. Uma solução para esse problema é suplementar a dieta com compostos antioxidantes contidos em substâncias naturais de fontes vegetais, com a finalidade de ser utilizado como um tipo de medicamento preventivo (KNEKT et al., 1996).

A constatação que a ingestão de antioxidantes sintéticos pode causar genotoxicidade e carcinogenicidade devido ao consumo prolongado ou concentrações elevadas gerou a limitação do seu uso em diversos países, gerando um aumento no interesse na substituição de antioxidantes sintéticos por substâncias naturais em alimentos, fomentando a pesquisa sobre fontes vegetais, caracterização de matérias-primas e a identificação de novos compostos antioxidantes. Portanto, o desenvolvimento de antioxidantes mais seguros a partir de fontes naturais aumentou nos últimos anos, sendo as plantas a principal fonte de estudo (CHEN et al., 1992; SUHAJ, 2006).

Especiarias e ervas sempre foram usadas para dar sabor, cor e aroma há mais de 2000 anos, sendo utilizadas para a preservação de alimentos e bebidas, principalmente devido aos seus fitoquímicos. É conhecido que as especiarias e ervas aromáticas desempenham um papel importante na dieta humana, pois além de tornar a comida agradável e saborosa têm apresentado forte propriedade antioxidante. Estes alimentos são reconhecidos como fontes de antioxidantes naturais, devido aos seus efeitos protetores frente ao processo de estresse oxidativo, podendo ser usados como um meio para controlar a oxidação lipídica nos alimentos. Vários estudos têm demonstrado que especiarias e ervas como alecrim, sálvia e orégano possuem alta atividade antioxidante, identificando-se diversos compostos fenólicos em seus extratos, que foram caracterizados como responsáveis pela ação antioxidante (DORNAS et al., 2007; EMBUSCADO, 2015).

A capacidade antioxidante destes compostos é atribuída ao poder redutor dos grupamentos contendo hidroxilas fenólicas, capazes de reduzir os radicais livres reativos; além da formação de compostos intermediários relativamente estáveis devido a ampla distribuição de carga pelo sistema aromático. São classificados como antioxidantes primários, pois retardam ou inibem a etapa de iniciação de formação dos radicais livres, ou podem interromper a etapa de propagação de oxidação lipídica, diminuindo a formação de produtos de decomposição voláteis, como aldeídos e cetonas, sendo muito eficientes na prevenção da autoxidação. Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias correlacionadas, como arteriosclerose e o câncer (CHOE et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

Normalmente, ao considerarmos os compostos fenólicos em alimentos vegetais, os flavonoides são a classe predominantemente descrita representando aproximadamente dois terços do total de uma dieta humana. Ervas aromáticas e condimentos que contêm flavonoides são usadas há milhares de anos na medicina oriental, no entanto, ainda são pouco usadas de forma terapêutica na medicina popular do ocidente. Dentre os flavonoides, as flavonas e os flavonóis são de origem biossintética muito próxima, e há diversos estudos na literatura onde essas substâncias apresentam um maior número de relatos de atividade antioxidante. Os flavonóis são flavonas substituídas na posição C3 por uma hidroxila, sendo a apigenina e a luteolina livres (agliconas) ou conjugadas (heterosídeos) as flavonas mais

abundantes encontradas nas plantas, enquanto os flavonóis mais encontrados em vegetais são kaempferol, quercetina e miricetina (HEIM et al., 2002; SHAHIDI & AMBIGAIPALAN, 2005).

Os flavonoides podem prevenir lesões causadas por radicais livres através de diversos mecanismos (**Figura 20**), dentre eles a capacidade de eliminar os radicais livres através da doação de átomos de hidrogênio diretamente na molécula; ou ainda de forma menos específica, através da quelação de cátions metálicos de ferro e cobre, removendo assim um fator que provoca a geração do radical hidroxila (PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

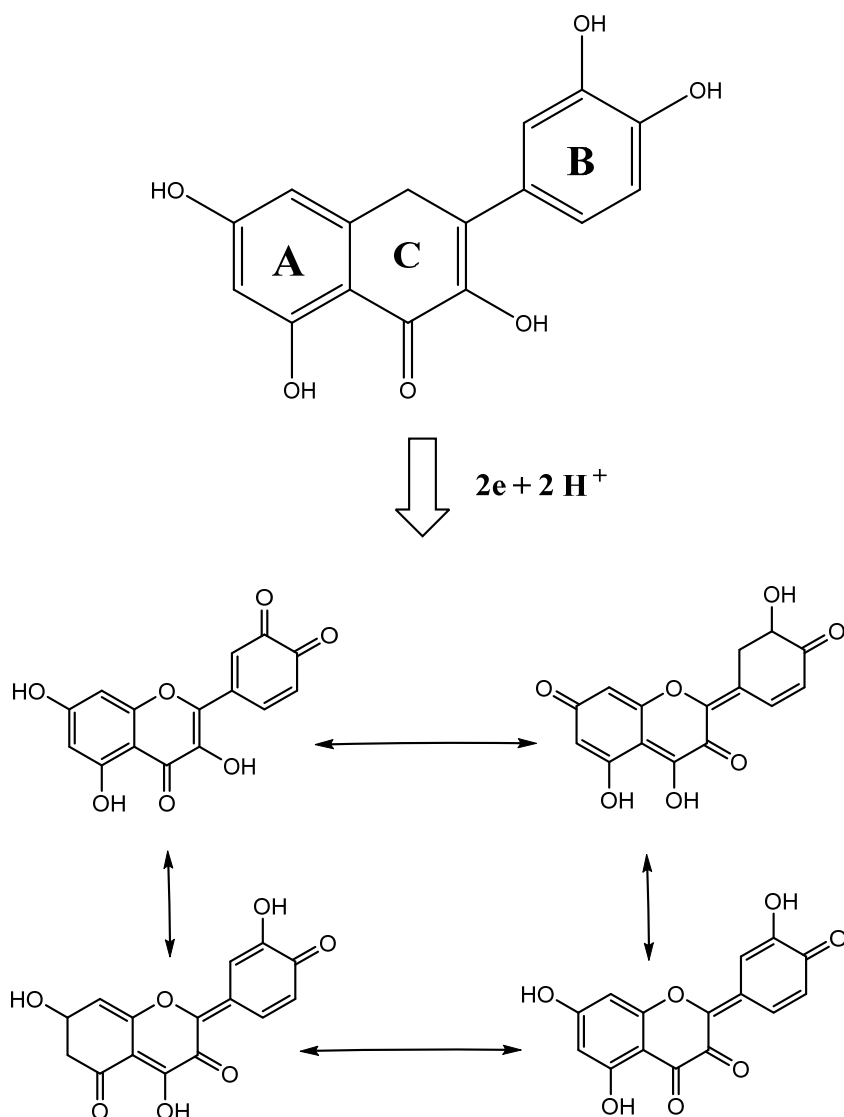


Figura 20: Estrutura da quercetina (ex. de flavonoide) e o mecanismo de sequestro de radicais livres (estruturas formadas em equilíbrio), adaptado de MUKAI & TERA0, 2013.

Outro mecanismo possível pelo qual os flavonoides atuam é através da interação com várias enzimas antioxidantes, pois são capazes de induzir enzimas desintoxicantes da fase II (por exemplo, NAD(P)H-quinona oxidoreductase, glutatona transferase, e UDP-glucuronosil transferase), que são as principais enzimas de defesa contra o processo de estresse oxidativo. Hirano et al. (2001) sugere que os flavonoides podem atuar como hidrogênio doadores ao radical α -tocoferil, que é um potencial pró-oxidante, pois em conjunto possuiriam um grande potencial para retardar a oxidação da molécula do LDL. Alguns outros mecanismos estão correlacionados à atividade antioxidante dos flavonoides (**Figura 21**) (PANCHE et al., 2016; NAGULA et al., 2019).

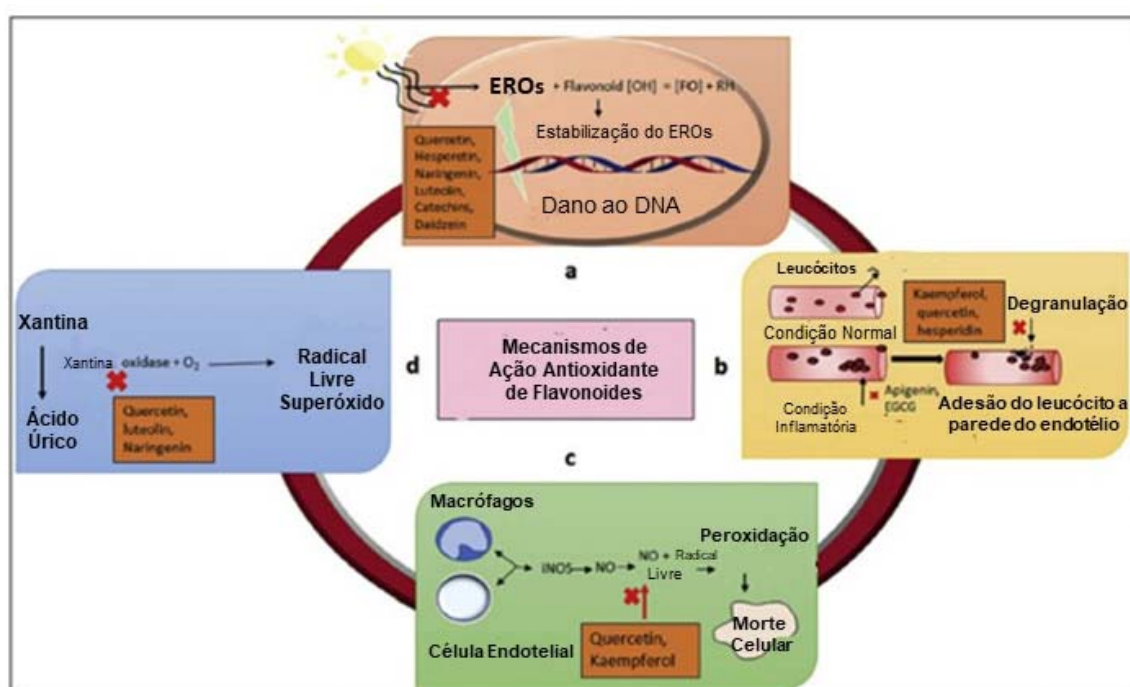


Figura 21: Mecanismos de ação antioxidante dos flavonoides por: a) inibição das EROs, b) imobilização leucocitária, c) inibição de óxido nítrico, d) inibição da xantina oxidase; adaptado de NAGULA et al., 2019.

Estudos demonstraram que adicionando folhas de *Petroselinum crispum* à dieta de 14 pessoas por uma semana causou um aumento significativo dessas enzimas envolvidas no processo de equilíbrio antioxidante homeostático em comparação com seus níveis no grupo controle. O constituinte que demonstrou ser o principal composto responsável por esta atividade foi a apigenina (APG, 5,7,4-trihidroxiflavona), pertencente à subclasse das flavonas oriunda da hidrólise da apiina, estando presente em quantidades muito baixas na

dieta humana. Algumas fontes alimentares importantes de apigenina, conforme identificadas até o momento, são a salsa e o aipo. Um estudo realizado na Finlândia com 11 pessoas (5 mulheres e 6 homens) identificou que uma ingestão diária média de 10 mg de flavonoides (quercetina, kaempferol, miricetina, luteolina e apigenina) foi estimada e a apigenina compreendeu 0,5% do total (FARZAEI et al., 2013).

Efeitos biológicos potenciais da apigenina são descritos *in vitro* e *in vivo*. Sugere-se que tenha propriedades anti-inflamatória, antiproliferativa e antioxidante. A apigenina é descrita como não mutagênica e não tóxica e alguns estudos evidenciaram a sua presença em amostras de urina após o consumo de salsa (MEYER et al., 2006). Telange et al., (2017) relatou que o tratamento com APG altera os níveis de glutathione, superóxido dismutase, catalase e peroxidase lipídica, respectivamente. Estudo apresentado por Begum et al., (2012) descreve que a apigenina exerce propriedade antioxidante via sequestro de radicais livres, e apresenta efeito protetor contra a peroxidação lipídica pelo processo de dano oxidativo induzido por radiação 3 Gy. Esta ação antioxidante reduziu os níveis de EROs, preveniu a morte celular apoptótica, inibiu os danos ao DNA induzidos por radiação e aumentou o status antioxidante. Além disso, o efeito protetor não foi visto quando a apigenina estava ausente (controle de radiação), indicando que a apigenina deve ser absorvida pelas células para exercer seu efeito protetor.

2.6.CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS NO ESTUDO DE FLAVONOIDES GLICOSILADOS

O princípio da cromatografia está baseado nas diferentes interações dos compostos com a fase móvel e a fase estacionária, sendo essas interações baseadas principalmente nas atrações moleculares das substâncias envolvidas. De acordo com a natureza desta interação os modos de separação são classificados em cromatografia em fase reversa, de fase normal, de troca iônica e por exclusão e à medida que estes compostos vão percorrendo o interior da coluna essas interações vão se desfazendo, ocorrendo deste modo a separação das substâncias (SHARMA & MULLANGI, 2013).

Para análise quantitativa o mais recomendado, segundo Liu et al., (2007), é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), geralmente utilizada para amostras farmacêuticas e biológicas. É a técnica cromatográfica mais versátil, segura, confiável e

rápida, e que tem como finalidade elucidar múltiplos compostos em um único cromatograma (REKHI et al., 2017).

Um aspecto importante é a possibilidade de acoplamento da CLAE a um método físico capaz de realizar com alto rendimento a detecção destes compostos químicos. A Espectrometria de Massas (EM) é apontada como uma das técnicas analíticas existentes que apresenta melhor sensibilidade; visto que as medições podem ser realizadas com apenas alguns microgramas de analito. A aplicação dessa técnica em estudos de metabolômica, proteômica, genômica, desenvolvimento de novos fármacos, caracterização e identificação de substâncias e seus metabólitos são alguns exemplos. Este acoplamento proporciona análises com alto grau de seletividade e sensibilidade, sendo primeiramente necessário converter a amostra líquida, proveniente do CLAE, para íons em fase gasosa para a detecção no analisador de massas (STOBIECKI et al., 2015).

A espectrometria de massas surgiu no início do século XX, quando Joseph John Thompson observou que raios positivos eram desviados de sua trajetória por campos elétricos e magnéticos e que o desvio era dependente de sua massa. A partir dessa descoberta foram necessários muitos anos de investigação científica até a técnica se tornar uma análise de fundamental importância em análises aplicadas, sendo utilizada desde estudos astronômicos até a medicina (SHARMA, 2013).

Esta técnica é comumente usada em química analítica e consiste em um dispositivo que analisa uma amostra química para determinar as relações massa-carga (m/z) de seus constituintes. Na espectrometria de massas um composto é ionizado, sendo os íons separados com base na razão m/z , e o número de íons que corresponde a cada unidade é registrado na forma de um espectro. A análise por EM fornece a exatidão de massas e conseqüentemente a composição elementar e o perfil isotópico de cada composto. O espectro de massa resultante fornece uma medida da abundância de cada partícula presente em sua proporção massa/carga para a amostra analisada. Isso geralmente é representado como um gráfico com m/z no eixo x, e no eixo y a abundância relativa de íons com essa m/z , também conhecida como intensidade. As informações sobre a estrutura molecular são derivadas do perfil de fragmentação (GROSS, 2017).

Existem diferentes arranjos instrumentais em EM cada um com suas vantagens e limitações, no entanto, todos apresentam as mesmas unidades construtoras básicas: sistema de introdução de amostra, fonte de ionização, analisador de massas e detector (**Figura 22**).

O processo se dá inicialmente pela injeção da amostra no equipamento, no qual é conduzida até a fonte de ionização. Na fonte de íons os componentes da amostra são convertidos em íons (positivos ou negativos), sendo imediatamente acelerados através de um campo magnético em direção ao analisador de massas. A função de uma fonte de ionização em um espectrômetro de massas é gerar íons na fase gasosa ou transferir espécies iônicas em solução para a fase gasosa. Existem diferentes tipos de fontes iônicas com propriedades distintas aplicáveis praticamente a todos os tipos de analitos (WONG et al., 2018).

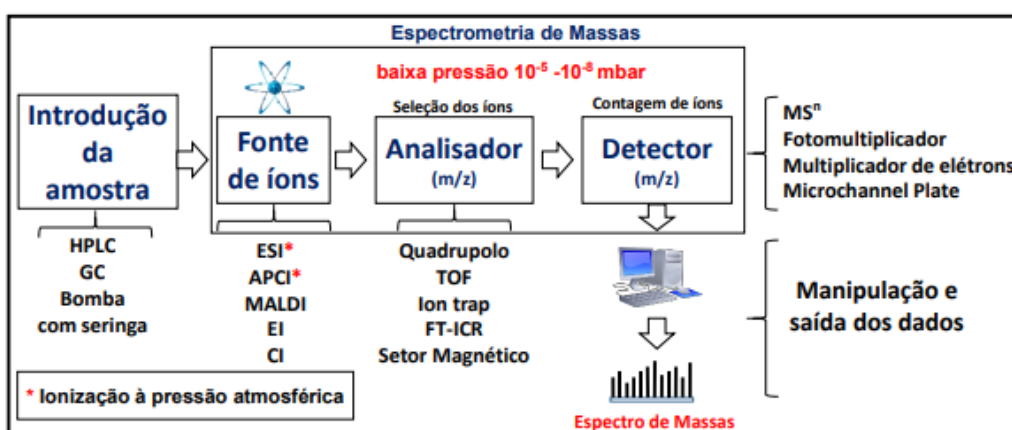


Figura 22: Modelo esquemático do espectrômetro de massas.

No analisador, os íons são separados de acordo com a sua relação m/z específica, e, chegando finalmente ao detector, cada íon gera um sinal próprio; transformando a corrente de íons em pulsos elétricos, e que posteriormente serão processados e analisados em forma de espectro de massas por um software adequado instalado em um computador (CHIARADIA et al., 2008).

Depois que os íons forem separados no tempo ou no espaço, de acordo com seu m/z , é responsabilidade do detector converter o sinal dos íons num sinal elétrico, gerando o espectro de massas registrado no computador. Nos instrumentos mais modernos isso é feito convertendo a energia cinética dos íons incidentes em uma corrente elétrica por colisão com uma superfície, gerando informações na forma de fragmentos que são necessárias para a identificação e caracterização da molécula (HOFFMANN et al., 2007).

Uma vez que todos os compostos fenólicos absorvem na região do UV (ultravioleta), o detector universal para este tipo de composto é o detector de arranjo de diodos (DAD). Este tipo de detecção não é destrutivo, o que representa uma vantagem

quando se pretende utilizar subsequentemente um outro sistema de detecção para adquirir mais informação, ou quando se pretende proceder ao isolamento de compostos. A disponibilidade de detectores de matriz de diodos aumenta a possibilidade de identificação dos compostos e permite o registro dos cromatogramas em diferentes comprimentos de onda. Este detector faculto o espectro de UV de cada composto eluído que, juntamente com o tempo de retenção, constituem dois parâmetros importantes para o processo de identificação dos compostos (WATERMAN & MOLE., 1994; KUMAR, 2017).

Devido à grande diversidade estrutural que os flavonoides glicosilados podem apresentar, diversos pesquisadores têm voltado sua pesquisa ao desenvolvimento de técnicas analíticas que proporcionem uma análise mais detalhada acerca destes constituintes vegetais. Assim, a cromatografia líquida e a espectrometria de massas emergem como ferramentas imprescindíveis no desenvolvimento destas análises, principalmente quando visa identificar o núcleo aglicona a ele ligado ou o sequenciamento dos glicosídeos. Durante os processos de análise por espectrometria de massas foi demonstrada a capacidade dos flavonoides glicosilados de formarem íons regulares referentes à parte aglicona, bem como de íons referentes a radicais formados da aglicona, obtidos por uma quebra homolítica por dissociação induzida por colisão (CID) (HVATTUM et al., 2003).

A análise de flavonoides glicosilados e das agliconas livres geralmente é realizada em amostras extraídas de material biológico, utilizando-se então de métodos de separação aplicados para a caracterização estrutural e para o perfil desses compostos, combinados com espectrômetros de massa, como a utilização de sistemas CLAE-EM que fornecem os íons moleculares e seus fragmentos. Os espectrômetros de massa usados nos sistemas CLAE-EM estão equipados com fontes de íons usando técnicas de ionização suave, que permitem fragmentação sequencial dos íons fornecendo informações sobre a estrutura da parte glicosídica e a aglicona. A ionização por eletropulverização (ESI) é mais adequada para conjugados de flavonoides, mas também a ionização química por pressão atmosférica (APCI) tem sido usada (KACHLICKI et al., 2016).

Esta técnica é empregada principalmente para rastrear flavonoides e outros fenólicos em extratos complexos de plantas e para identificar características úteis através das vias de fragmentação. A grande vantagem do uso da técnica para análise de flavonoides é seu potencial para determinar ambas as formas, livre e glicosilada. A melhor

caracterização de flavonoides glicosilados pode ser alcançada com experimentos utilizando o MS_n (ou pseudo-MS³) nas amostras de derivados vegetais. Os valores *m/z* dos íons obtidos nos espectros permitem tirar conclusões sobre as massas dos anéis de açúcar (hexose, desoxihexose, pentose ou hexose ácida) ligados às agliconas. Flavonoides glicosilados são os principais metabólitos encontrados no extrato de *Petroselinum crispum*, podendo ser *O*- ou *C*-glicosilados (WOJAKOWSKA et al., 2013; EPIFANIO et al., 2020).

Etapas adicionais de elucidação estrutural de porções de açúcar conectadas ao flavonoide aglicona e a própria aglicona requerem a fragmentação dos íons [M + H]⁺ e [M - H]⁻ geralmente realizada em espectrômetros de massa aplicando o processo CID. Em geral, o substituinte hexosídico pode ser ligado à aglicona por ligações glicosídicas a um ou mais de seus grupos hidroxila (chamados *O*-glicosídeos) ou diretamente a átomo(s) de carbono (*C*-glicosídeos) (KACHLICKI et al., 2016).

A fragmentação de flavonoides em seus espectros de massa de primeira ordem fornece detalhes sobre suas estruturas, como por exemplo na fragmentação das ligações *O*-glicosídicas entre o flavonoide e os açúcares, sendo utilizados para elucidar os resíduos de açúcar. O número de porções de açúcar ligadas a uma aglicona pode variar de uma a cinco unidades, sendo descrita a clivagem com a identificação da perda de hexosídeos (162 Da), desoxi-hexosídeos (142 Da) e pentosídeos (132 Da). Adutos de sódio e potássio são frequentemente vistos durante a análise de flavonoides no ESI (modo positivo), sendo estes formados durante o armazenamento da amostra em forma de solução em frasco de vidro, podendo ser constatados principalmente durante a análise de flavanol-3-*O*-glicosilado e isoflavonas. Outros fragmentos importantes pelo método de ESI para a análise de flavonoides-*O*-glicosídeos demonstram a perda de água (18 Da), CO (28 Da) e C₂H₂O (42 Da); e a perda combinada de H₂O e CO (46 Da) é comumente observada em alguns tipos de flavonoides que apresentam padrões de fragmentação menores (KUMAR, 2017).

A via de fragmentação dos flavonoides-*O*-glicosilados começa com a clivagem de ligações glicosídicas e remoção das porções de açúcares, que envolve a clivagem da porção glicosídica através de uma reação de rearranjo (**Figura 23**).

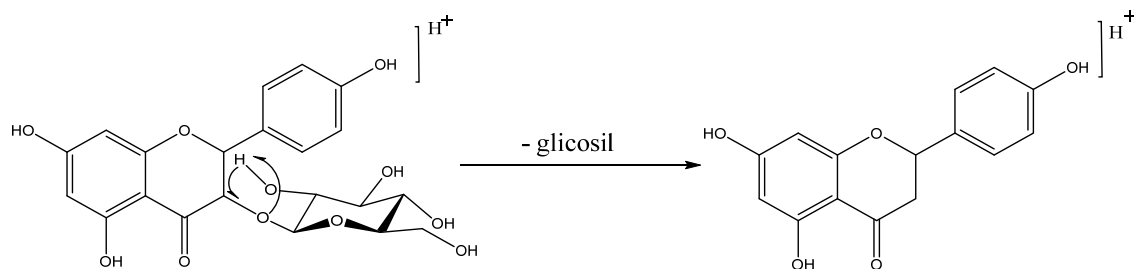


Figura 23: Clivagem da porção glicosídica em flavonoide-*O*-glicosilado, adaptado de KUMAR, 2017.

Flavonoides acilados ocorrem principalmente nas porções glicosídicas, podendo apresentar um ou vários substituintes de ácido alifático (por exemplo acético, malônico) ou aromático (por exemplo benzóico, gálico, p-cumárico, ferúlico ou hidroxiferúlico) podendo também ser encontrados em uma única molécula de flavonoide-*O*-glicosilado. Um dos substituintes acil alifáticos mais comuns dos flavonoides é o ácido malônico, que pode apresentar, em modo negativo, a fragmentação da porção malonil em duas etapas: na primeira etapa a descarboxilação do grupo malonil é observada e o íon $[M - CO_2 - H]^-$ é formado, seguido da perda do restante do resíduo acila (na forma de ceteno) (KACHLICKI et al., 2016).

Dependendo da estrutura, os flavonoides-*O*-glicosilados podem sofrer colisão induzida por clivagem da ligação *O*-glicosídica produzindo íons de agliconas de forma desprotonada. As fragmentações de flavonoides-*O*-glicoconjugados são simbolizadas de acordo com a nomenclatura introduzida por DOMON & COSTELLO, 1988 (**Figura 24**).

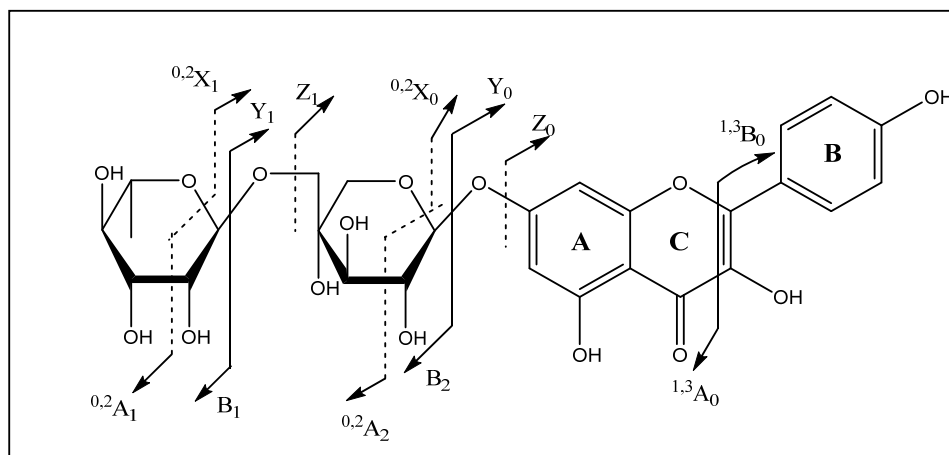


Figura 24: Fragmentação de flavonoides-*O*-glicosilados, representação em kaempferol-7-*O*-rutinosídeo, adaptado de FERRERES et al., 2004.

Quando a carga está localizada no fragmento de aglicona os íons são rotulados $^{k,l}X_{\pm j}$, $^{k,l}Y_{\pm j}$ e $^{k,l}Z_{\pm j}$, em que o índice j denota o número da ligação interglicosídica clivada (a ligação aglicona-glicosídica é numerada 0) e o sobrescrito k e l indica clivagens dentro dos anéis de carboidratos. Para fragmentos de carboidratos carregados os íons são designados $^{k,l}A_{\pm i}$, $B_{\pm i}$ e $C_{\pm i}$, em que o índice i (≥ 1) representa o número da ligação glicosídica clivada, contando a partir da extremidade não redutora numerada como 1 (FERRERES et al., 2004).

A natureza lábil da ligação *O*-glicosídica garante a quebra da ligação sob condições de baixa energia, levando à perda de resíduos neutros de açúcar, como citado anteriormente, e ao correspondente íon de aglicona $Y_{\pm 0}$ no caso de monoglicosídeos; sendo que a quebra das ligações glicosídicas tem como mecanismo de fragmentação o rearranjo de hidrogênio do açúcar para o oxigênio glicosídico, seguido da clivagem heterolítica da ligação glicosídica do hemi-acetal; levando posteriormente à eliminação de resíduos de mono ou dissacarídeos, sendo observados fragmentos neutros de 162u (glucose), 146u (ramnose), 132u (pentose) ou ainda 176u (ácido urônico). Isto possibilita a determinação da sequência dos carboidratos, os quais podem ser calculados pela diferença de m/z a partir do íon precursor e dos fragmentos correspondentes a X_i , Y_i e Z_i (CUYCKENS & CLAEYS 2004; DE OLIVEIRA et al., 2016).

Para flavonoides 3- e 7-*O*-glicosilados, no modo negativo, ocorre a formação de íons radical $(Y_0 - H)^{\bullet -}$ com elevada abundância, devido a clivagem homolítica da ligação açúcar-aglicona, apresentando-se como um íon muito comum em flavonas e flavonóis

devido a presença da ligação dupla em C2 – C3 no anel C. Para os flavonoides 4'-*O*-glicosilados o íon Y_0 tem sido encontrado como mais intenso. Entretanto, a razão dos íons $(Y_0 - H) \rightarrow Y_0^-$ é variável e depende da posição de substituintes, como os grupamentos hidroxila, acetila e os glicosídeos presentes no esqueleto da aglicona, bem como do padrão de hidroxilação do anel B e a posição dos resíduos glicosídicos (HVATTUM et al., 2003).

Flavonoides *O*-diglicosídeos, quando um dissacarídeo está ligado à aglicona, apresentam fragmentos $Y_{\pm 1}$ e $Y_{\pm 0}$, com energias de colisão mais altas favorecendo a formação do íon aglicona $Y_{\pm 0}$, os quais são formados a partir da reação de rearranjo das ligações interglicosídicas. Em baixa energia de fragmentação flavonoides *O*-glicosídeos sofrem clivagem heterolítica entre as ligações O–C do hemi-acetal, gerando íons Y_1 ; enquanto que em maiores energias podem ocorrer clivagens intra-glicosídicas, gerando os fragmentos $^{k,l}X_j$ (ABAD-GARCÍA et al., 2012; WANG et al., 2017).

Os flavonoides-*C*-glicosídeos podem ser facilmente distinguidos dos *O*-glicosídeos com base no padrão de fragmentação. Como as ligações glicosídicas C-C são mais estáveis, elas não são clivadas durante a dissociação induzida por colisão (CID) e a fragmentação desses compostos produz uma série de fragmentos resultantes da quebra dessas ligações dentro da metade do açúcar. A proporção dos diferentes fragmentos criados desta forma pode variar dependendo do tamanho do açúcar, da energia de colisão e da carga do íon estudado (COURTS & WILLIAMSON, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil de flavonoídico de *P. crispum* var. *crispum* e avaliar a sua atividade antioxidante, *in vitro* e *in vivo*, contribuindo na busca de alternativa terapêutica como potencial agente antioxidante natural.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter o extrato aquoso de folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum*, e realizar o isolamento dos flavonoides majoritário por precipitação espontânea do decocto e minoritário presentes, através do processo de hidrólise ácida;
- ✓ Estabelecer um perfil químico de flavonoides do extrato aquoso de *P. crispum* var. *crispum*, com base na análise por CLAE/DAD/EM por comparação com os espectros de massas de padrões de flavonoides e dados da literatura;
- ✓ Identificação quantitativa da presença de fenólicos e flavonoides totais no extrato aquoso de *P. crispum* var. *crispum*, por meio de ensaios químicos acompanhados por UV;
- ✓ Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* do extrato de *Petroselinum crispum* var. *crispum* por ensaios de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power);
- ✓ Avaliar a toxicidade e o efeito antioxidante *in vivo* do extrato de *Petroselinum crispum* var. *crispum* e dos compostos isolados (apiina e apigenina) utilizando como modelo de sistema biológico a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Produtos químicos e reagentes

Solventes para análises de LC-MS (metanol, acetonitrila, fórmica ácido e água ultrapura) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Poznan, Polônia). O reagente Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina (TPTZ), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e cloreto férrico foram obtidos da Sigma-Aldrich (Brasil). Os itens para preparo dos meios de cultura (extrato de levedura, glicose, peptona e ágar) foram adquiridos da Difco (EUA), enquanto o peróxido de hidrogênio e dimetilsulfóxido (DMSO) da Sigma-Aldrich (Brasil).

4.2. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO E ISOLAMENTO DA APIINA

Petroselinum crispum var crispum, de cultivo orgânico, foi obtido no Brasil, Rio de Janeiro: município de Volta Redonda - Fazenda Frutifique, lote 0316. As folhas frescas (100 g) de *P. crispum* crespas foram lavadas com água destilada e trituradas em um liquidificador de uso doméstico. Para a obtenção dos extratos por decocção aquosa 10% p/v foram pesados a droga vegetal, transferido para um béquer com o respectivo solvente extrator (água destilada), e levado ao aquecimento por 10 minutos, com temperatura controlada (80-90°C). O extrato foi filtrado para retirar os resíduos vegetais, sendo os extratos feitos em triplicata, dividindo o decocto em duas porções: parte do decocto foi congelado a -20°C e liofilizado para obtenção do extrato bruto de *P. crispum var. crispum* (PC - 2,5 g), que será utilizado posteriormente para as análises *in vitro* e *in vivo*. Uma segunda porção do decocto foi submetido a precipitação espontânea à temperatura ambiente produzindo um sólido que foi separado por centrifugação proporcionando um sólido branco que foi caracterizado como apiina (0,5 g), sendo utilizado na próxima etapa.

4.3. HIDRÓLISE ÁCIDA DA APIINA (OBTENÇÃO DA APIGENINA)

Os glicosídeos são normalmente hidrolisados e as agliconas resultantes podem ser identificadas e quantificadas por diferentes métodos, sendo um dos mais utilizados para flavonoides a realização da hidrólise ácida de vegetais, segundo publicado por Hertog et al. (1992) e reproduzido neste estudo. Com o objetivo de obtenção da apigenina foi realizada

uma hidrólise ácida da apiina (componente majoritário), onde foram adicionados 40 mL de metanol aquoso a 62,5% a 0,500 g de material da amostra liofilizado. A este extrato foram adicionados 10 mL de HCl 6 M e misturados cuidadosamente, seguido de refluxo na temperatura de 85 °C e tempo de 120 min com agitação regular. A amostra hidrolisada foi resfriada à temperatura ambiente, e 100 mL de metanol adicionado seguido de sonicação por 5 minutos, seguida de filtração obtendo-se um sólido amarelado, posteriormente identificado por métodos cromatográficos.

4.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAEFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Esta etapa foi realizada em parceria com o grupo chefiado pelo Dr. Piotr Kachlicki do Instituto de Genética de Plantas, Academia Polonesa de Ciências – Poznan, Polônia.

A obtenção dos dados de fenólicos e glicosídeos flavonoídicos presentes no extrato foi realizada em sistema CLAE-DAD-EM consistindo em um instrumento Agilent 1100 HPLC com um detector de fotodiodo PDA (Palo Alto, CA, EUA) e espectrômetro de massa Esquire 3000 ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com uma coluna X Bridge C₁₈ (150 mm Å ~ 2,1 mm , 3,5 µm de tamanho de partícula), e os espectros de EM foram registrados nos modos de íons negativos e positivos. O volume de injeção foi de 10 µL e a eluição foi conduzida com água contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e acetonitrila (solvente B) a uma taxa de fluxo de 200 L.min⁻¹. O gradiente de eluição foi iniciado em 8% de B e linearmente alterado para 10% de B em 10 min, depois para 25% de B em 30 min e para 98% de B ao longo de 10 min; seguido pelo retorno às condições estacionárias, onde a coluna foi reequilibrada por 10 min. Os parâmetros de EM mais importantes foram: a voltagem ESI da fonte de íons de -4 kV ou 4 kV; nebulização com nitrogênio a uma pressão de 30 psi e uma taxa de fluxo de gás de 9 L.min⁻¹; temperatura da fonte de íons em 310 °C, skimmer 1: -10 V. Os espectros foram digitalizados na faixa de 50-3000 *m/z*. Os espectros de EM (até EM⁵) e EM/EM foram registrados nos modos de íons negativos e positivos usando uma abordagem publicada anteriormente (OZAROWSKI et al., 2018). Os compostos individuais foram identificados por tentativa de comparação com espectros de massa de fragmentação e tempos de retenção aos dos compostos padrão, bancos de dados disponíveis online (PubChem, ChEBI, Metlin e KNApSack), dados da literatura e resultados anteriores obtidos neste laboratório.

4.5. QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo fenólico total para o extrato de salsa (PC) foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado (DENG et al., 2013; TLILI, et al., 2011), e a curva padrão foi preparada usando uma solução de ácido gálico em cinco concentrações diferentes (0, 2, 5, 10, 20, 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A essas diluições, foram adicionados 5,0 mL de água e 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu diluídos (1:10 em água destilada). Aliquota (0,5 mL) da amostra diluída de PC em solução metanólica (1,0 mg.mL^{-1}) foi transferida para um balão âmbar com tampa e 5,0 mL de água e 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (diluído 1:10 em água) foram adicionados. Agitou-se esta mistura durante 10 segundos e deixou-se repousar durante 5 minutos. Foi adicionada uma alíquota (2,0 mL) de solução aquosa de carbonato de sódio a 4% e a mistura foi deixada repousar por 2 h, sendo posteriormente a densidade óptica medida a 765 nm contra um branco. O conteúdo fenólico total foi calculado com base na curva de calibração do ácido gálico e expresso em equivalentes de ácido gálico (GAE), em miligramas por g de extrato seco.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor total de flavonoides no extrato de salsa (PC) foi determinado pelo método colorimétrico de cloreto de alumínio descrito por Quettier-Deleu et al. (2000). Com alíquotas de 0,5 mL, em triplicata da amostra diluída de PC em solução metanólica (1,0 mg.mL^{-1}), foram adicionadas a um volume igual de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5% (AlCl_3). Depois de repousar durante 15 minutos a densidade óptica foi lida no espectrofotômetro a 420 nm. O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando uma curva padrão de quercetina nas concentrações de 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As amostras foram analisadas independentemente em triplicata e o conteúdo total de flavonoides foi expresso como mg de equivalente de quercetina por g de extrato seco.

4.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

4.7.1. Método DPPH

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) da amostra será avaliada pelo ensaio de radicais livres de DPPH, tendo sido este método desenvolvido por Ruffino et al.

(2007). Um total de 100 mL de solução metanólica de DPPH ($\approx 0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$) foi preparada diariamente, mantida no escuro à temperatura ambiente quando não utilizada. A mistura de reação consiste em adicionar 0,1 mL de amostra e 3,9 mL de solução de radical DPPH 0,06 mM em metanol. As alterações na cor (do violeta profundo ao amarelo claro) serão visualizadas por método espectrofotométrico, a 515 nm após estabilização da absorbância. O valor da atividade de eliminação (EC_{50}) expressa a quantidade de extrato necessária para diminuir a absorbância do DPPH em 50%. O valor pode ser determinado graficamente, plotando a absorbância contra a concentração de extrato usada ou calculada usando a inclinação da regressão linear.

4.7.2. Método FRAP

A capacidade de reduzir os íons férricos, avaliando a capacidade antioxidante da amostra, foi medida utilizando o método descrito por Benzie & Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado a partir de tampão acetato (acetato de sódio 300 mM, pH 3,6), solução TPTZ (TPTZ 10 mM em HCl 40 mM) e solução $FeCl_3$ (20 mM) na proporção 10:1:1 (v:v:v). O reagente FRAP (3,0 mL) foi adicionado a 100 μL da amostra em um tubo de ensaio e incubado em banho-maria a 37 °C por trinta minutos. A cor da solução mudou para azul escuro e sua absorbância foi medida usando um espectrofotômetro a 593 nm. Foram utilizadas soluções de concentrações conhecidas de Fe(II) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) de (0-2 mM) para a montagem da curva de calibração.

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vivo*

4.8.1. Cultivo Celular

A cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* usada neste estudo é a BY4741 (genótipo definido como *MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0*), obtida do grupo EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha. O meio de cultura sólido empregado foi YPD 2% (1% de extrato de levedura, 2% de glicose, 2% de peptona e 2% de ágar) em condições apropriadas. Em todos os experimentos células de um repique fresco foram transferidas para um meio de cultura líquido (inóculo) YPD contendo 1% de extrato de levedura, 2% de glicose e 2% de peptona, sendo levado ao agitador orbital (28 °C/160 rpm) por um período de 22 horas, respeitando a razão de 5/1 entre volume de ar e de meio dentro do erlenmeyer.

As células foram recolhidas após o tempo estipulado, encontrando-se na primeira fase de crescimento, chamada exponencial, cuja concentração das células necessariamente deve variar entre 0,8 a 1,2 mg de peso seco/mL. A partir deste momento, obtendo-se as células com crescimento desejado, procedeu aos testes subsequentes.

4.8.2. Ensaio de Toxicidade Celular do Extrato de Salsa e da Apiina

As células de leveduras retiradas do meio de cultura (20 mg) coletadas após o crescimento, ainda na fase exponencial ($OD_{600} = 0.8$ mg massa seca/mL), foram diretamente expostas ao extrato de salsa ($0,113 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,226 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 1 hora. Decorrido este tempo, recolheu-se um volume correspondente a 0,4 mg de células; onde, após diluições de 1.000 partes usando tampão fosfato de sódio 50 mM com pH 6,0, o plaqueamento foi realizado em triplicata em meio sólido YPD 2%, conforme **Figura 25**. As placas foram incubadas a 28 °C em estufa BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 72 horas e as colônias foram contadas, sendo a tolerância a toxicidade gerada pela amostra expressa em porcentagem de sobrevivência. A toxicidade da apiina foi realizada de modo semelhante nas concentrações de 0,01 mM, 0,1 mM e 1,0 mM nos tempos de exposição de 1, 2, e 24 h.

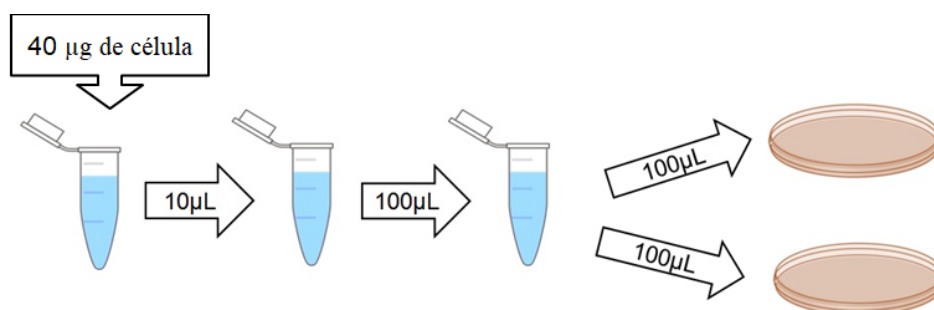


Figura 25: Diluições seriadas para posterior plaqueamento.

4.8.3. Avaliação da Atividade Antioxidante por Viabilidade Celular

Para este ensaio, uma suspensão celular ($1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) foi incubada com o extrato de salsa ($0,113 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $0,226 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) por 60 minutos a 28 °C e 160 rpm, por centrifugação os pellets foram recolhidos, lavados duas vezes utilizando tampão fosfato 50 mM, pH 6,0 e ressuspensos utilizando o mesmo tampão, sendo incubados com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 hora. O mesmo procedimento foi realizado com apiina (0,1 mM) ou peróxido de

hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM), e depois ressuspensos em 20 mL do mesmo tampão fosfato contendo peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) ou apiina (0,1 mM), respectivamente. As células expostas à apigenina (0,1 mM) e previamente expostas ao peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) também foram avaliadas. As soluções estoques de apiina e apigenina foram preparadas em dimetilsulfóxido a 50% e a concentração final de DMSO em contato com as células foi inferior a 3% devido à sua alta toxicidade em *S. cerevisiae* (SADOWSKA-BARTOSZ, et al., 2013). Os ensaios foram realizados com um grupo controle, que não foi exposto a nenhum agente; células sob estresse oxidativo expostas ao peróxido de hidrogênio; e células incubadas com extrato de salsa antes do estresse oxidativo e soluções de flavonoides antes e após o estresse oxidativo (**Figura 26**). Após os tratamentos, a viabilidade celular foi determinada plaqueando-se em triplicata em meio YPD solidificado após diluição adequada em tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) e a viabilidade foi expressa como porcentagem (extrato de salsa) ou unidades formadoras de colônia (UFC) (apiina e apigenina).

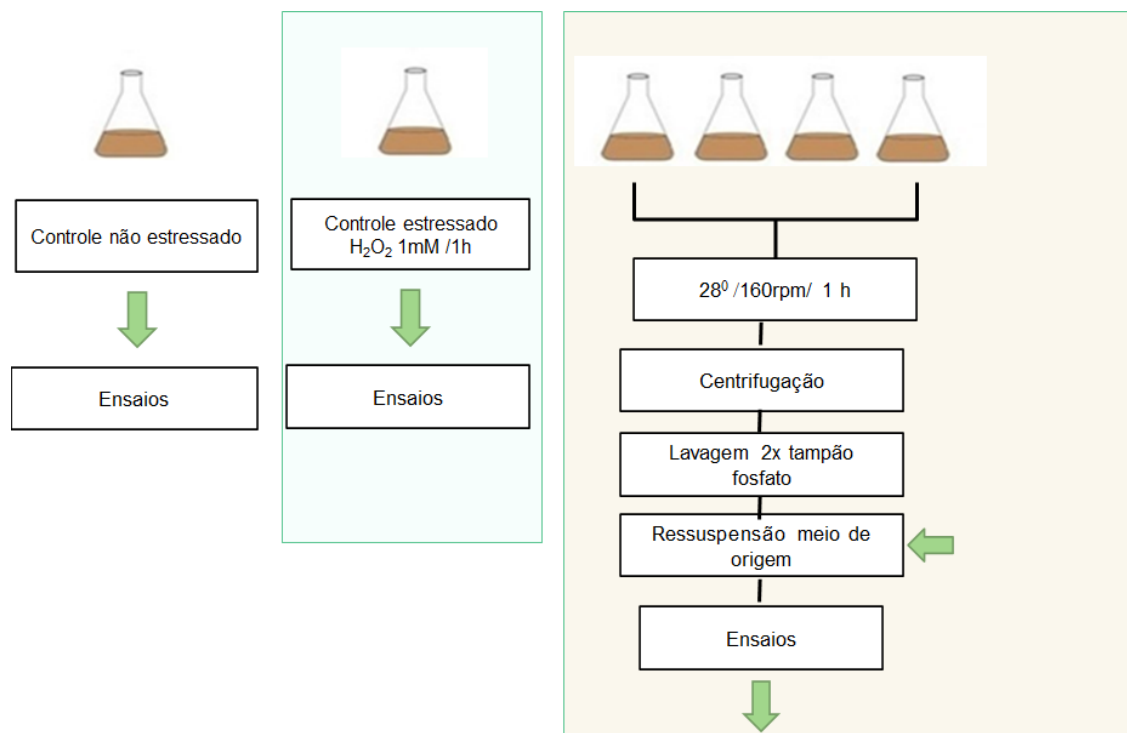


Figura 26: Esquema do tratamento inicial das células: (1) células + extrato de salsa + peróxido de hidrogênio ;(2) células + apiina 0.1mM + peróxido de hidrogênio; (3) células + peróxido de hidrogênio + apiina 0,1mM; (4) células + apigenina 0,1mM +peróxido de hidrogênio; (5) células + peróxido de hidrogênio + apigenina 0,1mM.

4.8.4. Avaliação da Atividade Antioxidante por Peroxidação Lipídica

Para avaliar a peroxidação lipídica, 50 mg (peso seco) de células de *S. cerevisiae* na fase exponencial de crescimento, pré-tratadas ou não com apiina (0,01 mM e 0,1 mM), apigenina (0,01 mM e 0,1 mM), ambos flavonoides (0,1 mM cada) ou o extrato de salsa, foram submetidas estresse oxidativo (1,0 mM de H₂O₂); por centrifugação vigorosa e lavado duas vezes com tampão fosfato (50 mM, pH 6,0) obteve-se um precipitado celular para prosseguimento do ensaio. Os pellets foram ressuspensos em 500 µL do mesmo tampão com ácido tricloroacético (TCA 10%) e, em seguida, foram adicionados 1,5 g de pérolas de vidro. As amostras foram lisadas por 6 ciclos de agitação de 20 s em um misturador de tubos conhecido como vórtex, seguidos por 20 s em gelo. Os extratos foram utilizados para a detecção de peroxidação lipídica (método TBARS) (**Figura 27**) (STEELS et al., 1994). A peroxidação lipídica foi medida como pmol de MDA por miligrama de células (malonaldeído)/mg.

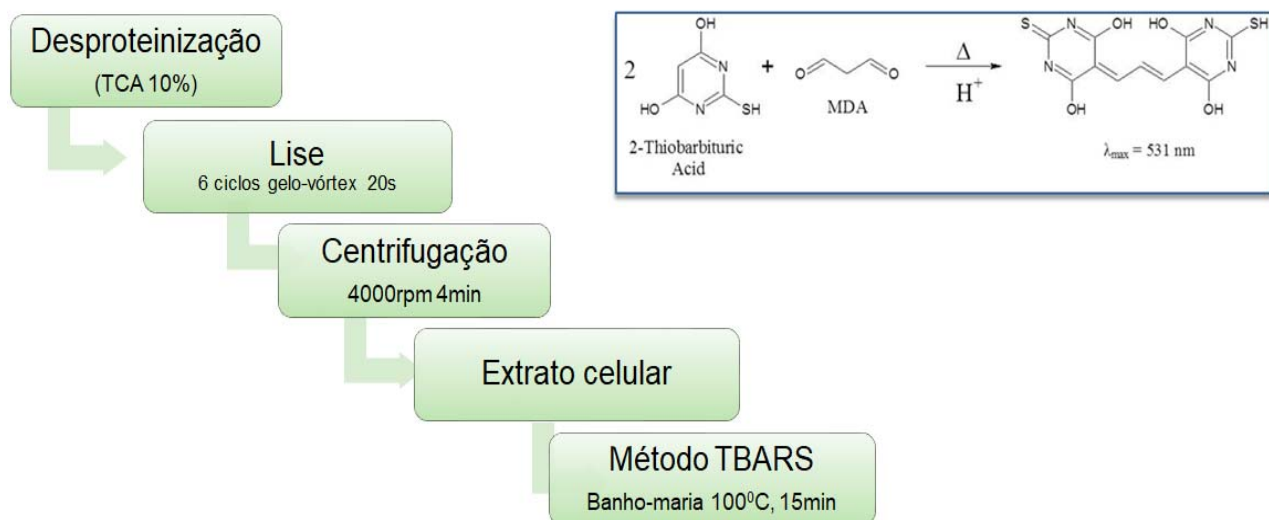


Figura 27: Ensaio de peroxidação lipídica pelo método TBARS

4.8.5. Testes Estatísticos

Realizou-se no mínimo três experimentos independentes para cada tipo de análise, utilizando-se o teste ANOVA como ferramenta estatística para validação dos resultados em

grupo e o pós-teste de Tukey para a comparação entre os valores individuais, com $p < 0,05$ em todos os resultados avaliados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PREPARAÇÃO DO EXTRATO, ISOLAMENTO DA APIINA E HIDRÓLISE PARA OBTENÇÃO DA APIGENINA

Neste trabalho optou-se por realizar os extratos com as plantas na forma como são utilizadas na alimentação, ou seja, utilizando a planta fresca, visto que alguns processos enzimáticos e químicos podem ocorrer durante a secagem podendo levar a oxidações e, outras alterações significativas da composição fitoquímica das plantas em análise. Deste modo, a avaliação das plantas aromáticas frescas, ao invés de secas, permite uma determinação mais real da sua aplicabilidade como alimento de elevada qualidade, com benefícios para a saúde humana (CAPECKA et al., 2005).

A análise foi realizada com amostra homogênea de 100 g de salsa fresca (*Petroselinum crispum* var. *crispum*) oriundas de uma única fonte, tendo sido coletada no mês de agosto de 2018, 60 dias após o seu plantio. Após a extração por decocção em meio aquoso, o rendimento dos extratos aquosos foi de 25,3% (p/p). Os extratos foram filtrados com auxílio de um papel de filtro e obtendo -se uma massa gelatinosa espessa que após secagem, este sólido foi caracterizado como apiina, com rendimento de 0,5% (p/p).

Os flavonoides constituem uma família de moléculas diversas que consistem em dois anéis aromáticos, que estão conectados por um anel pirano, sendo os flavonóis glicosilados predominantemente em frutas e verduras. A determinação quantitativa de flavonoides glicosídicos individuais é difícil porque não estão disponíveis para aquisição comercial os padrões para a maioria destes compostos, além do alto custo para sua aquisição. O processo de hidrólise dos glicosilados é uma técnica muito utilizada para liberar as agliconas, sendo um método prático. Neste estudo, utilizamos a aglicona, apigenina e o glicosilado majoritário apiina obtidas no processo de hidrólise e no processo de extração, respectivamente, como padrão nos ensaios da atividade antioxidante *invitro* e *invivo*.

Dependendo do tipo de açúcar ligado ao flavonoide, muitos parâmetros podem influenciar na eficiência da hidrólise como a composição de solventes, tempo de extração, concentração do ácido empregado, temperatura de extração entre outros, podendo ocorrer degradação ou mesmo hidrólise incompleta do glicosídeo. Hertog et al. (1998) definiram em seu estudo o uso do ácido clorídrico para hidrólise dos flavonóides, bem como maior

eficiência da extração dos flavonóides com solução aquosa a 50% de metanol. Para otimizar as condições de hidrólise e extração dos flavonóides o emprego de procedimento estatístico se faz necessário, pois leva em consideração as interações destes fatores.

Posteriormente o sólido obtido foi submetido ao processo de hidrólise completa dos glicosídeos flavonídicos (apiina convertida em apigenina), sendo alcançado por refluxo a 80° C, obtendo-se uma quantidade de apigenina na mistura, devido à sua formação a partir de seus glicosídeos. Com base nos primeiros resultados, foi realizada um segundo experimento na qual as eficácias da hidrólise foram testadas com HCl 1,2 M a 80 ou 35°C, com diferentes tempos reacionais, foram comparadas usando padrões puros selecionados (20 mg.mL⁻¹) separadamente, de modo semelhante a prática relatada por Nuutila, et al. (2002). A hidrólise por 16 h a 35 °C não foi eficiente o suficiente para gerar agliconas a partir de glicosídeos (apigenina), mas a hidrólise por 2 h a 80 °C com HCl 1,2 M gerou agliconas a partir de glicosídeos, que não eram mais detectáveis após a hidrólise por 2 h. Algumas mudanças neste processo foram realizadas, com o aumento de tempo reacional e/ou o aumento da temperatura, sendo todas as reações acompanhadas por cromatografia em camada fina. Em todos os tempos reacionais (60, 90, 120, 150 e 180 minutos) com a temperatura de 90 °C, a mistura reacional demonstrou degradação do material de partida e não formação da apigenina, embora seja descrito que os flavonoides glicosilados apresentem resistência à hidrólise ácida. A reação deste último processo obteve o maior rendimento (75,1%) de aglicona livre (apigenina), com 90% de pureza, tendo sido a hidrólise do flavonoide acompanhada por cromatografia em camada fina, utilizando-se padrões da aglicona e do flavonoide glicosilado e a solução reacional, em diferentes períodos. A aglicona obtida pôde ser facilmente determinada por HPLC. O método é simples, confiável e econômico, sendo a aglicona isolada em coluna C₁₈ de fase reversa na condição de eluição isocrática,) foi o flavonoide encontrado no extrato sem a introdução de ácido clorídrico. O espectro de absorção obtido por UV indicou que o composto exibiu a absorção característica de flavonoides, que mostra duas bandas de absorção em 300-380 e 240-280 nm (MERKEN & BEECHER, 2000). Após a hidrólise, esses picos de cromatografia diminuíram significativamente. Assim, é razoável especular que esses picos são os compostos de glicosídeos flavonoides, que se transformou em agliconas na solução ácida.

Vários dados publicados, com base na literatura disponível com diferentes vegetais e outros alimentos ricos em flavonoides demonstra que não há um único método adequado para hidrólise de material vegetal. O método de escolha é sempre um compromisso entre a

produção eficiente de agliconas da planta material e degradação de agliconas, visto que cada planta contém diferentes compostos fenólicos e flavonoides, resultando em suscetibilidade variável à degradação. No entanto, o método ainda é uma forma eficiente para obtenção de agliconas, sendo não adequado para obter dados quantitativos devido a possibilidade de degradação de agliconas. Os métodos de hidrólise sempre foram utilizados para a análise e elucidação estrutural de glicosídeos de ocorrência natural. Harbone et al. (1965), apontou a possibilidade de se distinguir *O*-glicosídeos de *C*-glicosídeos com a variação das condições reacionais aplicadas para a hidrólise completa; sendo os flavonoides *O*-glicosilados mais resistentes a hidrólise ácida (ex.: 7-*O*-glicosídeos), e o tempo necessário para a reação completa varia entre 5 minutos a 3 horas. A elucidação estrutural clássica se inicia com a hidrólise ácida gerando como produtos uma aglicona e resíduos sacarídeos que são analisados separadamente, portanto é importante o acompanhamento do processo visto que em grande parte das vezes a hidrólise ácida, pode gerar artefatos derivados de agliconas ácido-lábeis e dos resíduos sacarídeos.

As espécies *Petroselinum crispum* (salsa) e *Apium graveolens* (aipo), ambos da família Apiaceae, apresentam atividade antioxidante relacionada ao conteúdo de componentes fenólicos presentes nessas amostras. Luthria et al. (2006), relataram o isolamento de apigenina e outros compostos fenólicos através de diferentes técnicas aplicadas a *P. crispum*. Esses autores relataram que a apigenina é o componente minoritário nesta espécie em comparação com a apiina, um diglicosilado flavonóide encontrado como o principal componente. A apiina pode ser isolada da salsa através de diferentes técnicas de extração, usando metanol, etanol ou acetona como solvente e é encontrado como o principal componente da espécie em comparação com apigenina.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS (FLAVONOIDES GLICOSILADOS) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-DAD-EM)

A caracterização dos compostos presentes no extrato aquoso do *P. crispum* var *crispum* foi realizada pela análise dos íons precursores e seus fragmentos em ambos os modos negativo (ESI⁻) e positivo (ESI⁺). As agliconas identificadas foram flavonas, flavonóis, di-hidroflavona, além de seus glicosídeos correspondentes. Os compostos foram confirmados por comparação com as bases de dados online, e em revisões da literatura. A

análise de massas com a fragmentação de íons selecionados permite a identificação de fragmentos característicos das estruturas dos flavonoides glicosilados fazendo a elucidação de tipo de anel de açúcar presente na molécula e sua posição, podendo sofrer colisão induzida por clivagem da ligação O-glicosídica produzindo fragmento de aglicona desprotonada. A estrutura química dos flavonoides possuem características que através dos espectros de absorção na região UV, podem ser determinados pela presença do núcleo de benzopirona, com a presença de dois picos de absorção. As flavonas apresentam absorção máxima na faixa de 335-350 nm e flavonóis entre 360-380 nm.

As partes aéreas de *Petroselinum crispum* são ricas em flavonoides como a apigenina, apigenina-7-O-glucosídeo (cosmoseína ou apigetrina), apigenina-7-O-apiosil-(1→2)-O-glucosídeo (apiina), 6"-acetilapiína, diosmetina 7-O-β-D-glucopiranosídeo e canferol 3-O-β-D-glucopiranosídeo. A apiina é o flavonoide mais abundante na salsa, enquanto a apigenina é o componente minoritário, conforme relatado anteriormente na literatura (CHAVES et al., 2011; ANCUCEANU et al., 2018)

No nosso trabalho diferentes agliconas (Ag) foram encontradas no extrato aquoso das folhas do *P. crispum* var *crispum* com valores referentes de íons em m/z 269 (apigenina), m/z 285 (luteolina), m/z 299 (crisoeriol), m/z 301 (quercetina) e m/z 315 (isorhamnetina), conforme apresentado na **Figura 28**, sendo constatado em nosso estudo o que já é relatado em diversos artigos, que há uma maior predominância de flavonas e flavonóis na amostra (HEMPEL et al., 1999; HAIDARI et al., 2011; PAPUC et al., 2016). A presença de O-glicosídeo foi confirmada pela perda de 162u. (hexose), 146u. (desoxihexose) e 132 amu (pentose). Os compostos 14, 16, 20 e 26 foram identificados como derivados de apiosil-glicosídeo identificados pela diferença de massa entre os fragmentos precursores e o íon molecular referente a aglicona, confirmada pela perda de 294 amu (pentose+hexose). Outros fragmentos foram encontrados, como o grupo malonil (-OCCH₂-COOH) em 86u. (presentes nos compostos 6, 7, 16, 18-25 e 27).

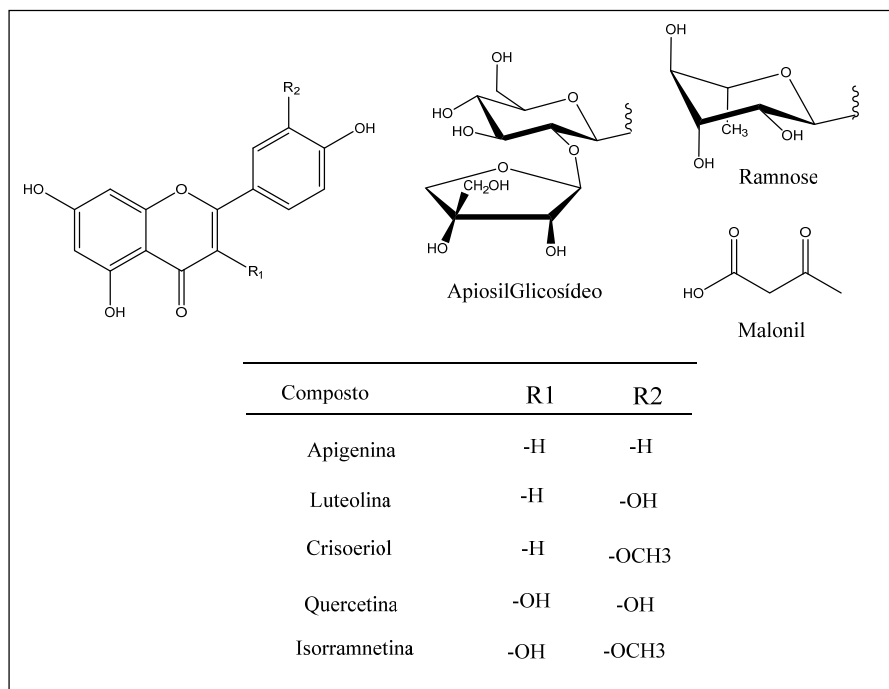


Figura 28: Estrutura química das agliconas, açúcares (apiosilglicosídeo e ramnose) e resíduo de malonil identificados no extrato aquoso de *P. crispum* var. *crispum*

Muitos ensaios espectrofotométricos têm sido utilizados para quantificar diferentes classes de compostos fenólicos, como antocianinas, flavonoides e taninos (condensados ou hidrolisáveis). Técnicas cromatográficas combinadas com diferentes métodos de detecção são preferencialmente utilizados para identificar e quantificar individualmente compostos fenólicos em plantas aromáticas. A CLAE é considerada ser uma técnica confiável e simples para a análise do controle de qualidade de compostos fenólicos em alimentos e em plantas aromáticas.

Este estudo levou à identificação de 27 compostos, tendo sido identificados como flavonoides glicosilados, sendo 7 destes compostos ainda não tendo sido relatado na literatura, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Nº	Rt (min)	Nome do Composto	Fragmentos m/z	ESI (+/-)	Referência
1	19,0	Quercetina dihexosídeo	625, 463, 301	-	Abu-Reidah, et al., 2018
2	20,4	Isorramnetina dihexosídeo	639, 477, 315	-	Barros, et al., 2012
3	20,7	Luteolina diglucosídeo	609, 447, 285	-	El-Zaeddi, et al., 2017
4	21,3	Apigenina-6,8-di-C-glucosídeo	593, 473, 353	-	Benayad, et al., 2014
5	24,6	Isorramnetina 3-O-(6-O-malonildiglucosídeo)	725, 681, 477, 315	-	n.e.
			727, 565, 479, 317	+	
6	26,7	Isorramnetina-dimalonil-diglucosídeo	811, 563, 315	-	n.e.
			813, 565, 479, 317	+	
7	28,1	Kaempferol-O-pentosil-hexosídeo	579, 447, 285	-	Zengin, et al., 2019
8	28,9	Isorramnetina-O-pentosil-hexosídeo	609, 477, 315	-	Zengin, et al., 2019
9	29,5	Luteolina-7-O-aposil-glucosídeo	579, 285	-	Lin, et al., 2007
10	29,9	Quercetina-O-pentosil-hexosídeo	595, 433, 301	-	Zengin, et al., 2019
11	30,2	Quercetina-3-O-galactosídeo	463, 301	-	Parejo, et al., 2004
12	30,3	Crisoeriol pentosil-hexosídeo	593, 461, 299, 285	-	n.e.
			595, 463, 301, 287	+	
13	30,7	Apigenina-7-O-aposil-glucosídeo (Apiina)	563, 269	-	Lin, et al., 2007
14	31,4	Crisoeriol-7-O-glucosídeo	461, 299, 285	-	Lin, et al., 2007
15	31,4	Apigenina-7-O-glucosídeo	433, 271	-	Chaves et al. (2011).
16	31,4	Luteolina-7-O-malonil-aposilglucosídeo	665, 621, 489, 285	-	Lin, et al., 2007
			667, 535, 449, 287	+	
17	31,6	Apigenina-8-C-hexosídeo-7(5)-O-pentosídeo	563, 431, 311, 269	-	Barros, et al., 2012
18	32,0	Isorramnetina-3-O-glucosídeo	479, 317	-	Wang, et al., 2019
19	32,3	Quercetina-O-malonilhexosídeo	549, 505, 301	-	

			551, 303	+	Zengin, et al., 2019
20	32,3	Isorramnetin-malonilapiosilglucosideo	695, 651, 315	-	n.e.
21	32,8	Crisoeriol-7-O-malonilapiosilglucoside B	679, 635, 593, 575, 299 681, 519, 463, 301, 286	- +	Lin, et al., 2007
22	33,7	Crisoeriol-7-O-6"-malonilapiosilglucosideo	679, 593, 299	-	Lin, et al., 2007
23	33,1	6-malonilapiina	651, 519, 433, 271	+	Li, et al., 2019
24	36,4	Crisoeriol-[malonilglucosideo]-[malonilapiosideo]	767, 681, 549, 463, 301	+	n.e.
25	36,7	Apigenina-[malonilglucosideo]-[malonilapiosideo]	737, 651, 519, 271	+	n.e.
26	37,0	Apigenina-6"-acetilapiina	607, 475, 271	+	Yoshikawa et al., 2000
27	37,8	Apigenina-[glucosideo-dimalonil]-apiosideo	737, 605, 519, 271	+	n.e.

Tabela 2: Metabólitos secundários identificados em folhas de *Petroselinum crispum* var *crispum* por CLAE-DAD-EM

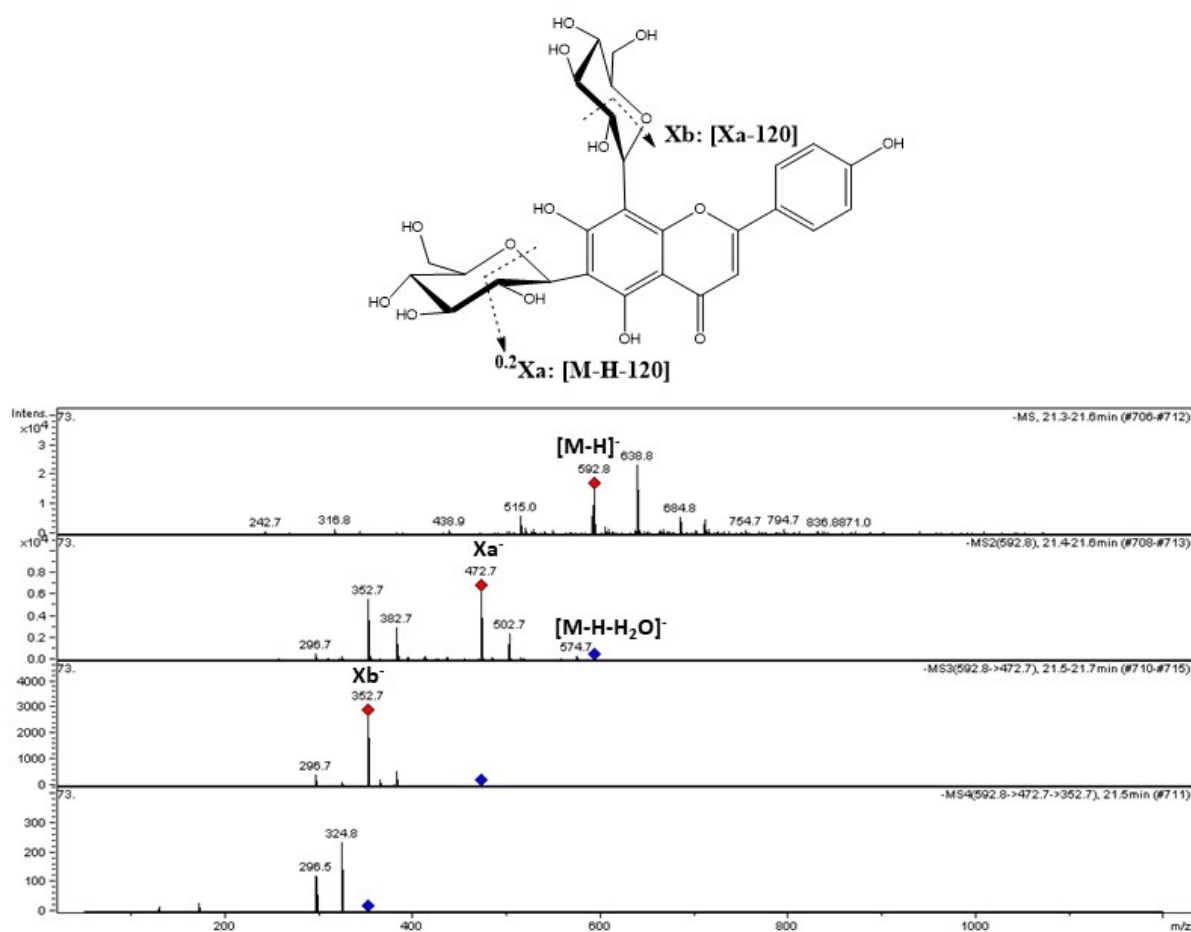
No presente trabalho, a identificação dos flavonoides foi enfatizada mediante avaliação das transições principais do íon precursor e os produtos de fragmentação. Pela análise química das massas dos principais fragmentos gerados é possível observar que no caso do composto **1** (t_R 19,0 min), apresentou como molécula desprotonada 624,8 [M-H]⁻ e fragmentos em 462,7 e 300,6; indicando a perda de duas unidades de glicose em cada um dos fragmentos [M-H-162-162]⁻, sendo essa fragmentação similar a obtida por Abu Reidah et al. (2018), identificando como quercetina dihexosídeo (quercetina 3,7-diglucosídeo).

O composto **2** (t_R 20,4 min) proporcionou íons [M-H]⁻ com m/z 638,8, e a presença de fragmentos em m/z 476,7 e 314,7. Ambos os íons foram obtidos com uma diferença de 162u, correspondendo a perda de dois resíduos de hexose [M-H-162-162]⁻, que comparando as informações com o banco de dados, este pode ser caracterizado como isorramnetina dihexosídeo, conforme relatado por Barros et al. (2012), em um trabalho onde foram avaliados perfis fenólicos de *Coriandrum sativum* L. Kaiser et al. (2013), relata a presença deste composto durante a caracterização de compostos fenólicos em alimentos produzidos com massas frescas produzidas com a incorporação de *P. crispum* na receita.

O composto **3** foi inferido como a flavona luteolina diglucosídeo, conforme relatado por El-Zaeddi et al. (2017), em um trabalho que avaliou os efeitos de um tratamento pré-colheita com ácido málico (MA), ácido oxálico (OA) ou ácido acetilsalicílico (ASA) em três concentrações diferentes, e o impacto na bioatividade e capacidade antioxidante em amostras de coentro, endro e da salsa. Esse composto foi identificado no extrato da salsa, com valores para MS de [M-H]⁻ em m/z 609, além dos fragmentos com m/z de 447 e 285, correspondendo a perda de dois resíduos de hexose. O autor cita que essa flavona é típica em sucos de frutas cítricas, sendo relatada a primeira vez por eles em ervas aromáticas.

O espectro do composto **4** mostrou, como íon molecular, o pico em m/z 592,8, e fragmentos m/z 472,7 e 352,7. Em comparação com os dados obtidos, o composto foi designado como apigenina-6,8-di-C-glucosídeo, também conhecido como vicenin-2, conforme dados da literatura da EM (NEGRI et al., 2012; BENAYAD et al., 2014). É relatado a mesma molécula desprotonada em m/z 593 [M-H]⁻ e um sinal é observado em m/z 473 ([M-H]-120)⁻, sendo relatado como pico base, que corresponde ao fragmento

$^{0,2}\text{X}_0$, indicando a perda de um resíduo glicosil. Conforme **Cromatograma 1**, referente ao espectro do composto 4, é possível verificar com baixa intensidade, a presença de fragmentos em m/z 575 ($[\text{M}-\text{H}]-18$)⁻ e m/z 503,0 ($[\text{M}-\text{H}]-72$)⁻, exibindo uma fragmentação padrão de flavonas di-*C*-glicosídeo. A presença dos íons em m/z 352,7 ($[\text{M}-\text{H}]-120+120$)⁻ e 382,7 ($[\text{M}-\text{H}]-[90+120]$)⁻ indicam a presença de apigenina (MM 270), podendo ser relatados como picos característicos de fragmentações de di-*C*-glicosilflavona, sendo visualizados como (Ag+83) e (Ag+113), além das duas porções hexose (glicoses).

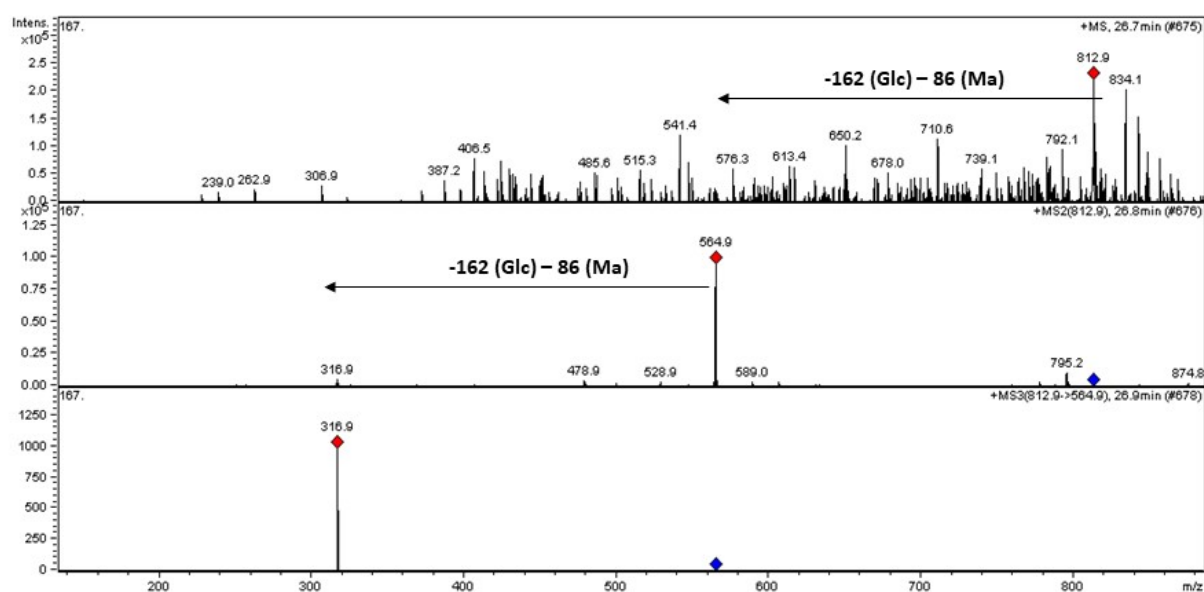


Cromatograma 1: Espectro de massas da apigenina-6,8-di-*C*-glicosídeo e esquema de fragmentação

No tempo de retenção, 24,6 min; o íon precursor foi detectado em m/z 724,8. Para a obtenção dos dados, a amostra foi submetida em ambos os modos de ionização, minimizando dúvidas durante a análise, permitindo-nos entender no modo positivo que,

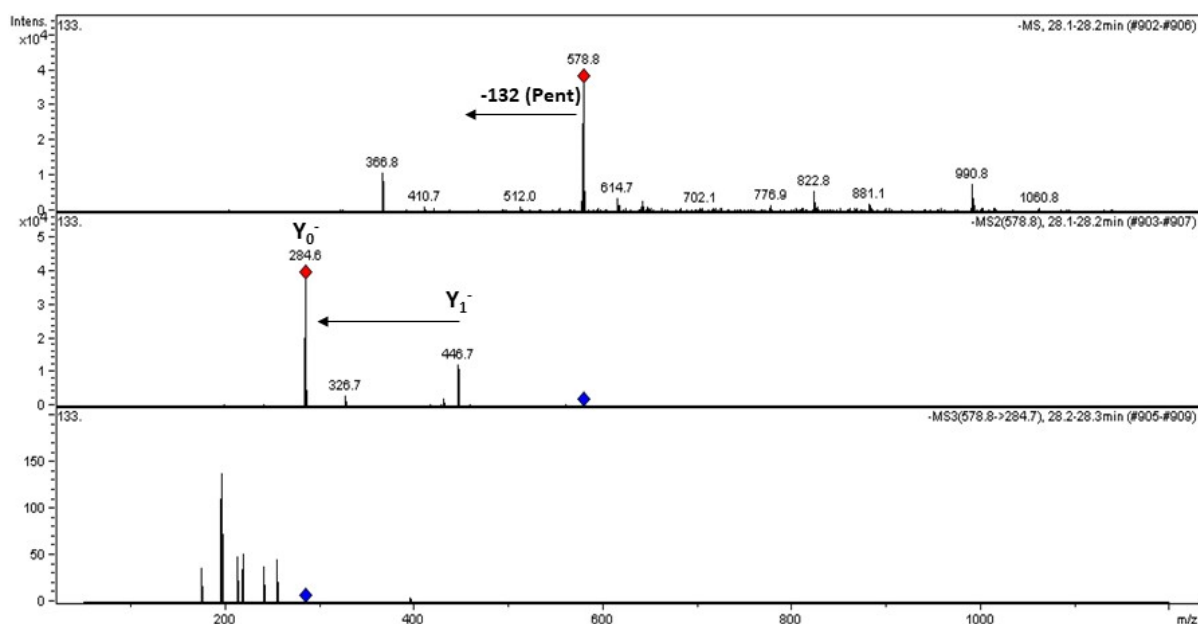
a partir do íon molecular em m/z 726.8, ocorre a degradação do resíduo de malonil em duas etapas seguido da perda de uma molécula de hexose, correspondente aos íons com m/z 682.8 e m/z 478.7 correspondente a $([M-H]-44)^-$ $([M-H]-162-42)^-$. Por outro lado, no modo de ionização negativa, constatamos os fragmentos formados a partir de m/z 680,8 e 476,7; correspondem a perda de duas unidades de 162u. Um fragmento correspondente à isorramnetina em m/z 314,7 foi identificado, sendo o composto experimentalmente caracterizado como isorramnetina 3-*O*-(6-*O*-malonildiglicosídeo), ainda não tendo sido relatado em literatura.

De modo semelhante ao relatado no composto anterior, o pico em 26,7 min (composto 6), foi realizado em ambos modos de ionização, exibindo picos em m/z 812,9 e 810,9, em ESI(+) e ESI(-), respectivamente, mas o modo positivo gerou fragmentos que facilitaram a resolução de modo mais adequado. As análises revelaram m/z 564,9 e 316,9; relacionado a perda de duplicada de 248u (162 + 86u), indicando um grupamento malonilglicose resultados de fragmentação que corresponde a flavonóis diglicosilados, gerando a formação de íons correspondentes a quebra Y_0^+ e Y_1^+ , e demonstrando os monossacarídeos que os compõem (CUYCKENS et al., 2004). O íon aglicona correspondente e os fragmentos apresentados previamente, permitem a caracterização como isorramnetina-dimalonil-diglicosídeo, ainda não tendo descrito na literatura (**Cromatograma 2**).



Cromatograma 2: Espectro de massas para caracterização experimental da isorramnetina-dimalonil-diglicosídeo

No espectro obtido em modo negativo, o composto **7** (tr 28.1 min) apresenta molécula desprotonada em m/z 578,8 e pico base em m/z 284,6; coincidente com o kaempferol-*O*-pentosil-hexosídeo, citado pela primeira vez por Zengin et al. (2019), caracterizado na composição química de *Falcaria vulgaris*, sendo uma das cinco espécies estudadas no referido trabalho, pertencente à família da *Apiaceae*. Conforme relatado nesse artigo, dois principais fragmentos são formados com m/z 447 e 285, obtidos pela perda de pentose [M-H]-132] e subsequente perda de uma hexose [M-H]- 162], assim como visualizado na **Cromatograma 3**, espectro obtido para o extrato aquoso do *P. crispum* var *crispum*.



Cromatograma 3: Espectro de massas e etapas de fragmentação do kaempferol-*O*-pentosil-hexosídeo

De modo semelhante, o pico obtido em 28,9 min; apresentou fragmentação semelhante ao composto **7**, com molécula desprotonada em m/z 608,8 e pico base em 314,6; sendo este último, útil para identificar a aglicona isoramnetina. Zengin et al. (2019), realizou a caracterização química no extrato metanólico da *Falcaria vulgaris*, citando pela primeira vez a isoramnetina-*O*-pentosil-hexosídeo, que correlacionamos experimentalmente como o composto **8**, sendo caracterizado neste artigo, com a presença

do íon molecular em m/z 609 além de dois fragmentos importantes com m/z 477 e 315, obtidos pela perda de uma pentose (132u), seguido de uma hexose (162u).

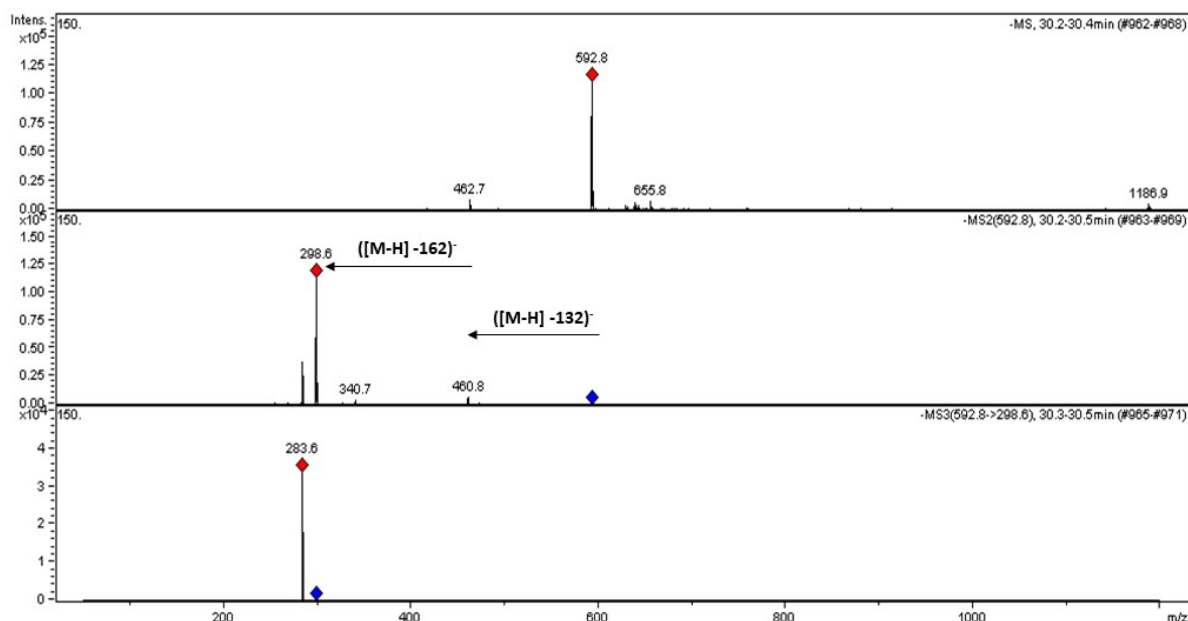
Na elucidação do composto **9** (t_R 29,5 min) foi utilizado o modo negativo, sendo observado o pico base em m/z 284,6; correspondente à perda da porção apiosilglucosídeo (294 u), a partir da molécula desprotonada em m/z 578,8. A presença de um pico em m/z em 416,6 auxilia no entendimento da fragmentação do composto, ocorrendo primeiramente a perda de uma porção açúcar (glicose) seguido da perda do apiosil em m/z 429,0 ($[M-H]-[162+132]^-$), permitindo identificar como luteolina-7-*O*-apiosilglucosídeo, como descrito por Lin et al.(2007), que realizou um trabalho de detecção e quantificação de flavonoides glicosilados em extrato metanólico do aipo, aipo chinês e semente de aipo por método de CLAE-DAD-ESI. Lin descreveu como $[M-H]^-$ com m/z 579 e descrição da aglicona em m/z 285.

O composto **10**, pico com t_R 29,9 min, exibiu uma molécula desprotonada com m/z 594,8; e um pico base $[M-H]-294^-$ - m/z 300,6; que mostra a quercetina como aglicona e corresponde à perda de 132u (pentose) e 162u (hexose) no fragmento apresentado. Esses dados também foram comparados com dados da literatura (ZENGIN et al., 2019) e o composto foi caracterizado como quercetina-*O*-pentosil-hexosídeo, com fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{16}$, apresentando-se como dois possíveis isômeros, sendo descrito pelo autor fragmentos que permitem a comparação experimental ($[M-H]^-$ m/z = 595 e pico base com m/z = 301), sendo necessário alguns experimentos complementares para a escolha correta do isômero.

O composto **11** foi experimentalmente caracterizado como quercetina-3-*O*-galactosídeo, também conhecido como hiperosídeo, que produziu a molécula desprotonada em m/z 462,7 e fragmento em m/z 300,6 ($[M-H]-162^-$), que correspondem a perda do grupo galactose, como foi identificado por Parejo et al. (2004), durante a caracterização de flavonoides-*O*-glicosilados acilados e flavonoides metoxilados no extrato metanólico de *Tagetes maxima* por CLAE-DAD-ESI.

O composto **12** foi caracterizado como o crisoeriol pentosil-hexosídeo, sendo as unidades glicosídicas identificadas como uma apiose e uma glicose com base nos dados espectrais (**Cromatograma 4**). Apresentou-se como molécula desprotonada em m/z

592,8 e pico base m/z 298,5; resultado da perda sucessiva de uma unidade de pentose, seguida por uma unidade de hexose.



Cromatograma 4: Espectro de massas e etapas de fragmentação para caracterização do composto **12**.

O pico obtido em 30,7 min, apresentou como molécula desprotonada $[M-H]^-$ em 562,8 que após a liberação de um apiosil seguido por uma glicose ($[M-H]-132-162$), permite a observação de um fragmento m/z 268,6; identificado como a aglicona apigenina. O composto **13** foi identificado comparando as informações de referências anteriores (LIN et al., 2007; KAISER et al., 2013), como a apigenina-7-*O*-apiosil-glicosídeo (apiina), sendo este um dos dois principais compostos fenólicos extraído de folhas do *Petroselinum crispum* (BURSAC et al., 2005; FARZAEI et al., 2013).

Na elucidação do composto **14** (t_R 31.4 min), utilizou-se do ESI(-), para caracterização como crisoeriol-7-*O*-glicosídeo, com fórmula molecular $C_{22}H_{22}O_{11}$, apresentando $[M-H]^-$ (crisoeriol + 1 mol de glicose) com m/z 460,8 e ($[M-H]-162$)⁻ (crisoeriol) em m/z em 298,8. Lin et al. (2007), identificou essa substância nos cromatogramas dos extratos de amostras de aipo em um estudo para detecção de flavonoides glicosilados. Semelhantemente, Iwashina et al. (2010), avaliando sete espécies de *Saussurea* das Montanhas da Rússia e Mongólia, relatou que durante a análise por CLAE-EM dos extratos metanólicos dessas espécies, o crisoeriol-7-*O*-glicosídeo foi

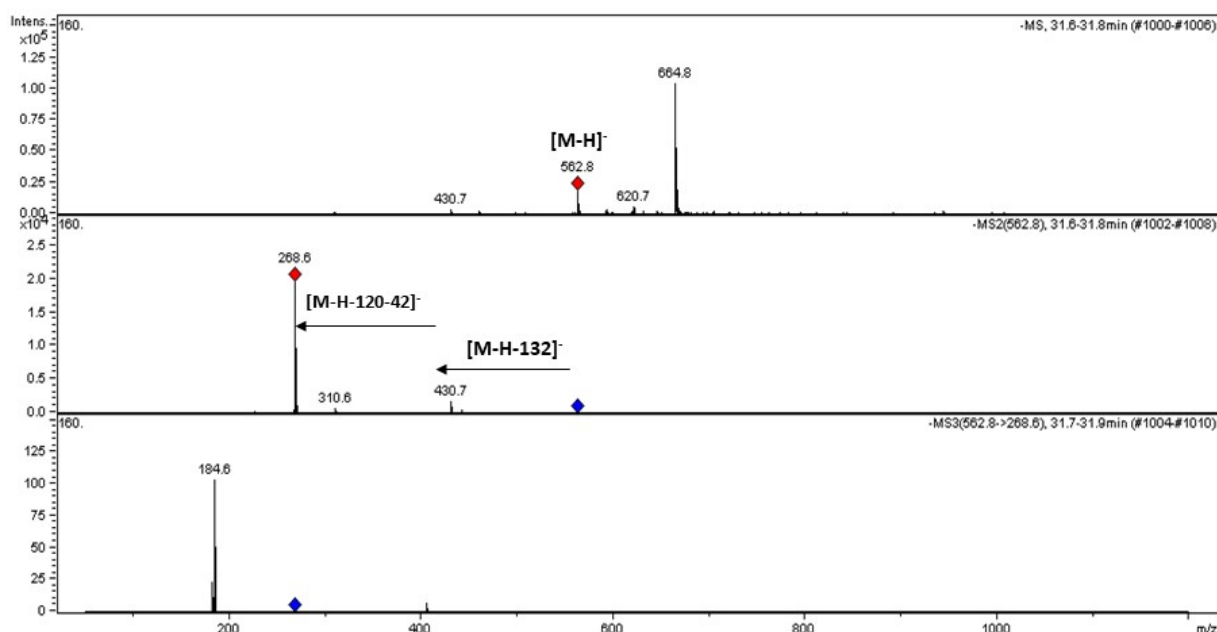
identificado na *S. gossypiphora* e *S. stella*, por UV e CLAE-EM com $[M-H]^-$ em m/z 461 e $[M-H]-162]^-$ em m/z 299.

O composto **15** ($t_R = 31,40$ min) exibiu o íon $[M-H]^-$ em m/z 431, produzindo fragmentos característicos em m/z 269 $[M-H]-162]^-$ e por comparação com dados de EM na literatura (PEREIRA et al., 2012; WANG et al., 2016; LI et al., 2019), o composto foi identificado como apigenina-7-*O*-glucosídeo, também chamada de cosmoseina, já tendo sido relatada a sua presença em amostra de folhas de *Petroselinum crispum* por Chaves et al. (2011).

A substância **16** produziu íons $[M+H]^+$ em m/z 666,8 e íons $[M-H]^-$ em m/z 664,7; gerando fragmentos em m/z 620,8 ($[M-H]-44]^-$ e 578,7 ($[M-H]-44-42]^-$ por perda gradativa de um malonil. Fragmentos foram gerados em m/z ($[M+H]-162]^+$ e ($[M+H]-[162+132]^+$ em ESI (+) e m/z ($[M-H]-162]^-$ e ($[M-H]-[162]+132]^-$ em ESI (-) por perdas de glicose e apiose, respectivamente. A presença do fragmento com m/z 284,6 em ESI(-) é característica da aglicona luteolina e avaliando o tempo de retenção e padrões de fragmentação, a substância foi caracterizada como luteolina-7-*O*-malonilapiosilglucosídeo, conforme citado por Lin et al. (2007), com m/z 449/447 e 287/285, para ESI (+/-), estudo realizado com amostras de aipo, já citado anteriormente.

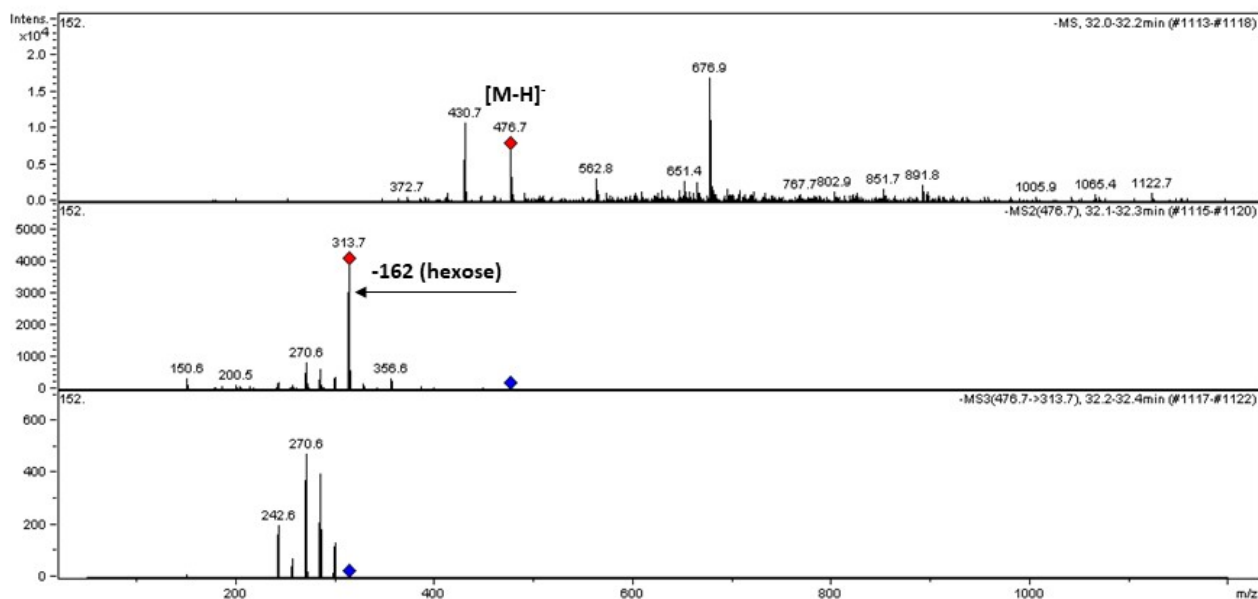
No pico **17**, com tempo de retenção de 31,6 min, observamos em modo negativo a presença do íon de m/z 268,6; que pôde ser atribuído a apigenina. Através da molécula desprotonada e demais fragmentos apresentados no espectro foram relacionados na literatura como apigenina-8-*C*-hexosídeo-7(5)-*O*-pentosídeo, como descrito por Barros et al. (2012), que realizou uma análise detalhada de compostos fenólicos em *Coriandrum sativum* L., a fim de analisar seu perfil químico e explorar as potencialidades da cultura *in vitro*. A fragmentação padrão desses picos sugeriu que os compostos possuíam dois resíduos glicosilados, sendo um hexosídeo e um pentosídeo, que eram *C*- e *O*-anexado respectivamente em diferentes posições da aglicona. O fragmento ($[M-H]-120]^-$ é mais abundante em derivados de 6-*C*-glicosil do que em derivados de 8-*C*-glicosil, além do que, em flavonas 6-*C*-glicosil haverá a presença de outro fragmento, referente a ($[M-H]-90]^-$; portanto a ausência deste íon e a baixa abundância do fragmento ($[M-H]-120]^-$ sugere a localização do hexosídeo na posição 8-*C*. Em relação ao resíduo *O*-pentosídeo, pode ocorrer a substituição em diferentes localizações da aglicona, como no caso, os grupamento hidroxila nas posições 5 e 7. Ferreres et al. (2011), descreve que a posição

mais provável de substituição seria o grupo hidroxila na posição 7, mas a escolha da posição também pode ter relação com o tipo de planta usada., e como no *Petroselinum crispum* ainda não é descrito nenhum glicosídeo de apigenina-8-*C*-hexosídeo-*O*-pentosídeo, não foi possível determinar a posição correta (**Cromatograma 5**).



Cromatograma 5: Espectro de massas e etapas de fragmentação do composto 16

O composto **18** ($t_R = 32,0$ min), de modo semelhante exibiu o íon $[M-H]^-$ em m/z 477, respectivamente, produzindo fragmento de e 315 $[M-H-162]^-$, indicando a perda de um resíduo de hexose. Wang et al., (2019) relatou em um estudo de identificação e quantificação de compostos fenólicos presente em amostra de *Citrus australasica*, a presença da isoramnetina-3-*O*-glucosídeo, com $[M-H]^-$ em m/z 477.1042 e fragmentos EM^2 em m/z 315,0525; 314,0445; 271,0260; 243,0306 conforme constatado no espectro do composto (**Cromatograma 6**), sendo possível realizar a sua correlação com o dado da literatura.



Cromatograma 6: Espectro de massas e etapas de fragmentação do composto 18

Para o composto **19** com $[M-H]^-$ em m/z 548,7; a perda de 248u foi detectada na análise de EM que é indicativo da unidade de malonil+hexose, sendo a aglicona identificada como quercetina (m/z 300,6). Comparando seus padrões de fragmentação na análise EM² (ANTTONEN et al., 2006; BESSADA et al., 2016) e EM³ com dados da literatura (SÓJKA, et al., 2009; SANTOS et al., 2017; ZENGIN et al., 2019), foi descrito que a molécula desprotonada $[M-H]^-$ resulta m/z 549, liberando fragmentos de MS² em m/z 301 ($[M-H]-[162-86]^-$), representado pela perda de uma porção malonilhexosídeo, sendo atribuída a identificação a substância quercetina-*O*-malonilhexosídeo. Fragmentos formados em EM³, em m/z 504,7; foi relatado como pico de maior intensidade, que foi relacionado após a dissociação induzida por colisão de um composto fenólico, produzindo um fragmento estável caracterizado pela perda de um CO₂ $[M-H-44]^-$, indicando a presença de um grupo carboxílico livre na molécula (BAKR et al., 2017). A clivagem subsequente de 42u do fragmento em m/z 432,5 $[M-H-42]^-$, foi devido à perda da porção acila, que em conjunto com o fragmento citado anteriormente, descreve a presença de um grupamento malonil (OCCH₂COOH), que está presente em flavonóides amplamente nas plantas. Anjos et al. (2019), descreveu os fragmentos de EM descritos para MS² [549]: 505, 463, 301, relatando também a perda do malonil em duas etapas, seguido da perda de uma molécula de hexose ($[M-H]-[42-44-162]^-$), enquanto avaliava o pólen de abelha como fonte antioxidante natural para prevenir a

oxidação de lipídios em um tipo de “chouriço”, muito consumido em uma região da Europa, sendo então caracterizado como quercetina-*O*-malonil-hexosídeo e por semelhança, permitiu a correlação com o composto 17.

Com tempo de retenção em 32,3 min, o composto **20** demonstrou a molécula desprotonada em m/z 694,8 e fragmentos em m/z 650,8 e 608,7 que, de modo semelhante ao composto anterior, produz um padrão de fragmentação estável caracterizado pela perda de um CO₂, [M-H-44]⁻, com uma clivagem subsequente de 42u devido à perda da porção acila, sugerindo a presença de um grupamento malonil no glicosídeo analisado. Ainda há a presença do fragmento em m/z 314,5; que permite a associação com a aglicona isorramnetina, após a perda de 294u, indicando a presença de um pentosil-hexosídeo na estrutura da molécula. Durante a busca bibliográfica não foi encontrado referência para os dados citados, permitindo-nos identificar este composto experimentalmente como isorramnetina-malonilapiosilglucosídeo.

A substância **21** (tr 32,8min), produziu o íon [M+H]⁺ em m/z 681 e o íon [M-H]⁻ em m/z 679. Obtivemos no modo negativo, fragmentos em m/z 635 [M-H-44]⁻, 593 [M-H-42]⁻, 575 [M-H-18]⁻, 299 [M-H--276]⁻, indicando a perda de um resíduo de malonil, conforme descrito nos compostos anteriores, seguido sucessivamente de uma perda de 294u (162 + 132u), referente a porção de apiosilglucosídeo. Em semelhança a dados obtidos durante a busca na literatura, foi possível identificá-lo com crisoeriol-7-*O*-malonilapiosilglucosídeo B, presente em vegetal pertencente à família da *Apiaceae*, relatado por Lin et al. (2007).

O composto **22** pôde ser identificado como crisoeriol-7-*O*-6"-malonilapiosilglucosídeo, de acordo com os fragmentos obtidos estarem em conformidade com o citado no trabalho de Lin et al. (2007), para a identificação de flavonoides em extrato metanólico em diversas amostras de *A. graveolens* var. *dulce*, que descreve [M-H]⁻ em m/z 679 e a aglicona em m/z 299. Fragmentos em m/z 635 e 593, descrevem a perda consecutiva de [M-H-44]⁻ e [M-H-42]⁻, indicando a perda de um resíduo de malonil, com menor estabilidade como descrito anteriormente, seguido de um fragmento em m/z 299 que é resultado da perda de um apiosilglucosídeo por parte da molécula ([M-H]-[44-42-132-162])⁻.

No espectro de EM em modo positivo, o composto **23** (tr 33.1min) apresentou molécula protonada em m/z 650,9 [M+H]⁺, produzindo íons característicos em m/z

432,9 ($[M-H]-[86+132]^+$), resultado da perda de um malonil e um apiosil, e em m/z 270,8, com a perda de um glucosídeo ($[M+H]-[86+132+162]^+$), sendo o último fragmento formado característico da aglicona apigenina. Comparando com as informações do banco de dados, pode-se caracterizar como malonilapiina (apigenina *O*-malonilapiosilglucosídeo), sendo esta e a apigenina *O*-apiosilglucosídeo (apiina), as substâncias predominantes em amostras de salsa fresca. No entanto há relatos que durante o processamento dessas amostras, ocorre a conversão de malonilapiina em apiina, sendo relatado que a desmalonilação pode estar relacionada com o aumento de temperatura durante o processo de extração e/ou processo de liofilização, realizado para a obtenção do extrato seco, sendo esse processo observado com outros flavonoides glicosilados (DUPONT et al., 2000; LECHTENBERG et al., 2007).

No modo positivo de ionização, os compostos **24** e **25** não puderam ser correlacionados com nenhuma informação de estudos anteriores, tendo sido relatados pela primeira vez em nosso trabalho. O composto **24** (t_R 36,4min) e **25** (t_R 36,7min), geraram diferentes íons $[M+H]^+$ em m/z 767 e m/z 737, respectivamente e ambos de modo similar produziram íons de fragmento em m/z $[M+H-86]^+$, $([M-H]-[86+132])^+$, $([M-H]-[86+132+86])^+$ e $([M-H]-[86+132+86+162])^+$, gerados pelas sucessivas perdas de um resíduo de malonil, apiose, malonil e glucose, respectivamente. Após a perda de 466u, o composto **24**, apresentou um pico em m/z 301, permitindo a identificação da aglicona, sendo este composto provisoriamente identificado como crisoeriol-[malonilglucosídeo]-[malonilapiosídeo], enquanto o composto **25**, apresentou pico em m/z 271, caracterizando a aglicona como a apigenina e o composto nomeado como apigenina-[malonilglucosídeo]-[malonilapiosídeo].

A análise de EM em modo positivo revelou que o composto **26**, apresentou $[M+H]^+$ em m/z 607, e fragmentos em m/z 475 $[M+H-132]^+$, gerado a partir da perda de uma pentose ($C_5H_8O_4$) e um fragmento em m/z 271 ($[M+H]-[42+162]^+$), descrevendo a perda sucessiva de um acetil e uma hexose. Esses fragmentos são derivados da quebra da ligação glicosídica nas posições 2'' e 7, sendo possível identifica-lo como 6''-acetilapiina, tendo sido relatada a sua presença uma única vez por Yoshikawa (2000), nas partes aéreas de *Petroselinum crispum*, como um possível fitoestrógeno.

Com tempo de retenção de 37,8min; o composto **27**, identificado experimentalmente como apigenina-[glucosídeo-dimalonil]-apiosídeo, ainda não

referenciado no banco de dados apresentou em ESI(+), $[M+H]^+$ em m/z 737, além de fragmentos em m/z 605, 519 e 271, após a perda de um resíduo de 132u, duas unidades de 86u e uma porção de 162u.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que estão presentes em plantas e existem diversas correlações positivas entre atividades antioxidantes presentes em plantas medicinais com seu conteúdo fenólico total. A concentração de compostos fenólicos observada em extratos obtidos por decocção é geralmente superior que em infusão, visto que durante o processo de decocção, a amostra é mantida a temperatura constante durante todo período de extração, promovendo uma maior eficiência na extração dos compostos fenólicos. Infusões e decocções são métodos simples de extrair os constituintes ativos das ervas em água quente, onde a infusão é a preparação líquida produzida pela imersão da planta em água em ebulição, por um breve período, enquanto na decocção são realizados colocando ervas frescas ou secas em água fria que então é submetida a aquecimento suavemente por 15 minutos ou mais (PANDEY & TRIPATHI, 2014).

A influência da temperatura na extração de flavonoides, estudos têm sido demonstrado, onde o aumento da temperatura tem efeito direto no aumento da taxa de extração. O conteúdo de flavonoides tende a aumentar gradualmente com o aumento da temperatura variando de 55°C a 85°C, com aumento gradual com um intervalo de temperatura de 10°C. A hipótese é que quanto mais alta a temperatura, maior é a velocidade de movimento da molécula para que os flavonoides se difundam da célula para o agente extrator mais rapidamente. No entanto, os flavonoides podem ser oxidados a temperaturas superiores a 80°, tendo sido observado a degradação dos compostos e a redução gradual dos flavonoides extraídos (XU et al., 2005; AZWANIDA, 2015).

Por um lado, a temperatura mais elevada pode acelerar o fluxo de solvente e, assim, aumentar o teor de flavonóides e, por outro lado, a temperatura mais elevada pode diminuir a eficiência de extração, tendo sido verificado que 85°C era a temperatura ideal para extrair os flavonoides em plantas frescas (SATHISHKUMAR et al., 2008).

Os ensaios para a determinação da concentração dos compostos fenólicos totais, presentes nos extratos aquosos das folhas (EAF) de salsa crespa, foram realizados pelo método de Folin Ciocateu adaptado (DENG et al., 2013; TLILI et al., 2011), tendo sido calculado o teor a partir da curva de calibração (equação da curva padrão: $y = 0,058x + 0,1124$; $R^2 = 0,9804$) foi de $12,49 \pm 1,70$ mg de GAE / g de extrato seco de salsa (ess), conforme demonstrado no **Gráfico 2**.

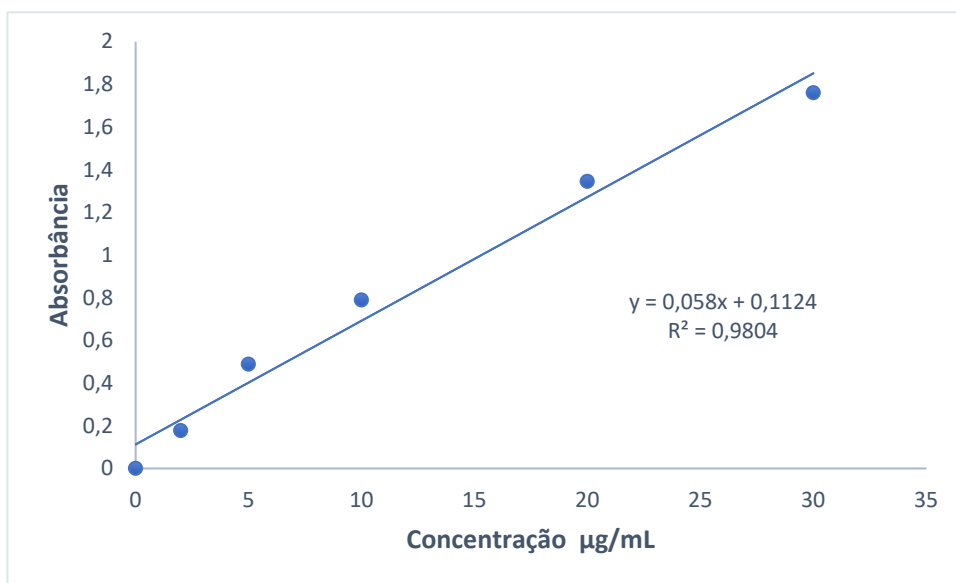


Gráfico 2: Curva de calibração padrão de ácido gálico para determinação do conteúdo fenólico total no EAF de *Petroselinum crispum* var. *crispum*

O método de Folin-Ciocalteu consiste na redução, a pH alcalino, do reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos (sob a forma de íon fenolato) presentes na amostra. Esta reação origina um produto de coloração azul com um máximo de absorção a 765 nm, sendo a sua intensidade proporcional ao teor em compostos fenólicos presentes na amostra (PRIOR et al., 2005).

Os compostos fenólicos naturais encontrados nas ervas desempenham um papel importante como antioxidantes, com propriedades medicinais como antibiótico, anti-inflamatório, antitumoral e antialérgico. Em nosso estudo, o conteúdo fenólico total no extrato obtido foi de 12,49 mg de GAE por g de extrato seco, semelhante a resultados de outras variações de *P. crispum* relatados na literatura que mostraram concentrações

variáveis de 9,20 a 35,60 mg de GAE por g (WONG & KITTS., 2006; TUPE et al., 2013; FARAH et al., 2015).

O intuito do nosso trabalho foi a avaliação do extrato das folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum*, em meio aquoso, solvente não tóxico, conforme a sua utilização na alimentação humana, independente de não alcançarmos os valores máximos na quantificação dos compostos fenólicos. A salsa pode ser caracterizada por sua morfologia e variabilidade química, sendo descrito como os três tipos de salsa mais comuns: *Petroselinum crispum* var. *tuberosum*, *Petroselinum crispum* var. *crispum* e *Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*, sendo importante salientar que essas variedades podem gerar teores diferentes de metabólitos, que impactam diretamente na atividade antioxidante de forma individualizada (KARKLELIENĖ et al., 2014).

O teor de fenólicos totais é diretamente influenciado por genótipo, condições de crescimento (solo e temperatura) e interação entre genótipo e condições de cultivo. Em um estudo realizado por Dobričević et al (2019), foram avaliados 6 cultivares diferentes, 6 cultivares de salsa a partir de sementes de *Petroselinum crispum* var. *tuberosum* cv. 'Arat', 'Eagle', 'Halblange', de *Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* cv. 'Rialto' e de *Petroselinum crispum* var. *crispum* cv. 'Mooskrause' e 'Petra'. Considerando o genótipo, em geral *Petroselinum crispum* var. *tuberosum* ('Halblange', 'Arat', 'Eagle') contém 16% maior TPC em folhas em comparação com o cv. 'Rialto', 'Mooskrause' e 'Petra' (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum* e *Petroselinum crispum* var. *crispum*).

O extrato em nosso estudo mostrou conteúdo fenólico semelhante ao resultado obtido ao estudo relatado acima, quando comparando os dois cultivares citados referente a salsa cressa. Dobričević et al (2019), relata que nas folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum* cv. 'Mooskrause' e 'Petra', foram encontrados, respectivamente 403.68±0.52 e 304.57±0.39 mg GAE/100 g de folhas frescas, enquanto em nossa amostra obtivemos 124,9±0.13 mg GAE/100 g de folhas frescas. Este resultado é justificável, visto que na amostra que utilizamos incluímos as folhas e as hastes e é descrito que somente o uso de folhas apresenta teor de fenólicos totais 2 vezes maior que na haste em comparação com o cv. 'Mooskrause' e 'Petra', que apresentam os valores de 64.79±1.35 e 67.83±0.94 mg GAE/100 g de planta fresca, respectivamente.

Kaiser et al. (2013), descreve que dois cultivares de salsa diferentes apresentaram perfis semelhantes de derivados polifenólicos; no entanto, diferenças marcantes foram observadas com relação a quantificação do seu conteúdo. Em seu estudo, a salsa crespa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) exibiu maior teor total de compostos fenólicos do que o cultivar de folhas italianas., com valores de 46.04 ± 0.22 e 30.51 ± 0.96 g/kg de massa seca (MS), respectivamente. Em ambas as cultivares, apiína foi o composto fenólico predominante variando de 21,8 a 36,0 g/kg de MS sendo equivalente a 70% e 78% do conteúdo fenólico total, respectivamente.

Saleh et al. (2019), realizou um estudo avaliando as características do endro e da salsa (*Petroselinum crispum* var. *neapolitanum*), variando o tipo de substrato fornecido para crescimento das plantas (solo da Alemanha, e variações com a incorporação de turfa e/ou solo arenoso). O solo da Alemanha contém maior teor de nitrogênio (N) que o solo arenoso e o N desempenha um papel positivo na síntese dos constituintes da planta através de a ação de diferentes atividades enzimáticas e síntese proteica, que propicia o aumento de alguns constituintes químicos, como derivados fenólicos em algumas espécies de Apiaceae como anis, coentro e erva-doce, apresentando resultados que demonstram o impacto de substrato na regulação da água e minerais necessários (N, P e K) para o crescimento das plantas e impactando diretamente no teor de compostos fenólicos (22,14 a 28,35 mg de GAE/g) da salsa italiana.

Em um extrato hidroalcolólico obtido com folhas de *P. crispum*, relatado por Hinneburg et al. (2006), obteve-se um teor de conteúdo fenólico total de $29,2 \pm 0,44$ mg de GAE g⁻¹, na amostra, não sendo relatado no estudo a variedade da espécie utilizada, apresentando valor aproximado ao encontrado em nosso trabalho com a variedade crespa. Uma possível explicação para os diferentes valores fenólicos entre esse estudo e o nosso é que o conteúdo fenólico nas plantas difere muito entre cultivares da mesma espécie e são influenciados por fatores genéticos e condições ambientais. Além disso, parâmetros como polaridade do solvente, procedimentos de extração e condições podem influenciar a extração de compostos fenólicos de *P. crispum*.

A diversidade estrutural de compostos fenólicos apresenta um desafio significativo para o desenvolvimento de uma metodologia uniforme e adequada para extração de todos os fenólicos ou uma classe específica de compostos fenólicos, além do que os fenólicos não são distribuídos uniformemente nas plantas do tecido, celular e

níveis intracelulares, afetando o processo de extração dessas substâncias. A presença desses compostos de forma livre, conjugado e na forma polimérica ou como complexos com carboidratos, proteínas ou outros componentes vegetais, é mais um fator que pode afetar diretamente a solubilidade dos fenólicos em solventes diferentes. Um estudo dirigido por Luthria, et al. (2006), avaliou diversos métodos de extração e com foco principal em misturas de diferentes solventes (acetona, metanol, etanol e água em diferentes proporções). Como resultado, obteve-se maior quantidade de derivados fenólicos em misturas de média polaridade (EtOH 70% e Acetona 50%), apresentando maior afinidade com os constituintes presentes nas folhas da salsa cressa.

Os fenólicos são metabólitos secundários que estão presentes de forma onipresente nas plantas, sendo relatadas correlações positivas entre as atividades antioxidantes presentes nas plantas medicinais com seu conteúdo fenólico total. No estudo de Tang et al (2015), os valores fenólicos dos extratos de *P. crispum* variaram de $9,63 \pm 2,60$ a $42,31 \pm 0,50$ mg GAE g⁻¹, sendo o extrato aquoso com menor teor enquanto o extrato em diclorometano apresentou o maior teor fenólico (P <0,05) entre os demais extratos utilizados (hexano < metanol < acetato de etila). A natureza do solvente de extração é um dos fatores mais importantes na extração de antioxidantes, explicando assim os diversos valores fenólicos de diferentes extratos de folhas e caules de *P. crispum*.

Trifunshi et al. (2012), realizou um estudo para avaliação da quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais presentes em extratos de *Petroselinum crispum*, obtidos utilizando diferentes solventes: clorofórmio, etanol e metanol. O extrato etanólico das folhas apresentou maior conteúdo fenólico (54,20 mg GAE/g) que os extratos de clorofórmio (15,20 mg GAE/g) e metanol (35,60 mg GAE/g). O processo de solubilização de uma substância química resulta da interação entre a espécie que se deseja solubilizar (soluto) e a substância que a dissolve (solvente), e está diretamente relacionada com a estrutura molecular, especialmente com a polaridade das ligações e da espécie química como um todo (momento de dipolo). Dentre os solventes utilizados no experimento, o clorofórmio tem características apolares, enquanto o metanol e o etanol são polares, mas é importante salientar que a polaridade de álcoois diminui com o aumento da cadeia carbônica, portanto podemos considerar como ordem crescente de solubilidade: clorofórmio < etanol < metanol. Através dos resultados obtidos, é possível constatar uma maior afinidade dos compostos fenólicos presentes no *Petroselinum crispum* em solventes de média polaridade.

Há um interesse crescente no uso de ervas condimentares na culinária como agentes conservantes naturais devido à sua abundância de fitoquímicos bioativos, no entanto existem poucos relatos na literatura utilizando o *P. crispum* var. *crispum*. O processo de extração das folhas de *P. crispum* var. *crispum* em meio aquoso, como citado no trabalho, apresentou uma concentração de compostos fenólicos moderada, frente aos diversos solventes de extração possíveis, contudo é o solvente que demonstra melhor segurança para a avaliação e utilização da salsa crespa como nutracêutico. Os resultados da quantificação de fenólicos totais demonstraram resultados semelhantes ao citado na literatura para a var. *crispum*, que demonstra teores fenólicos moderados quando comparados com a var. *tuberosum*, mas os resultados obtidos são importantes para o estudo desta variedade como um possível agente antioxidante, não tendo sido relatado anteriormente um estudo que envolvesse modelos *invitro* e *invivo*. Cabe salientar da importância da utilização apenas das folhas e não dos ramos para a obtenção da massa a ser extraída, devido a presença de maior concentração nas partes aéreas mais verdes da planta, obtendo um extrato com maior teor dos componentes bioativos.

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, podem atuar como doadores de hidrogênio aos radicais livres impedindo o dano por estresse oxidativo as células na primeira etapa de iniciação da reação radicalar. Portanto, os flavonoides são um dos principais responsáveis pela propriedade antioxidante de grande parte dos produtos de origem vegetal. A caracterização dos flavonoides pode ser realizada em extratos vegetais por diversas metodologias, permitindo a avaliação simultânea de vários constituintes, podendo ser feita por ensaios cromáticos, cromatográficos, espectroscópicos ou fotométricos.

Os ensaios para a determinação do conteúdo total de flavonoides na amostra, foram realizados pelo método de Quettier-Deleu et al. 2000, tendo sido calculado o teor a partir da curva de calibração (equação da curva padrão: $y = 0,0019x + 0,0128$; $R^2 = 0,9341$) obtendo $15,05 \pm 2,20$ mg de equivalentes de quercetina/g de extrato seco de salsa (ess), conforme demonstrado no **Gráfico 3**. Comparando os meus resultados com os relatados na literatura indicam a existência de uma variação significativa no conteúdo total de flavonóides entre os extratos, com valores variando entre 0,947 e 25,12 mg de equivalentes por g de extrato seco.

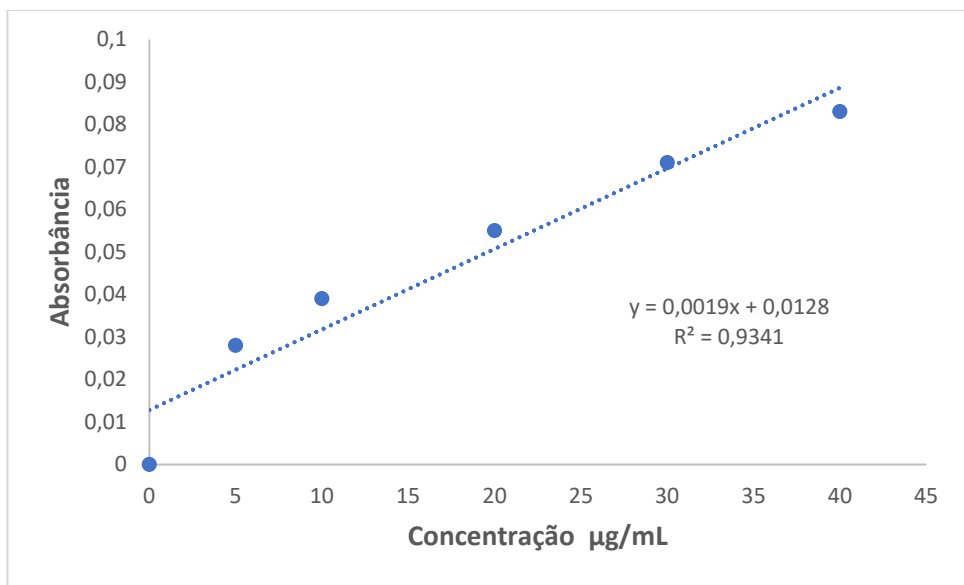


Gráfico 3: Curva de calibração padrão de quercetina para determinação do conteúdo total de flavonoides no EAF de *Petroselinum crispum* var. *crispum*

Os flavonoides são uma ampla classe com estruturas diversificadas, exibindo um amplo espectro de substâncias químicas com diversas propriedades biológicas, incluindo atividade antioxidante. O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando o método de cloreto de alumínio, que em contato com o flavonoide forma um complexo estável com o grupamento carbonila em C4 e hidroxila em C3 (flavonóis) e C5 em flavonóis e flavonas (EL-SAYED et al., 2018).

Nas plantas, os flavonoides ocorrem principalmente nas folhas e nas partes aéreas das plantas. Nas folhas de salsa, a apigenina e seus glicosídeos (apiina, apigetrina) são os principais flavonóides, apresentando-se como uma das principais fontes naturais de apigenina (MERKEN & BEECHER, 2000). A atividade antioxidante está diretamente relacionada ao teor de fenólicos e flavonoides totais, então amostras com maiores quantidades dos compostos ativos mencionados exibem uma maior atividade antioxidante.

No estudo realizado por Dobričević et al (2019), é mencionado que em seis cultivares diferentes de salsa, as folhas de todos os cultivares continham um teor significativamente maior de fenólicos e flavonoides em comparação com a raiz. Dependendo na parte da planta, a maior capacidade antioxidante foi determinada nas

folhas, em média 27% superior em comparação com o caule e 3 vezes maior em comparação com a raiz. Relatam que nas folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum* cv. 'Mooskrause' e 'Petra', 173.2b±1.1 e 141.39d±0.72 mg GAE/100 g de folhas frescas, valores semelhantes ao obtido em nosso trabalho de 150,05 mg GAE/100 g de folhas frescas. Os resultados obtidos estimulam o consumo desse tipo de erva junto à alimentação diária, uma vez que concretizam a presença de compostos benéficos para a saúde humana, fazendo com que a inserção deles nas preparações culinárias tenha um propósito além do de saborizar e aromatizar os alimentos.

Como citado anteriormente, um número reduzido de trabalhos utiliza a var. *crispum* e em alguns estudos não é citado a variedade e/ou cultivar utilizado. Em um estudo de revisão, Farzaei et al. (2013), relatou que a partir do extrato aquoso de folhas de *Petroselinum crispum* foram detectados diversos flavonoides, incluindo apigenina, cosmoseina, hidrato de oxipeucedanina e apiina. Miristicina, apiol, cnidilina, isoimperatorina, diosmetina, 7-O-β-D-glicopiranosídeo e 3-O-β-D-glicopiranosídeo de kampferol foram detectados também em extrato de folhas de *Petroselinum crispum*.

Priecina et al. (2014), realizou uma pesquisa que teve como objetivo analisar antioxidantes naturais em diversos vegetais, dentre eles o *Petroselinum crispum*, todos cultivados na região da Letônia. O trabalho teve também como finalidade comparar os resultados obtidos de algumas substâncias como carotenoides e flavonoides destes vegetais frescos e secos. Foi relatado que o conteúdo total de flavonoides na salsa fresca foi de 192.53 ± 9.43 mg EC. 100g⁻¹, enquanto o conteúdo total de flavonoides na salsa seca foi de 158.07 ± 6.35 mg EC. 100g⁻¹, constatando que o processo de secagem é responsável por uma ligeira redução no teor de flavonoides. Foi verificado que o teor de flavonóis, flavan-3-ol e ácidos fenólicos aumentaram nas especiarias analisadas após a secagem, sendo que os flavan-3-ols não foram detectáveis na amostra de salsa.

Estudos indicam que as práticas agrícolas que utilizam a aplicação de uma alta salinidade transitória (NaCl 240 mM) e tratamentos com pH alto (KHCO₃ a 20 mM, pH 12), variando em condições ricas em substrato e livres de substrato no solo, afetam diretamente a qualidade e o rendimento de alguns compostos relacionados à saúde em ervas aromáticas, incluindo a salsa. Diferentes substratos influenciaram o teor de flavonoides nas folhas de salsa, tendo sido o maior conteúdo de flavonoides totais (EC) registrado nos extratos de plantas cultivadas no substrato do solo da Alemanha seguido

pelo solo da Alemanha com adição de musgo de turfa. Os maiores incrementos no conteúdo foram (0,57%) e (0,85%) no endro e salsa, respectivamente, registradas com plantas cultivadas no solo da Alemanha quando comparado com o solo arenoso, tendo sido o menor conteúdo de flavonoides totais (1,055 mg/g) observado na salsa, quando cultivada em solo arenoso sem substrato (SALEH et al., 2019).

Já citado anteriormente, Trifunski et al. (2012), realizou um estudo para avaliação da quantificação de fenólicos totais e flavonoides totais presentes em extratos de *Petroselinum crispum*, obtidos utilizando diferentes solventes: clorofórmio, etanol e metanol. Dentre os solventes utilizados no experimento, temos como resultados obtidos para o teor de flavonoides totais: em clorofórmio (4,50 mg/g EQ), em etanol (42,10 mg/g EQ) e em metanol (25,12 mg/g EQ), que de modo semelhante ao constatado com o conteúdo de fenólicos totais, é possível constatar uma maior afinidade dos flavonoides presentes no *Petroselinum crispum* em solventes de média polaridade.

As diferenças encontradas são atribuídas às diferenças no processo de extração e no tipo de solvente utilizado, metodologia experimental, condições de cultivo das plantas, visto que o tipo de solo e os substratos ali fornecidos afetam diretamente o fornecimento de fontes de N e O para a planta.

Em um trabalho realizado por Slimstad et al., (2020), avaliando o uso das dez ervas mais populares nas cantinas norueguesas, incluindo a salsa, foram analisadas quanto ao conteúdo de flavonóides específicos e outros compostos fenólicos importantes, bem como o teor total de fenólicos em extratos metanólicos. O conteúdo de flavonóides total e o de flavonas em particular foi considerado o mais alto em salsa (2065 mg .100 g⁻¹ DW), tendo sido incluídos os derivados 7-apiosilglicosídeos e 7-malonilapiosilglicosdéos de apigenina.

As plantas são fontes potenciais de antioxidantes naturais, sendo esses efeitos protetores naturais tendo sido atribuídos a vários componentes, como carotenoides, vitaminas C e E e compostos fenólicos. Muitos estudos se concentraram nas atividades biológicas dos fenólicos, que são antioxidantes potentes e eliminadores de radicais livres., sendo a classe dos flavonoides a mais abundante dentro deste grupo de metabólitos secundários. As diferenças nas estruturas dos flavonoides e suas substituições

influenciam a estabilidade do radical fenoxila, afetando as propriedades antioxidantes dos flavonoides.

É possível realizar uma correlação entre o conteúdo de fenólicos, flavona, flavonol; amostras de folhas de ervas condimentares mais escuras tinham maiores quantidades de compostos fenólicos, flavonas e flavonóis. Os níveis de flavonóides e outros fenólicos vegetais podem flutuar durante diferentes estágios de desenvolvimento das plantas sob o estresse aplicado.

Flavonas e flavonóis são os flavonóides predominantes encontrados em tecidos de espécies de Apiaceae, tendo como funções primárias, o crescimento e propagação de plantas, bem como para adaptação a nichos ecológicos. Demonstrou-se que os flavonóides protegem da radiação UV, fornecem pigmentação, mediam a interação da planta com insetos ou micróbios e atuam como inibidores de alimentação. As flavonas (isto é, apigenina) são formadas por 2,3-dessaturação direta de flavanonas naturais, como (2S) -naringenina (GEBHARDT et al., 2007).

Uma dieta rica em flavonóides tem sido relatada com muitos efeitos benéficos à saúde, sendo relatado que uma ingestão diária de flavonóides é de 1 g como glicosídeos ou 650 mg como agliconas, enquanto outro estudo estimou uma média de apenas 23 mg / dia em adultos na Holanda. Em um estudo por volta de 1990, a ingestão média de flavanol e flavona entre os profissionais de saúde dos EUA foi de aproximadamente 20 a 22 mg por dia. Informações indicam que, a quantificação da ingestão alimentar de apigenina é difícil e apresenta grande variação, como a localização geográfica, a cultura e a demografia do local. Um método primário para estimativa do nível de ingestão alimentar baseia-se na avaliação da dieta, que inclui uma entrevista de histórico alimentar ou questionários de frequência alimentar, e compara isso com um banco de dados de composição de alimentos (PROBST et al., 2018).

Meyer et al. (2006), demonstraram que após a ingestão das folhas de *P. crispum*, enriquecida em apiina, a apigenina torna-se presente no sangue humano em altas concentrações. Isto é possível, pois a apiina após sofrer uma hidrólise (seja ela ácida ou enzimática), gerando à liberação da apigenina que é absorvida, através de difusão passiva, e disponibilizada na corrente sanguínea.

A salsa tem um nível particularmente alto de apigenina que excede em muito os outros vegetais ou condimentos. Na natureza, a apigenina é tipicamente encontrada na forma glicosilada, com a estrutura central tricíclica ligada a uma fração de açúcar através de grupos hidroxila (*O*-glicosídeos) ou diretamente ao carbono (*C*-glicosídeos). Os glicosídeos de apigenina comuns são apiina, apigenina-7-*O*-glucosídeo, apigenina-8-*C*-glucosídeo (vitexina), apigenina-6-*C*-glucosídeo (isovitexina), apigenina-7-*O*-neohesperidosídeo (roifolina) e apigenina-6-*C*-glucosídeo-8-*C*-arabinosídeo (scaftosídeo) (WANG et al., 2019).

5.4. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

As propriedades medicinais da salsa, como citado anteriormente, estão relacionados principalmente a uma ampla gama de biomoléculas presentes na planta, sendo primeiramente atribuída aos flavonóides e depois aos componentes presentes em seu óleo essencial. Estudos demonstram que a apigenina, expressa fortes efeitos antioxidantes, aumentando as atividades de enzimas antioxidantes relacionadas a diminuição do dano oxidativo aos tecidos.

Os radicais livres estão envolvidos na peroxidação lipídica, são considerados um papel fundamental na patogênese de doenças crônicas e relacionadas à idade e estão implicados no envelhecimento prematuro. Uma propriedade fundamental de um antioxidante é a capacidade de eliminar os radicais livres, seja por reações do tipo transferência de elétrons (ET) ou transferência de átomos de hidrogênio (HAT).

Em nosso trabalho utilizamos duas técnicas *in vitro* para avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *Petroselinum crispum* var *crispum*. O primeiro método é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Este ensaio se baseia no mecanismo de SET (do inglês *Single Electron Transfer*) ou de transferência de um elétron, processo que permite detectar a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron e reduzir qualquer substância, incluindo metais, carbonilas e radicais. A substância antioxidante age como doador de um átomo de hidrogênio quando é adicionada à solução de DPPH, reduzindo o radical DPPH e formando a hidrazina, desta

forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (PRIOR et al., 2005; CASTELO-BRANCO & TORRES, 2011).

Os resultados obtidos da capacidade antioxidante pelo método DPPH• têm sido apresentados de diversas formas e a falta de padronização dos resultados torna difícil comparar a capacidade antioxidante de uma mesma amostra, ou diferentes amostras (DENG et al., 2011). A maioria dos resultados é apresentada como valor de EC₅₀ ou IC₅₀, que é definida como a quantidade de antioxidante necessário para diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH• em 50% (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; CHEN et al., 2012).

Para o cálculo da atividade antioxidante total (EC₅₀), a absorbância equivalente a 50% da concentração de DPPH foi determinada pelo método desenvolvido por Ruffino et al. (2007), através da construção da curva padrão de DPPH, obtendo-se a equação: $y = -0,0467x + 1,0391$; $R^2 = 0,8319$, como demonstrado no **Gráfico 4**. Neste estudo, o extrato de salsa mostrou um valor de EC₅₀ = 15,50 mg. mL⁻¹.

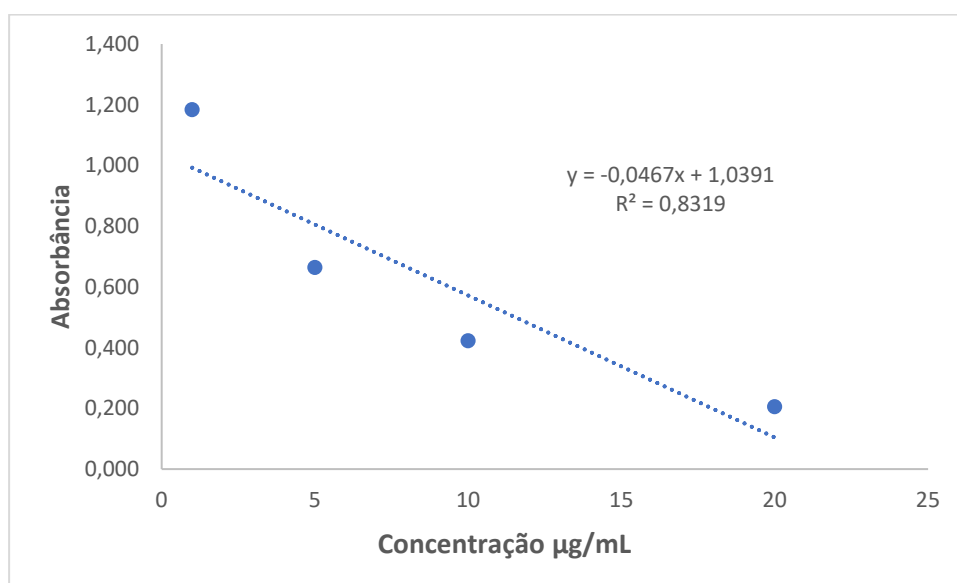


Gráfico 4: Curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante total (AAT) do EAF de *Petroselinum crispum* var. *crispum* no Ensaio DPPH

O ensaio DPPH mede a capacidade do extrato para doar hidrogênio ao radical DPPH, resultando em um clareamento da solução DPPH e quanto maior a ação

clareadora, maior a atividade antioxidante da substância, que se reflete em um menor valor de EC_{50} . O valor de atividade DPPH (EC_{50}) obtido, foi semelhante para outras variedades, demonstrando ter melhores propriedades antioxidantes do que ácido ascórbico, modelo de antioxidante, constatando que esta espécie exibiu forte antioxidante capacidade *in vitro* e pode ser uma fonte potencial de antioxidantes naturais (FARAH et al., 2015).

A atividade antioxidante dos flavonoides pode ser observada no primeiro minuto de sua incubação com o radical DPPH, sugerindo uma cinética rápida de interação desses compostos. A atividade de sequestro de radicais livres varia com a estrutura química dos compostos, foi percebido que quanto mais porções hidroxilas presentes na estrutura do flavonoide, maior é a atividade antioxidante. Existem três principais pontos na relação estrutura-atividade (REA) que desempenham um papel importante na atividade antioxidante de flavonóides: a) uma estrutura orto-dihidroxi (catecol) no anel B, para a deslocalização eletrônica (**Figura 29A**); b) ligação dupla C2-C3 em conjugação com uma função 4-oxo em o anel C fornece deslocalização de elétrons do anel B (**Figura 29B**); c) grupos hidroxila nas posições 3 e 5 que são doadores de ligação de hidrogênio, com o grupamento oxo presente na estrutura (**Figura 29C**) (WHU et al., 2004; MAJEWSKA et al., 2011; PROCHÁZKOVÁ et al., 2011).

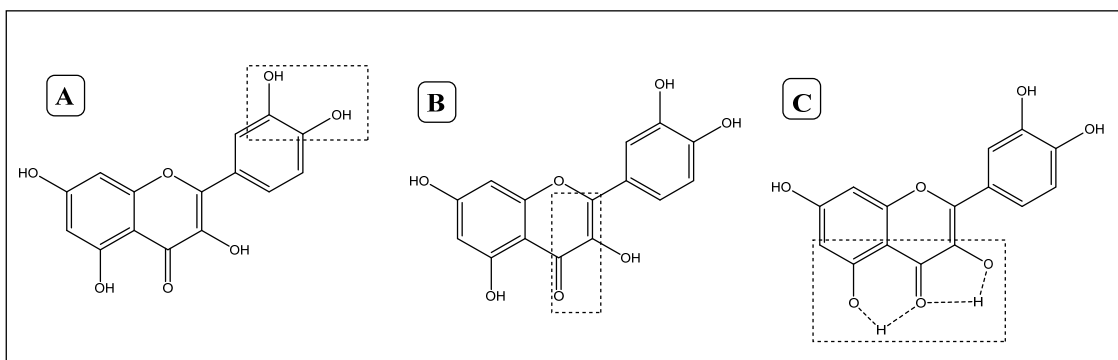


Figura 29: **A** - Estrutura orto-di-hidroxi (catecol) no anel B; **B** - Ligação 2,3-dupla em conjugação com uma função 4-oxo no anel C; **C** - Grupos hidroxila nas posições 3 e 5.

Albano & Miguel (2011), evidenciaram em seu trabalho com plantas da família Lamiaceae e Apiaceae, a correlação entre a presença de conteúdo fenólico com atividade antioxidante, pelo método de DPPH, principalmente em exemplos de extrato de folhas de ervas. Tais correlações também foram observadas em outros estudos, direcionando uma

busca por bioativos fitoquímicos, assim como no nosso estudo, onde foi observada uma correlação positiva forte e significativa entre a atividade sequestrante do DPPH e o conteúdo fenólico de *P. crispum*, pertencente à família Apiaceae, já que esses compostos podem doar prontamente átomos de hidrogênio ao radical. O número de estudos da utilização de vegetais e frutas como fontes naturais antioxidantes aumentaram muito nos últimos anos, tendo relato principalmente dos vegetais com a maior concentração de polifenóis, como alcachofras, salsa e couve de Bruxelas (BRAT et al., 2007; AL-JUHAIMI & GHAFUOR, 2011).

Hinneburg et al. (2009), relataram que o extrato hidroalcoólico de *P. crispum* mostrou um valor de EC_{50} de $12,0 \pm 0,10 \text{ mg mL}^{-1}$ e segundo Soto-Hernández (2017), o extrato aquoso da folha de salsa apresentou um valor de EC_{50} de $26,2 \text{ mg mL}^{-1}$. O teste DPPH fornece informações sobre a reatividade dos flavonóides frente a alguns radicais livres e muitos estudos foram realizados para estabelecer a relação entre a estrutura do flavonoide e sua capacidade de sequestro de radicais (**Figura 30**). A atividade antioxidante do principal flavonoide, presente na salsa, a apigenina e seus glicosídeos, foram testados por Papáy (2014), que demonstrou que a aglicona (flavonoide sem açúcar) apresentou maior atividade antioxidante, o que pode ser atribuída à falta de componentes de açúcar no grupo C7-OH. Pietta (2000), demonstrou que o extrato hidroalcoólico do *P. crispum*, apresenta atividade doadora de ligação de hidrogênio, o que contribui na capacidade de eliminação do radical livre. A presença de C-glicosídeos na apigenina apresenta um efeito negativo, reduzindo a capacidade de absorção do oxigênio radicalar, mas geralmente melhoram a atividade reacional do DPPH frente radicais hidroxila.

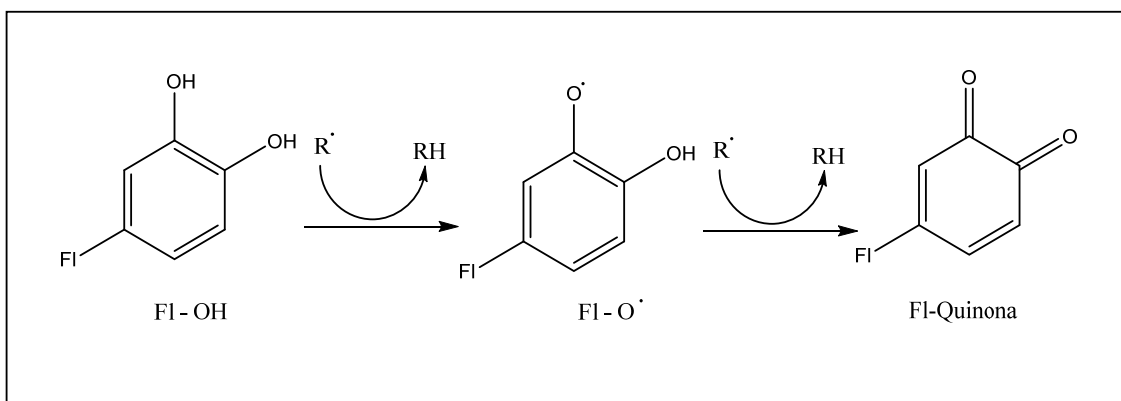


Figura 30: Eliminação de espécies reativas de oxigênio ($R \bullet$) por flavonóides. O radical livre FI-O• pode reagir com um segundo radical, adquirindo uma estabilidade através da estrutura de quinona.

Também muito utilizado para avaliar atividade antioxidante *invitro*, é o ensaio de poder antioxidante redutor férrico (FRAP), que encontrou aplicações crescentes na avaliação dos componentes antioxidantes dos polifenóis da dieta. O ensaio FRAP depende da redução de um complexo férrico de tripiridiltriazina [Fe (III) -TPTZ]₂ para o complexo ferroso de tripiridiltriazina [Fe (II) -TPTZ]₂ por um antioxidante, geralmente em uma condição não fisiológica com baixo pH, cerca de 3,6 (ARUOMA, 2003).

O ensaio FRAP é um método direto relativamente simples, rápido e barato de medir a atividade antioxidante combinada ("total") de antioxidantes redutores (doadores de elétrons) em uma amostra. Um fator limitante na reação é a capacidade total ou combinada de doação de elétrons de antioxidantes redutores presentes na amostra adicionada à mistura de reação. O ensaio não envolve geração de radical ou o sequestro de radicais formados, mas utiliza uma simples reação redox, realizada em condições fixas, nas quais uma molécula oxidante muda de cor quando é reduzida pela ação combinada do redox ativo, agentes redutores, doadores de elétrons (antioxidantes) presentes na amostra, onde ocorrer uma reação de transferência de elétrons (BENZIE et al., 2017).

Para o cálculo da atividade antioxidante total pelo método FRAP, foi obtida a equação da curva padrão: $y = 0,5302x - 0,0409$; $R^2 = 0,976$, conforme **Gráfico 5**. Os valores de FRAP foram expressos em milimolar (mM) de equivalentes de FeSO₄ por miligrama de extrato de metanol de planta seca. Em nosso estudo, os extratos de *P.*

crispum var *crispum* apresentaram um valor de 189,8 mM de Fe (II)/mg de extrato da salsa, avaliando a atividade de FRAP.

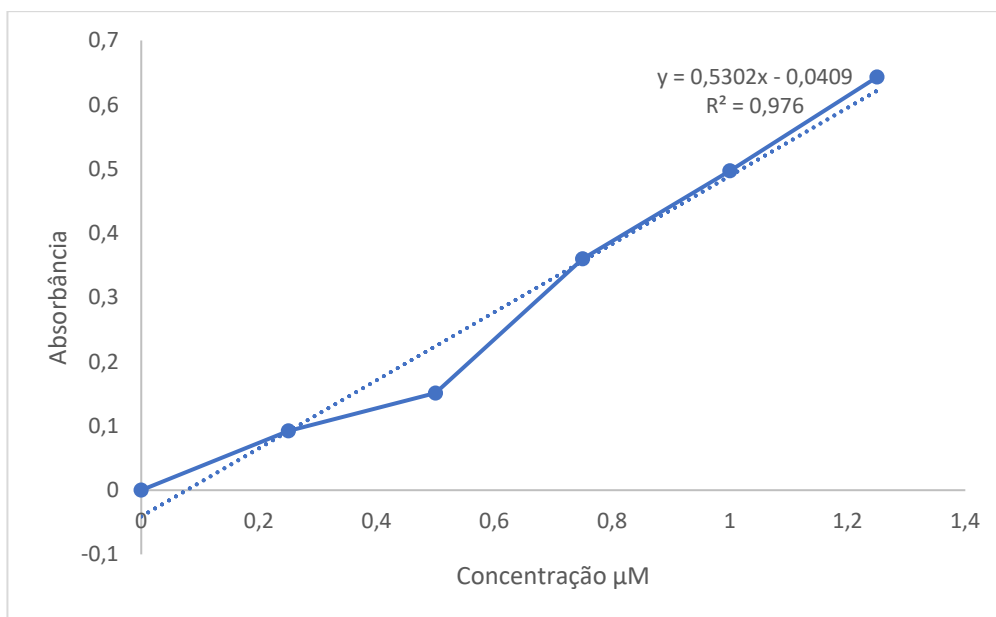


Gráfico 5: Curva de calibração para a determinação da atividade antioxidante total (AAT) do EAF de *Petroselinum crispum* var. *crispum* no Ensaio FRAP

Os valores de pH têm um efeito importante na redução da capacidade antioxidante, pois sob condições ácidas, a redução da capacidade pode ser suprimida devido à protonação dos compostos antioxidantes, enquanto nos meios básicos ocorre a dissociação de prótons de compostos fenólicos, o que pode aumentar a capacidade de reduzir uma amostra (HUANG et al., 2005).

A dependência temporal do FRAP pode estar associada a diferentes taxas de reação do complexo, devido à presença de fenólicos com reatividade diferente (moléculas antioxidantes com reatividade rápida, média e lenta) que interagem de forma independente e / ou presença de metabólitos altamente reativos ao complexo Fe^{3+} -TPTZ. Durante a realização da metodologia, foi necessário aumentar o tempo de incubação da amostra com o reagente FRAP, as correlações aumentaram significativamente (FRAP-30 e FRAP-120), indicando que esses extratos contêm uma mistura complexa de fenólicos que exibem menor reatividade, exigindo mais tempo para reduzir o Fe^{3+} -TPTZ na forma ferrosa.

Tiveron (2010), relatou que o extrato etanólico de *P. crispum* apresentou um valor de 100mM de Fe (II)/mg de extrato de planta seca, avaliando a atividade da FRAP, como nossos resultados. Estudo realizado por Tang et al. (2011), avaliou extratos de folhas de *P. crispum* foram avaliados por suas propriedades antioxidantes e avaliando a proteção contra danos ao DNA, sem os extratos obtidos processo sequencial usando hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Dentre os extratos testados, o extrato de diclorometano de *P. crispum* exibiu o maior valor de FRAP ($0,360 \pm 0,009$ mmol g⁻¹, P <0,05). A análise de correlação de Pearson foi realizada para avaliar a relação entre o conteúdo fenólico e as atividades de redução férrica dos extratos de folhas da salsa, identificando correlação positiva, o que indica que os compostos fenólicos presentes em *P. crispum* contribuíram para a sua atividade redutora. A capacidade redutora dos extratos sugere sua capacidade de doar elétrons para reduzir a tripiridiltriazina férrica (Fe³⁺ - TPTZ) ao complexo ferroso (Fe²⁺-TPTZ). Isso implica que o extrato de *P. crispum* pode fornecer proteção antioxidante contra radicais em sistemas biológicos reais, doando elétrons a radicais e bloqueando reações em cadeia de radicais.

Os fenólicos totais e os flavonoides são compostos bioativos altamente correlacionados entre si e com a atividade antioxidante, dependendo do método de quantificação. As maiores correlações entre fenólicos totais e atividade antioxidante foram obtidas com DPPH e FRAP, enquanto para os teores de flavonoides foram obtidas com ABTS e FRAP. Portanto, a atividade antioxidante determinada com FRAP foi correlacionada com os conteúdos de fenólicos totais e flavonoides. Essas altas correlações são de grande importância, pois mostram que os fenólicos totais produzidos são, em sua maioria, flavonoides associados à atividade antioxidante, principalmente quando quantificados pelo método FRAP. Algumas dessas correlações já foram encontradas em outros estudos (**Tabela 3**).

Tabela 3: Conteúdos fenólicos e flavonoides totais e avaliação da capacidade antioxidante *invitro* do EAF de *P. crispum* var. *crispum*

Ensaio	<i>Petroselinum crispum</i> var <i>crispum</i>
Fenólicos Totais (mg GAE/g, ess)	12,49 ± 1,70
Flavonoides Totais (mg QE/g, ess)	15,05 ± 2,20
EC50 (mg /mL) (DPPH)	15,50
FRAP (mM Fe (II)/mg ess)	189,8

5.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VIVO* – MODELO EM CÉLULAS DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

Ensaio microbianos *in vivo* utilizando-se, principalmente, células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* têm se mostrado muito adequados para determinação da capacidade antioxidante de diferentes compostos, fornecendo resultados rápidos, reprodutíveis e passíveis de serem correlacionados ao observado em mamíferos. Várias razões tornaram essa levedura um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo, principalmente por seu metabolismo ser semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P₄₅₀). Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível; e os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para as células humanas, em contrapartida a muitos ensaios antioxidantes realizados de forma *in vitro* e sem qualquer relação com o ambiente citoplasmático celular. (SOARES et al., 2005).

5.5.1. Avaliação da Toxicidade Celular do Extrato Vegetal

A avaliação da toxicidade do extrato vegetal é o primeiro passo a ser realizado em estudos que envolvem a análise da capacidade antioxidante de substâncias naturais. Inicialmente determinamos a toxicidade do extrato de *Petroselinum crispum var crispum* frente a células de *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações de 0,131 mg.mL⁻¹ (E1) e 0,226 mg.mL⁻¹ (E2) (**Gráfico 6**). De acordo com os resultados de sobrevivência celular, a exposição ao extrato de salsa não apresenta alta toxicidade, visto que de acordo com o gráfico constatamos que a exposição frente a E2 alcançou o mesmo nível das células do ensaio controle. De modo complementar, um ensaio antioxidante utilizando colônias de células crescidas em placa após a exposição ao extrato de salsa e peróxido de hidrogênio, apresentou resultados que revelaram atividade antioxidante idêntica para ambas as concentrações (44,67 ± 9,50% para E1 e 46,33 ± 5,51% para E2) comparados às células submetidas a estresse oxidativo (26,50 ± 8,89%) (p < 0,05).

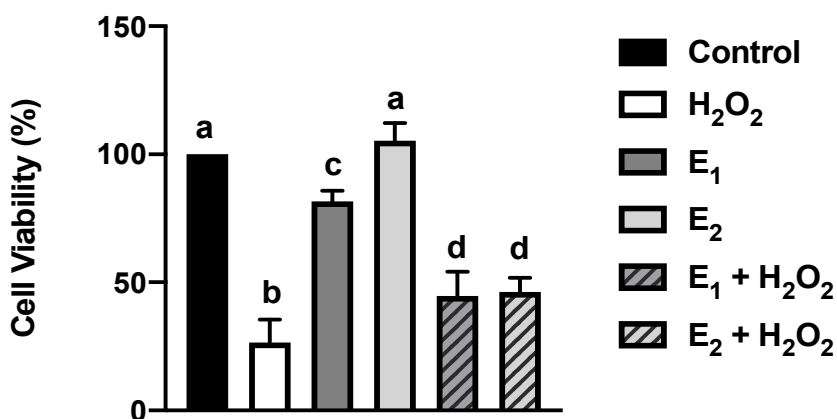


Gráfico 6: Exposição de células de levedura ao extrato de salsa (E1 e E2) com ou sem pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (1,0 mM) por 1 hora. Os resultados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes. Letras diferentes significam resultados estatisticamente diferentes (p < 0,05).

Uma outra maneira de avaliar a ação antioxidante do extrato de salsa frente ao estresse oxidativo causado pelo H₂O₂ é determinando a integridade das membranas celulares através do ensaio de lipoperoxidação. A formação de malonaldeído (MDA) está diretamente associada a danos na membrana plasmática. No ensaio de peroxidação lipídica, as concentrações de extrato de salsa foram aumentadas para 0,339 mg.mL⁻¹ (E3), 0,452 mg.mL⁻¹ (E4) e 0,565 mg.mL⁻¹ (E5), uma vez que os resultados de

toxicidade e atividade antioxidante em E1 e E2 foram baixos. Os resultados demonstraram que o extrato de salsa diminuiu de forma dose-dependente a peroxidação lipídica em relação às células estressadas ($p < 0,05$). Embora o E3 não seja estatisticamente diferente das células expostas ao peróxido de hidrogênio de modo isolado, as concentrações de E4 e E5 diminuíram de $316,44 \pm 34,92$ pmol MDA por mg de célula (estresse oxidativo) para $139,86 \pm 43,78$ pmol MDA por mg de célula e $93,44 \pm 0,69$ pmol MDA por mg de célula, respectivamente (**Gráfico 7**). É importante salientar que E3 e E4 são estatisticamente iguais ao grupo controle, enquanto E5 estava abaixo do valor controle ($p < 0,05$). A peroxidação lipídica não diminuiu quando as concentrações de E1 e E2 foram analisadas (dados não mostrados).

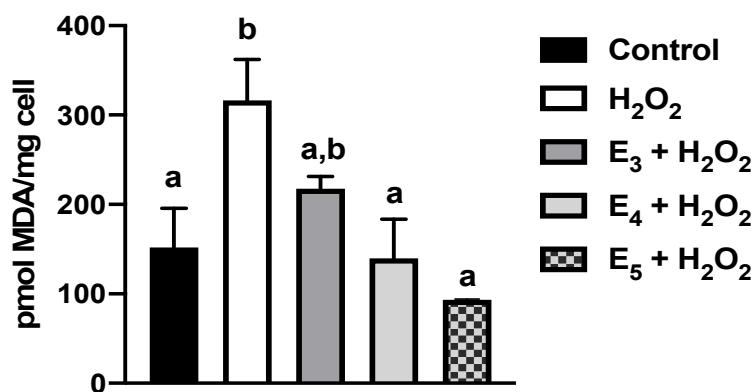


Gráfico 7: Quantificação dos níveis de peroxidação lipídica de células sob estresse oxidativo (H₂O₂ 1,0 mM) pré-tratadas com concentrações crescentes de extratos de salsa E3 (0,339 mg.mL⁻¹), E4 (0,452 mg.mL⁻¹) e E5 (0,565 mg.mL⁻¹). Os resultados representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experiências independentes.

Não há relatos na literatura de trabalhos que avaliaram a atividade antioxidante do extrato aquoso da salsa crespa em modelos de leveduras, como o utilizado em nosso estudo. Alguns estudos utilizando a salsa lisa são relatadas na literatura, com o uso de outros modelos experimentais. Dorman et al., (2011) realizaram um estudo utilizando o extrato aquoso de *Petroselinum crispum*, avaliando as propriedades citotóxicas, apoptóticas e antioxidantes. Na avaliação da citotoxicidade, o extrato foi avaliado quanto ao seu efeito na fragmentação do DNA mediada por oxidação e degradação de proteínas; sendo possível demonstrar que a salsa demonstra tendências pró-oxidantes em modelo

baseado em proteínas, mas não em um modelo baseado no DNA, bem diferente do modelo que utilizamos nesse trabalho.

Nielsen et al. (2001) realizaram uma pesquisa onde sete homens e sete mulheres participaram de um estudo randomizado cruzado para estudar o efeito da ingestão de salsa (*Petroselinum crispum*), avaliando a excreção urinária de flavonas e alguns biomarcadores para estresse oxidativo. A intervenção resultou em aumentos significativos nas duas enzimas antioxidantes avaliadas, GR e superóxido dismutase. Além disso, houve uma redução no tempo de atividade de todas as enzimas antioxidantes analisadas durante a intervenção com redução da dieta ofertada, podendo ser correlacionada com a baixa ingestão de frutas e vegetais verdes.

Justessen et al. (2001) realizaram um estudo onde ocorreu a adição de ervas frescas em pratos dinamarqueses, avaliando a sua contribuição diária na ingestão de antioxidantes, sendo constatado que o *P. crispum* apresentou considerável aumento nas enzimas antioxidantes, possivelmente refletindo uma resposta adaptativa pelo sistema de defesa de enzimas antioxidantes endógenas, quando ingerido alimentos ricos em flavonoides.

5.5.2. Exposições à Apiina e Impactos na Toxicidade

O potencial antioxidante observado no extrato de salsa é diretamente relacionado ao efeito sinérgico de todos os constituintes presentes no extrato aquoso. É relatado que a apiina é um desses constituintes e tem uma concentração aproximada de 6% no extrato, no entanto, existem poucos estudos revelando a atividade antioxidante da apiina. O primeiro passo é determinar as concentrações não tóxicas das células capazes de gerar uma resposta protetora ao processo de estresse oxidativo, sendo então verificados os níveis de toxicidade dependentes da dose e do tempo de exposição à apiina.

Inicialmente foi necessário determinar o grau de toxicidade do reagente DMSO utilizado para solubilizar a apiina. Para isso, foram separados dois grupos com células de *Saccharomyces cerevisiae* juntamente com o DMSO ou com a solução de apiina preparada com DMSO em diferentes concentrações. Estas duas situações têm o objetivo de realizar um comparativo entre a ação do DMSO e a ação da apiina na presença do

DMSO nos diferentes momentos adotados, uma vez que os efeitos gerados poderiam ser sinérgicos e causar variação durante a coleta de resultados.

A solução de apiina foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração abaixo de 3% v/v, e as células foram incubadas em DMSO sem a presença de apiina. O DMSO não foi tóxico para as células após incubação por 1 e 2 horas em concentrações de apiina de 0,01 e 0,1 mM ($p < 0,05$). Contudo, após 24 horas os resultados mostraram $107,00 \pm 4,24$ % (controle), $69,67 \pm 7,50$ % (DMSO) e $56,00 \pm 9,16$ % (0,01 mM de apiina), revelando não toxicidade apenas em $109,33 \pm 8,48$ % (0,1 mM de apiina) (**Gráfico 8**). Em 1,0 mM de apiina houve toxicidade dependente do tempo para todos os outros tratamentos ($p < 0,05$). Estes resultados foram comparados com os de um experimento controle sem a presença de DMSO ou solução de apiina; portanto, as concentrações de 0,01 mM e 0,1 mM de apiina e o tempo de 1 hora de incubação foram os selecionados para os demais experimentos.

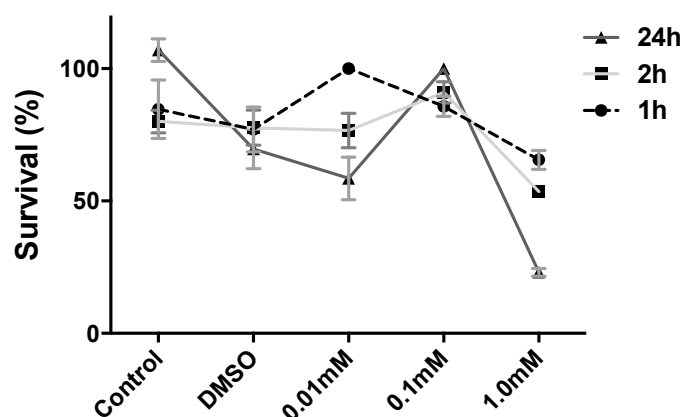


Gráfico 8: Exposição de células de levedura a cinco condições diferentes: controle (apenas células), DMSO (solvente) e diferentes concentrações de apiina (0,01 mM, 0,1 mM e 1,0 mM). As colônias foram contadas após um período de 48 horas.

O gráfico 8 representa a porcentagem de sobrevivência das células nas cinco condições de exposição às amostras determinadas, analisadas em três períodos de incubação diferentes. Os resultados obtidos mostram que a exposição por tempo prolongado, de 24 h, leva a uma diminuição da porcentagem de sobrevivência das células em três dos cinco grupos estabelecidos. Além disso, a duração de 24 h demandava mais recursos, gasto energético e duração de experimento; logo reduzir essa latência evitaria tornar o experimento dispendioso.

A avaliação do potencial antioxidante *in vivo* de substâncias exógenas depende de algumas variáveis, entre elas: absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas, tipos de radicais livres gerados no processo oxidativo e concentração plasmática ideal para desempenhar sua atividade antioxidante; tendo sido relatados em alguns estudos que um aumento da duração de exposição e concentração de substâncias que tenham potencial antioxidante pode gerar um efeito contrário, reduzindo a sobrevivência dos microrganismos, em oposição ao proposto no presente trabalho (BIANCHI et al., 1999; D'ARCHIVIO et al., 2010).

Essa análise dos fatores abordados foi importante para orientar a definição do tempo de exposição às substâncias e as concentrações escolhidas para os ensaios posteriores e, a partir de então, foram definidas que as exposições seriam de 1 hora. Este período de incubação é regularmente adotado para o modelo biológico usado. Por fim, o ensaio de toxicidade forneceu informações primárias sobre a utilização da apiina na presença do DMSO, mostrando que não haveria interferência significativa na utilização desse solvente sobre a sobrevivência celular. Além disso, permitiu afirmar que as concentrações de 0,01 mM e 0,1 mM apresentaram melhores resultados que a concentração de 1,0 mM quanto à toxicidade, sendo a concentração de 0,1 mM a maior concentração não tóxica que poderia ser utilizada para os ensaios subsequentes.

5.5.3. Comparação da Viabilidade Celular através do Potencial Antioxidante dos Flavonoides (Apiina e Apigenina)

O ensaio de viabilidade celular visa essencialmente avaliar a proteção gerada pelos flavonoides em situações de estresse oxidativo. Essa medida é dada pela contagem das unidades formadoras de colônias a partir de células viáveis que foram expostas a potenciais substâncias antioxidantes e a agentes estressantes.

A fim de avaliar e comparar o potencial antioxidante dos flavonoides foram utilizadas diferentes abordagens, com enfoque no pré e no pós-tratamento frente ao agente causador de estresse oxidativo; e, para tanto, utilizou-se as concentrações determinadas a partir do ensaio de toxicidade para incubação, sendo de 0,1 mM para apiina e conseqüentemente 0,1 mM para apigenina, bem como o tempo de exposição de 1 hora.

Para detectar se a apiina (flavonoide glicosilado) poderia proteger as leveduras do estresse oxidativo, a suspensão celular foi submetida à incubação com H₂O₂ em concentrações de 0,5 mM e 1,0 mM antes e após a incubação com a apiina isolada na concentração de 0,1 mM (maior concentração não tóxica). O ensaio com incubação anterior com peróxido de hidrogênio (0,5 mM) e incubação subsequente com apiina revelou que houve retomada da viabilidade celular. O mesmo resultado foi encontrado no ensaio reverso com apiina e o peróxido de hidrogênio. Ao usar peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM, apenas as células previamente incubadas com apiina mostrou viabilidade aumentada (**Gráfico 9**), onde é demonstrado a quantidade de células viáveis em diferentes tipos de condições a que foram submetidas, utilizando-se inicialmente a apiina e o H₂O₂.

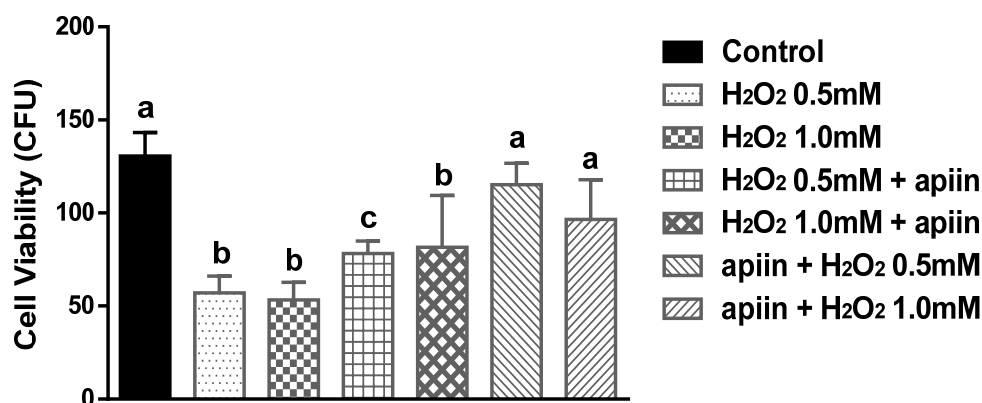


Gráfico 9: Exposição de células de levedura a duas condições diferentes. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) por 1 hora e tratamento subsequente com apiina (0,1 mM) por 1 hora. Pré-tratamento com apiina (0,1 mM) por 1 hora e tratamento subsequente com peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) por 1 hora.

Analisando os resultados obtidos percebe-se que o grupo controle sem exposição a nenhum agente manteve-se viável, provando que a metodologia adotada e as condições de cultivo foram eficientes para o crescimento adequado. No ensaio com exposição exclusiva de H₂O₂ ocorreu uma redução drástica da viabilidade, causada pelo estresse oxidativo e uma inabilidade das células em se proteger suficientemente contra o peróxido de hidrogênio, tanto na concentração de 0,5 mM quanto em 1,0 mM.

Uma vez realizando a pré-incubação das células pelo tempo de 1 h com o H₂O₂ a 0,5 mM e 1,0 mM, e posteriormente fazendo o tratamento com a apiina na concentração

de 0,1 mM, ocorreu uma retomada da viabilidade celular; porém, a significância deste aumento é vista apenas com a menor concentração do agente estressante, o que indica que em baixas concentrações de H₂O₂ a apiina mostrou ter eficácia contra o estresse e protegeu as células.

Este mesmo fato foi percebido quando ocorreu pré-incubação com a apiina a 0,1 mM e posteriormente a incubação com H₂O₂. Observando o pós-tratamento com H₂O₂ a 0,5 mM, a apiina foi capaz de manter uma maior viabilidade celular quando utilizada antes da exposição ao agente estressor, confirmando mais uma vez que em baixas concentrações do agente estressante a apiina exerce efeito protetor. É notável também que, quando a apiina foi incubada com a maior concentração do H₂O₂, ocorreu proteção, que em termos significativos, foi semelhante ao grupo controle.

Em suma, a apiina foi capaz de proteger as células, garantindo maior viabilidade celular quando utilizada previamente ao estresse causado pelo H₂O₂ ou em baixas concentrações do mesmo. Por ser um flavonoide semelhante a apigenina, diferindo apenas devido a glicosilação, procedeu-se em seguida para uma análise com este outro flavonoide sob as mesmas condições de exposição, com exceção ao pré-tratamento com apigenina. O intuito foi de avaliar e comparar os resultados de proteção e viabilidade celular gerados após o estresse oxidativo causado.

O ensaio de viabilidade celular utilizando o antioxidante apigenina mostrou que apenas a apigenina não foi suficiente para causar um aumento na viabilidade celular. Nesse caso, os valores foram estatisticamente semelhantes ao das células que foram estressadas apenas com o agente oxidante, conforme demonstrado na **Gráfico 10**, quando a apigenina a 0,1 mM foi utilizada no pós-tratamento perante a presença do H₂O₂; e além disso foi realizado um experimento utilizando ambos os flavonoides para avaliar um possível sinergismo na condição mais estressante, que era quando o peróxido de hidrogênio na concentração de 1,0 mM era exposto previamente às células.

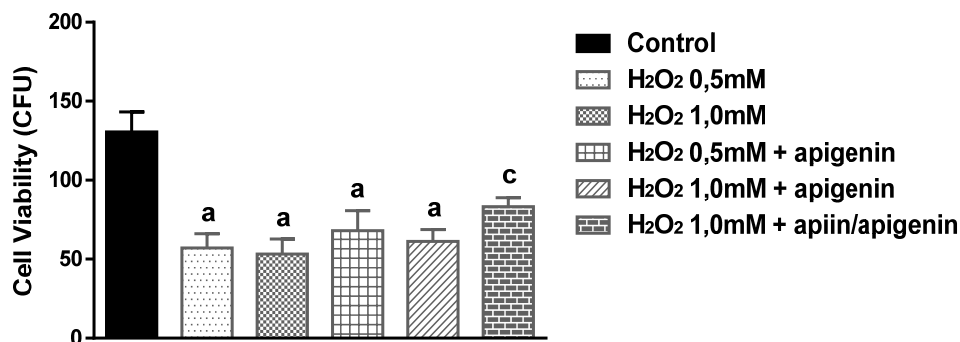


Gráfico 10: Exposição de células de levedura a duas concentrações diferentes de H₂O₂ (0,5 mM e 1,0 mM), com tratamento subsequente com apigenina (0,1 mM); e apiina (0,1 mM) + apigenina (0,1 mM) durante 1 h.

Os resultados mostrados no gráfico foram usados como parâmetro de comparação entre os flavonoides. Avaliando novamente o grupo controle, os métodos usados foram capazes de gerar viabilidade celular adequada quando não ocorria exposição a qualquer das substâncias. Nas concentrações do agente estressante adotadas houve redução da viabilidade como previsto. Um aspecto importante a ser ressaltado é que a apigenina usada no pós-tratamento não foi suficiente para causar aumento da viabilidade celular. Os resultados revelaram que não houve variação significativa na viabilidade tanto na presença quanto na ausência de apigenina, sendo considerado estatisticamente semelhante ao estresse causado somente pelo peróxido. No entanto, ao observar o resultado promovido pela mistura da apiina e apigenina, ocorreu um aumento da viabilidade celular quando comparado ao ensaio somente com apigenina ou H₂O₂, indicando que possivelmente houve um resultado sinérgico com a adição da apiina, gerando resultados ligeiramente superiores quanto a viabilidade celular, porém não com a eficácia esperada.

Em nosso estudo, a apigenina a uma concentração de 0,1 mM não reverteu os efeitos causados pelo peróxido de hidrogênio (0,5 mM e 1,0 mM) na viabilidade celular comparado com o mesmo tratamento com apiina nas células sob estresse oxidativo. Isso mostra que a apigenina nem sempre pode ser considerada uma molécula antioxidante contra H₂O₂ em ensaios *in vivo*.

Os flavonoides apigenina e apiina são os compostos ativos identificados em *P. crispum* e estudos demonstraram seus potenciais propriedades antioxidantes. No entanto, existem poucos estudos que investigam a atividade antioxidante da apiina em modelos

celulares. No trabalho realizado por Li et al. (2014) realizado com folhas de aipo (*Apium graveolens* L. var. *dulce*) foi apresentada uma importante matriz fenólica, onde compostos fenólicos foram isolados para a avaliação dos efeitos antioxidantes *in vivo*. Um flavonoide foi identificado, após isolamento e purificação, como a apiina por LC/MS que apresentou atividade biológica semelhante ao já relatado com a apigenina, no entanto sem relatos significativos, na época, sobre avaliação da atividade antioxidante da apiina *in vitro* e em *in vivo*.

A atividade antioxidante foi realizada utilizando num estudo *in vivo*, sendo que todos os dados foram medidos, incluindo o MDA e a lipofuscina (LPF), bem como as atividades da superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT) e a capacidade antioxidante total (TAOC), no soro, cérebro, coração, fígado e rim. Os resultados mostraram que a apiina teve uma atividade de eliminação notável de radicais livres nos ensaios do MDA e no LPF, promovendo um incremento no TAOC e melhoras significativas nas atividades de SOD, GSH-Px e CAT (LI et al., 2014).

5.4 Proteção dos Flavonoides contra Lipoperoxidação (Método TBARS)

O ensaio de peroxidação lipídica consiste na lesão das membranas das células a partir da reação dos radicais livres com os ácidos graxos insaturados ali presentes, formando lipídeos peroxidados que podem gerar danos na estrutura da membrana e o seu comprometimento. Neste caso, uma vez que a membrana é danificada, isto causa alterações na sua permeabilidade e prejudica a troca iônica, expondo o conteúdo intracelular causando alterações diversas que podem culminar na morte celular.

No ensaio de peroxidação lipídica após pré-tratamento com H₂O₂ (1,0 mM) e incubação subsequente com apiina ou apigenina (0,01 mM e 0,1 mM), uma diminuição nos níveis de peroxidação dos lipídios foi observada nas duas concentrações dos dois flavonoides, sendo mais pronunciado com 0,1 mM de apiina (46% de diminuição em relação às células sob estresse oxidativo) com valores semelhantes ao controle. Nesse caso, a apigenina também foi capaz de diminuir os danos à membrana celular, com eficiência semelhante à apiina em ambas as concentrações. No entanto, a incubação articular com os dois flavonoides não mostrou efeito sinérgico, igual ao verificado no ensaio de viabilidade celular (**Gráfico 10**).

No presente trabalho, após utilizar as condições adotadas, foram obtidos os resultados dos níveis de peroxidação lipídica apontados abaixo:

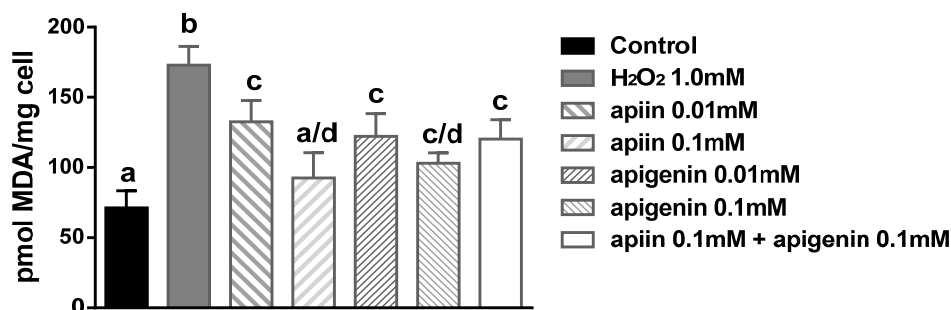


Gráfico 11: A peroxidação lipídica foi medida como pmol de MDA (malondialdeído) pelo método de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico). As células sobre estresse foram incubadas com apiina (0,01 mM e 0,1 mM); apigenina (0,01 mM e 0,1 mM); e apiina + apigenina (0,1 mM + 0,1 mM) durante 1 h.

Conforme pode ser visto no **gráfico 11**, têm-se a quantidade de MDA gerada como subproduto da reação de peroxidação nas diferentes condições que as células foram submetidas. Naturalmente, o grupo controle como não foi exposto às substâncias gerou menor quantidade de MDA, que é contrastante quando comparado ao grupo que foi exposto ao H₂O₂, onde a quantidade de MDA foi potencializada, demonstrando grande danos às membranas celulares.

No momento de utilização da apiina foi notório que a concentração de 0,01 mM mostrou resultados menores que os induzidos pelo H₂O₂, porém ainda elevados quando comparados ao controle. Ao analisar os resultados obtidos com a concentração de 0,1 mM da apiina percebeu-se uma redução pronunciada da peroxidação em comparação com o H₂O₂, e estes resultados aproximaram-se dos obtidos no grupo controle, indicando que tal concentração gerou efeitos positivos nas células.

Observando os resultados da apigenina e fazendo um comparativo, é pertinente afirmar que os resultados obtidos nas mesmas concentrações de apiina e apigenina foram semelhantes, indicando que para este ensaio a eficiência de ambos os flavonoides alcançou níveis abaixo do grupo tratado com H₂O₂. No tocante à mistura dos flavonoides

para este ensaio não houve sinergia na habilidade de reduzir a lipoperoxidação, o que é corroborado ao rever os resultados sinérgicos obtidos na viabilidade celular.

Geralmente a glicosilação dos grupos hidroxila diminui a capacidade antioxidante dos flavonoides, possivelmente pela perda das hidroxilas livres, que estão em sistemas de ressonância com o anel aromático. No entanto, um estudo mostrou que os flavonoides glicosilados têm atividade antioxidante semelhante à sua forma não glicosilada, como no caso da naringenina (aglicona) e naringina (glicosilado). Jiménez-Aliaga et al. (2011) relatam que os flavonoides glicosilados são capazes de regular o estado redox intracelular, através da modulação da expressão gênica do caráter antioxidante. No caso da quercetina e rutina, ambos inibem a formação de agregados β -amiloides, contribuindo para a desintegração dos agregados neurofibrilares, reduzindo o estresse oxidativo desses processos, porém, a rutina provou ser muito mais eficaz na inibição da enzima β -secretase, responsável pela formação de peptídeos amiloides e o consequente surgimento de agregados.

Existem duas possíveis interações relevantes entre flavonoides e as bicamadas lipídicas: (i) a adsorção na superfície da membrana pela interação dos flavonoides hidrofílicos com a cabeça polar dos grupos de lipídios na interface água-lipídio; e (ii) a partição do flavonoide na parte apolar do núcleo da membrana plasmática, associado à sua natureza hidrofóbica. Além da reatividade dos radicais livres ditados por sua estrutura química, interações de flavonoides com membranas podem contribuir para determinar sua capacidade antioxidante. Além disso, como mostrado recentemente, as interações da superfície flavonoide-membrana podem proteger a integridade da bicamada lipídica de agentes desreguladores (ARORA et al., 1998; VERSTRAETEN et al., 2003)

Resultados apresentados no trabalho realizado por Erlejman et al. (2004) enfatizam a importância de considerar não apenas a estrutura química dos flavonoides, mas também a natureza das interações entre essas moléculas e a membrana biológica, para poder estimar o potencial antioxidante de um flavonoide. Mesmo quando diferentes famílias de flavonoides fossem igualmente eficazes na proteção aos lipídios a oxidantes solúveis em água, diferenças significativas entre essas substâncias foram encontradas relacionadas a capacidade protetora contra danos induzidos por oxidantes lipossolúveis. Os flavonoides mais hidrofílicos estabelecem ligação de hidrogênio com o grupamento polar de fosfolipídios na interface das membranas; conseqüentemente os flavonoides

podem fornecer uma certo nível de proteção para a bicamada contra agressores externos e internos, contribuindo para preservar a estrutura e função de membranas biológicas, sendo este um fator que contribui para a capacidade antioxidante dos flavonoides.

Existem poucos relatos de estudos que analisaram o potencial antioxidante da apiina, principalmente em modelos biológicos como em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). No nosso estudo foi constatado que a apiina era não tóxica nas concentrações de 0,1 mM e 0,01 mM (**Gráfico 8**), apresentando ação antioxidante em células sob estresse e em células pré-tratadas com apiina e posteriormente submetidas ao estresse oxidativo. O tratamento inicial causou proteção contra o estresse causado pelo peróxido de hidrogênio, e o mesmo foi verificado na avaliação da retomada do crescimento após o tratamento com H₂O₂ (**Gráficos 9 e 10**). Isso não foi observado para as células expostas à apigenina, mostrando que a apiina apresentou maior efeito antioxidante do que a apigenina nas mesmas condições. Além disso, o teste de malondialdeído (MDA) mostrou diminuição da peroxidação lipídica quando as células foram pré-tratadas com apiina ou apigenina em ambas as concentrações, com um efeito maior no concentração de 0,1 mM (**Gráfico 11**). No entanto, o tratamento das células com os dois flavonoides não aumentaram o grau de proteção antioxidante, não mostrando sinergismo entre os dois compostos. Embora os testes de apigenina não mostrassem atividade antioxidante ou sinergismo com apiina, os resultados com extrato de salsa revelou ação antioxidante na viabilidade celular e no ensaio de peroxidação lipídica (**Gráficos 6 e 7**). Estes resultados sugerem que o sinergismo é responsável pelo potencial antioxidante do extrato aquoso de salsa, e que a apiina provavelmente contribui muito para essa atividade observada.

6. CONCLUSÕES

A obtenção do o extrato aquoso de folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum*, pelo método de decocção permitiu realizar o isolamento do flavonoide majoritário, e conseguinte ao processo de hidrólise ácida, o isolamento do flavonoide minoritário presente na amostra foi obtido com 90% de pureza, sendo ambos utilizados posteriormente para os ensaios biológicos.

Os dados obtidos do estudo da composição química do decocto das folhas de *Petroselinum crispum* var. *crispum*, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas, permitiu à identificação de vinte e sete flavonoides glicosilados com esqueleto de flavonas e flavonóis, sendo 7 destes compostos ainda não tendo sido relatado na literatura para a espécie em estudo.

Existem poucos relatos de estudos que apresentem os teores de fenólicos e flavonoides totais para *P. crispum* var. *crispum*, mas os resultados obtidos para o extrato de salsa crespa apresentaram teores semelhante ao já relatado para a espécie. A avaliação da capacidade atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP, também relatado poucas vezes na literatura, indicaram uma resposta positiva frente aos mecanismos de ação avaliados no combate aos radicais livres e através desses resultados pode-se observar uma correlação do potencial antioxidante com a presença do maior teor de compostos fenólicos e flavonoides.

Neste estudo, utilizamos um modelo em levedura de *S. cerevisiae*, semelhante às células de mamíferos para a avaliação antioxidante *in vivo*, não tendo sido relatados estudos da atividade antioxidante da salsa crespa em nenhum modelo celular até o momento. Cabe ressaltar que os resultados obtidos de peroxidação lipídica apresentaram que a apiina diminuiu em 46% a lesão das membranas das células em comparação as células estressada, além de ser possível uma resposta positiva em relação à capacidade antioxidante de extrato de salsa, através dos resultados obtidos. Diferentemente ao já relatado em literatura para ensaio *in vitro*, a apigenina não demosntrou efeito antioxidante no modelo *in vivo* estudado.

Os resultados apresentados neste trabalho são promissores sob o ponto de vista químico e medicinal, incentivando a continuidade dos experimentos a fim de aprofundar o conhecimento dos fitoconstituintes encontrados neste estudo e os mecanismos descritos

para flavonoides. Portanto, sugere-se que mais estudos sejam realizados para incrementar a busca por da correlação completa do seu potencial terapêutico antioxidante.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABAD-GARCIA B, BERRUETA LA, GARMON-LOBATO S, URKAREGI A, GALLO B, VICENTE F. Chemometric characterization of fruit juices from spanish cultivars according to their phenolic compound contents: I. Citrus fruits. *Journal of agricultural and food chemistry*. **2012**; 60(14):3635–44.

ABDULMANEA, K.; PROKUDINA, E. A.; LANKOVÁ, P.; VANÍCKOVÁ, L.; KOBLOVSKÁ, R.; ZELENÝ, V.; LAPCÍK, O. Immunochemical and HPLC identification of isoflavonoids in the Apiaceae Family. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2012**, 45, 237–243.

ABU-REIDAH, I.M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., AL-NURI, M., WARAD, I., SEGURA-CARRETERO, A. Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. *Food Chem.*, **2018**, 279, 128-143

ABU-SERIE, M. M.; HABASHY, N. H.; MAHER, A. M. *In vitro* anti-nephrotoxic potential of *Ammi visnaga*, *Petroselinum crispum*, *Hordeum vulgare*, and *Cymbopogon schoenanthus* seed or leaf extracts by suppressing the necrotic mediators, oxidative stress and inflammation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2019**, 19, 1, 1–16.

ACHAKZAI A.K.K., ACHAKZAI P., MASOOD A., KAYANI S.A., TAREEN R.B. Response of plant parts and age on the distribution of secondary metabolites on plants found in quetta. *Pakistan Journal of Botany*. **2009**, 41, 2129–2135.

AGUILAR DIAZ DE LEON, J., & BORGES, C. R. Evaluation of oxidative stress in biological samples using the thiobarbituric acid reactive substances assay. *Journal of Visualized Experiments*, **2020**, 159, e61122.

AHN-JARVIS, J.H.; A. PARIHAR, A.; DOSEFF, A. I. Dietary Flavonoids for Immunoregulation and Cancer: Food Design for Targeting Disease. *Antioxidants*, **2019**, 8, 1–30.

ALAM, M.N.; BRISTI, N. J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, **2013**, 21, 2, 143–152.

ALBANO, S. M., & MIGUEL, M. G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and Products*, **2011**, 33, 2, 338–343.

AL-JUHAIMI, F. & GHAFOR, K. Total phenols and antioxidant activities of leaf and stem extracts from coriander, mint and parsley grown in Saudi Arabia. *Pak. J. Bot.*, **2011**, 43 4, 2235-2237.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos para determinação da atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, **2010**, 33, 10, 2202-2210.

AL-YOUSOFY, F.; GUMAIH, H.; IBRAHIM, H.; A. ALASBAHY, A. Parsley! Mechanism as antiurolithiasis remedy. *Am. J. Clin. Exp. Urol.*, **2017**, 5, 55–62.

AMARAL, A. B.; SILVA, M. V.; LANNES, S.C. S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. *Food Sci. Technol*, **2018**, 38, 1, 1-15.

AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; RASTIJA, V.; LUCIC, B.; TRINAJSTIC, N. SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, **2007**, 14(7), 827–845.

ANCUCEANU R, ANGHEL AI, HOVANET MV, DINU MI, OLARU OT, DUNE AL, POPESCU, C. Variation of iron contents polyphenols and flavonoids in *Petroselinum crispum* (mill) fuss (Apiaceae). *Farmacia*, **2018**; 66: 275-81.

ANDRADE JUNIOR, D. R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.*, **2005**, 31, 1, 60-68

ANJOS, O.; FERNANDES, R.; CARDOSO, S.M.; DELGADO, T.; FARINHA, N.; PAULA, V.; ESTEVINHO, L.M.; CARPES, S.T. Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in black pudding. *LWT - Food Science and Technology*, **2019**, 111, 869–875.

ANTTONEN, M. J., & KARJALAINEN, R. O. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Black Currant (*Ribes nigrum* L.) Fruit Phenolics Grown either Conventionally or Organically. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 20, 7530–7538.

ARORA, A.; NAIR, M. G.; STRASBURG, G. M. Structure–Activity Relationships for Antioxidant Activities of a Series of Flavonoids in a Liposomal System. *Free Radical Biology and Medicine*, **1998**, 24, 9, 1355–1363.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutat. Res.*, **2003**. 523, 9 – 20.

AZWANIDA, N.N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Med Aromat Plants*, **2015**, 4, 3, 1000196.

BAKR, R.O.; EL-NAA, M.M.; ZAGHLOUL, S.S.; OMAR, M.M. Profile of bioactive compounds in *Nymphaea alba* L. leaves growing in Egypt: hepatoprotective, antioxidant and anti-inflammatory activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2017**, 17, 52, 1-13.

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev. Nutr.* **2010**, 23, 3, 629-643.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. *Química Nova*, **2006**, 29, 1, 113-123.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I.C.F.R. Phenolic profiles of in vivo and in vitro grown *Coriandrum sativum* L. *Food Chemistry*, **2012**, 132, 841–848.

BARROSO, M. F., NORONHA, J. P., DELERUE-MATOS, C., & OLIVEIRA, M. B. P. P. Flavored Waters: Influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 9, 5062–5072.

BASU P, MAIER C. In vitro antioxidant activities and polyphenol contents of seven commercially available fruits. *Phcog Res.*, **2016**, 8, 258-64.

BEGUM, N.; PRASAD, N., THAYALAN, K. Apigenin protects gamma-radiation induced oxidative stress, hematological changes and animal survival in whole body

irradiated Swiss albino mice. *International Journal of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases*, **2012**, 2, 1, 45.

BENAYAD, Z., GÓMEZ-CORDOVÉS, C., ES-SAFI, N. Characterization of Flavonoid Glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) Crude Seeds by HPLC–DAD–ESI/MS Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, **2014**, 15, 11, 20668–20685.

BENZIE, I. F. F., & DEVAKI, M. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity*, **2017**, 77–106.

BENZIE, I. F. F., & STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, **1996**, 239, 1, 70–76.

BESSADA, S.M.F.; BARREIRA, J.C.M.; BARROS, L.; FERREIRA, I.C.F.R.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. *Industrial Crops and Products*, **2016**, 89, 45–51.

BEZERRA, A.G.; NEGRI, G.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SMAILI, S.S.; CARLINI, E.A. Análise fitoquímica do extrato hidroetanólico de *Turnera diffusa* Willd e avaliação de seus efeitos na morte de astrócitos. *Einstein (Sao Paulo)*, **2016**, 14, 56–63.

BHATTI, J. S., BHATTI, G. K., & REDDY, P. H. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders — A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, **2017**, 1863, 5, 1066–1077.

BIANCHI, M.L.P. & ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev. Nutr.*, **1999**, 12, 2, 123- 130.

BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, **2008**, 108, 3, 1002–1007.

- BOLDIZSARA, I.; FUZFAIB, Z.; MOLNAR-PERLB, I. *Petroselinum crispum* glycosides: Determined by chromatography upon their sugar and flavonoid products. *Journal of Chromatography A*, **2013**, 1293, 100–106.
- BOUDET A. M. Evolution and current status of research of in phenolic compounds. *Phytochemistry*, **2007**, 68, 2722-2735.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, **1995**, 28, 1, 25–30.
- BRAT, P.; MENNEN, L.; GEORGÉ, S.; SCALBERT, A.; BELLAMY, A.; AMIOT-CARLIN, M.-J.; DU CHAFFAUT, L. Determination of the polyphenol content of fruits and vegetables. Establishment of a database and estimation of the polyphenol intake in the french diet. *Acta Horticulturae*, **2007**, 744, 61–70.
- BRAUER, M. J.; SALDANHA, A. J.; DOLINSKI, K.; BOTSTEIN, D. Homeostatic Adjustment and Metabolic Remodeling in Glucose-limited Yeast Cultures. *Molecular Biology of the Cell*, **2005**, 16, 5, 2503–2517.
- BUCKI, R.; PASTORE, J. J.; GIRAUD, F.; SULPICE, J. C.; JANMEY, P. A. Flavonoid inhibition of platelet proagulant activity and phosphoinositide synthesis. *J. Thromb. Haemost.*, **2003**, 1, 1820-1828.
- BURSAC, M., POPOVIC, M., MITIC, R., KAURINOVIC, B., JAKOVLJEVIC, V. Effects of Parsley (*Petroselinum crispum*) and Celery (*Apium graveolens.*) Extracts on Induction and Sleeping Time in Mice. *Pharmaceutical Biology*, **2005**, 43, 9, 780–783.
- BUTLER M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 12, 2141–2153.
- CAMPOS, K.E.; BALBI, A. P. C.; ALVES, M. J. Q. D. F. Diuretic and hipotensive activity of aqueous extract of parsley seeds (*Petroselinum sativum* Hoffm.) in rats. *Brazilian J. Pharmacogn.*, **2009**, 19, 41–45.
- CAMPOS, M.T. & LEME, F.O.P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial. *Pubvet, Medicina Veterinária e Zootecnia*, **2018**, 12, 1, 1-8.

- CANUTO, G. A. B.; XAVIER, A. G. O.; NEVES, L. C.; BENASSI, M. T. Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos da Amazônia e Sua Correlação Com a Atividade Anti-Radical livre. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, **2010**, 32, 1196-1205.
- CAPECKA, E., MARECZEK, A., & LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. *Food Chemistry*, **2005**, 93, 2, 223–226.
- CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Rev. Nutr.*, Campinas, **2011**, 24,1.
- CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **2008**, 8, 13, 1429.
- CENINI, G., LLORET, A., & CASCELLA, R. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**, 1–18.
- CHAVARRIA, D.F. Desenvolvimento de Novos Antioxidantes Lipofílicos como Solução Terapêutica para Doenças Neurodegenerativas. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em Bioquímica, **2014**.
- CHAVES, D.S.A.; FRATTANI, F.S.; MARIANE ASSAFIM, M.; ALMEIDA, A.P.; ZINGALI, R.B.; COSTA, S.S. Phenolic chemical composition of *Petroselinum crispum* extract and its effect on haemostasis. *Nat. Prod. Commun.*, **2011**, 6, 964–961.
- CHEN, C.H.; PEARSON, A.M.; GRAY, J.I. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds *Food Chemistry*, **1992**, 43, 177.
- CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, **2013**, 138, 414–420.
- CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.I H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quím. Nova*, 2008, 31, 3, 623-636
- CHOE, E.; MIN, D.B. Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, **2009**, 8,4, 345-358.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. "Review: flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources," *Journal of Nutritional Biochemistry*, **1996**, 7, 2, 66–76.

COSTA, V & FERREIRA-MORADAS Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, **2001**, 22, 4-5, 217–246.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; SANTOS, A. F.; ROCHA, T. J. M. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. *Cient. Ciênc. Biol. Saúde*. **2013**, 15, 3, 231-237.

COURTS, F. L., & WILLIAMSON, G. The Occurrence, Fate and Biological Activities of C-glycosyl Flavonoids in the Human Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2013**, 55, 10, 1352–1367.

CUNHA, A.L.; MOURA, K.S.; BARBOSA, J.C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. *Diversitas Journal*, **2016**, 1, 2, 175-181.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.*, **2005**, 26, 343-356.

CUYCKENS, F., & CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39, 1, 1–15.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; MASELLA, R. Bioavailability of the Polyphenols: Status and Controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, **2010**, 11,4, 1321–1342.

DAHLE, L. K.; HILL, E. G.; HOLMAN, R. T. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch. Biochem. Biophys.* **1962**, 98, 253-261.

DE OLIVEIRA, G., CARNEVALE NETO, F., DEMARQUE, D., DE SOUSA PEREIRA-JUNIOR, J., SAMPAIO PEIXOTO FILHO, R., DE MELO, S., ALMEIDA, J.R.G.S.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximiliani* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. *Planta Medica*, **2016**, 83, 07, 636–646.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, **2004**, 5, 1, 33-40.

DENG, J., CHENG, W., & YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, **2011**, 125, 4, 1430–1435.

DENG, G.-F.; LIN, X.; XU, X.-R.; GAO, L.-L.; XIE, J.-F.; LI, H.-B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of Functional Foods*, **2013**, 5, 260–266.

DEVIENNE, K.F.; RADDI, M.S.G.; POZETTI, G.L. Das plantas medicinais aos fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. **2004**, 6, 3, 11-14.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley & Sons, Ltd. **2002**, 2nd ed.

DOBRIČEVIĆ, N.; ŠIĆ ŽLABUR, J.; VOĆA, S.; PLIESTIĆ, S.; GALIĆ, A.; DELIĆ, A.; FABEK UHER, S. Bioactive compounds content and nutritional potential of different parsley parts (*Petroselinum crispum* Mill.). *Journal of Central European Agriculture*, **2019**, 20, 3, 900-910.

DOĞRU, Y. Z.; ERAT, M. Investigation of some kinetic properties of polyphenol oxidase from parsley (*Petroselinum crispum*, Apiaceae). *Food Research International*, **2012**, 49, 411–415.

DOMON, B., COSTELLO, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate J.*, **1988**, 5, 397–409

ĐORĐEVIĆ, N., TODOROVIĆ, N., NOVAKOVIĆ, I., PEZO, L., PEJIN, B., MARAŠ, V., TEŠEVIĆ, V.V.; PAJOVIĆ, S. Antioxidant Activity of Selected Polyphenolics in Yeast Cells: The Case Study of Montenegrin Merlot Wine. *Molecules*, **2018**, 23, 8, 1971.

DORMAN, H. J. D.; LANTTO, T. A.; RAASMAJA, A.; HILTUNEN, R. Antioxidant, pro-oxidant and cytotoxic properties of parsley. *Food & Function*, **2011**, 2, 6, 328.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T. T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F.; NAGEM, T. J. Flavonoides: potencial terapêutica no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, **2007**, 28, 3, 241 – 249.

DUPONT, M. S.; MONDIN, Z.; WILLIAMSON, G.; PRICE, K. R. Effect of Variety, Processing, and Storage on the Flavonoid Glycoside Content and Composition of Lettuce and Endive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 9, 3957–3964.

EL-SAYED, M.M.; METWALLY, N.H.; IBRAHIM, I.A.; ABDEL-HADY, H.; ABDEL-WAHAB, B.S.A. Antioxidant Activity, total phenolic and flavonoid contents of *Petroselinum crispum* Mill. *Journal of Applied Life Sciences International*, **2018**, 19, 2, 1-7.

EL-ZAEDDI, H., CALÍN-SÁNCHEZ, Á., NOWICKA, P., MARTÍNEZ-TOMÉ, J., NOGUERA-ARTIAGA, L., BURLÓ, F., WOJDYŁO, A.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Preharvest treatments with malic, oxalic, and acetylsalicylic acids affect the phenolic composition and antioxidant capacity of coriander, dill and parsley. *Food Chemistry*, **2017**, 226, 179–186.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. *J. of Functional Foods*. **2015**, 18 (B), 811-819.

EPIFANIO, N. M. DE M., CAVALCANTI, L. R. I., DOS SANTOS, K. F., DUARTE, P. S. C., KACHLICKI, P., OZAROWSKI, M., RIGER, C.J.; CHAVES, D. SIQUEIRA DE ALMEIDA. Chemical characterization and antioxidant activity in vivo of parsley (*Petroselinum crispum*) aqueous extract. *Food & Function*, **2020**, 11(6):5346-5356.

ERLEJMAN, A. G.; VERSTRAETEN, S. V.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. The Interaction of Flavonoids with Membranes: Potential Determinant of Flavonoid Antioxidant Effects. *Free Radical Research*, **2004**, 38,12, 1311–1320.

EZER, N. & ARISAN, Ö.M. Folk Medicines in Merzifon (Amasya, Turkey). *Turk. J. Botany*, **2006**, 30, 223–230.

FARAH, H.; ELBADRAWY, E.; AL-ATOOM, A.A. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extracts of Parsley (*Petroselinum crispum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*) plants grown in Saudi Arabia. *International Journal of Advanced Research*, **2015**, 3, 4, 1244-1255.

FARZAEI M. H., ABBASABADI Z., REZA SHAMS M. R., RAHIMI R., FARZAEI F. Parsley: a review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J Tradit Chin Med.*, **2013**, 33, 6, 815-826.

- FARZAEI, M. H.; ABBASABADI, Z.; REZA, S. M. R.; RAHIMI, R.; FARZAEI, F. Parsley: review of ethnopharmacology, phytochemistry and biological activities. *J. Tradit. Chin. Med.*, **2013**, 33, 6, 815-826.
- FEENEY, M. B., & SCHÖNEICH, C. Tyrosine Modifications in Aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, **2012**, 17, 11, 1571–1579.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, **1997**, 43, 1, 61-68.
- FERRERES, F., GIL-IZQUIERDO, A., VINHOLES, J., GROSSO, C., VALENTAO, P., & ANDRADE, P. B. Approach to the study of C-glycosyl acylated with aliphatic and aromatic acids from *Spergularia rubra* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization multistage mass spectrometry. *Mass spectrometry*, **2011**, 25, 700–712.
- FERRERES, F., LLORACH, R., GIL-IZQUIERDO, A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2004**, 39, 3, 312–321.
- FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq. do São Luís*. **2011**, 18, n. especial, dez.
- FÖRSTER, J.; FAMILI, I.; FU, P.; PALSSON, B. NIELSEN, J. Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. Forster, J. (2003). Genome-Scale Reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* Metabolic Network. *Genome Research*, **2003**, 13, 2, 244–253.
- GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Phenolic Compound Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, **2010**, 15, 8813-8826.
- GEBHARDT, Y. S.; FORKMANN, G.; LUKACIN, R.; MATERN, U.; MARTENS, S. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family *Apiaceae*. *Phytochemistry*. **2005**, 66, 1273.

GEBHARDT, Y. H.; WITTE, S.; STEUBER, H.; MATERN, U.; MARTENS, S. Evolution of Flavone Synthase I from Parsley Flavanone 3-beta-Hydroxylase by Site-Directed Mutagenesis. *Plant Physiology*, **2007**, 144, 3, 1442–1454.

GRAILLE, M.; WILD, P.; SAUVAIN, J.; HEMMENDINGER, M.; CANU, I.G.; HOPF, N.B. Urinary 8-OHdG as a Biomarker for Oxidative Stress: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21, 3743.

GROSS, J.H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer, **2017**. 3rd Edition, 968.

GROTTO, D., MARIA, L. S., VALENTINI, J., PANIZ, C., SCHMITT, G., GARCIA, S. C., POMBLUM, V.J.; ROCHA, J.B.T.; FARINA, M. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*, **2009**, 32,1, 169–174.

GUO J. D., ZHAO X., LI Y., LI G. R., LIU X. L. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease. *Int. J. Mol. Med.*, **2018**, 41, 1817–1825.

GUO, C.; SUN, L.; CHEN, X.; ZHANG, D. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.*, **2013**, 8, 21, 2003–2014.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, **2006**, 1–93.

HÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J. P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 10, 3954-3962.

HAHLBROCK, K.; SUTTER, A.; WELLMANN, E.; ORTMANN, R.; GRISEBACH, H. Relationship between organ development and activity of enzymes involved in flavone glycoside biosynthesis in young parsley plants. *Phytochemistry*, **1971**, 10, 109-116.

H Aidaria F.; Keshavarzb S. A.; Shahia M. M.; Mahboobc S.; Rashidid, M. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) and its flavonol constituents, kaempferol and quercetin, on serum uric acid levels, biomarkers of oxidative stress and liver xanthine oxidoreductase activity in oxonate-induced hypericemic rats. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **2011**, 10, 4, 811-819.

HAN, J.-Y.; AHN, S.-Y.; KIM, C.-S.; YOO, S.-K.; KIM, S.-K.; KIM, H.-C.; HONG,

- HAN, J.-Y., AHN, S.-Y., KIM, C.-S., YOO, S.-K., KIM, S.-K., KIM, H.-C., HONG, J.T., OH, K.-W. Protection of Apigenin against Kainate-Induced Excitotoxicity by Antioxidative Effects. *Biol. Pharm. Bull.*, **2012**, 35, 1440–1446.
- HARBORNE, J. B. Characterisation of flavonoid glycosides by acidic and enzymic hydrolysis. *Phytochemistry*, **1965**, 4, 107-120.
- HEIM, K. E., TAGLIAFERRO, A. R., & BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, **2002**, 13, 10, 572–584.
- HEMPEL J, PFORTE H, RAAB B, ENGST W, BOHM H, JACOBASH G. Flavonols and flavones of parsley cell suspension culture change the antioxidative capacity of plasma in rats. *Nahrung*, **1999**; 43: 201-204.
- HERMAN, P. K. Stationary phase in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, **2002**, 5, 6, 602–607.
- HERTOG, M. G. L., HOLLMAN, P. C. H., & VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40, 1591–1598.
- HIDALGO, M., SÁNCHEZ-MORENO, C., DE PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, **2010**, 121, 3, 691–696.
- HINNEBURG, I.; DAMIEN DORMAN, H. J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 1, 122-129.
- HIRANO, R., SASAMOTO, W., MATSUMOTO, A., ITAKURA, H., IGARASHI, O., KONDO, K. Antioxidant Ability of Various Flavonoids against DPPH Radicals and LDL Oxidation. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, **2001**, 47, 5, 357–362.
- HOFFMANN, E.& STROOBANT, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd., **2007**, 3rd Edition, 502.
- HUANG, D.; OU, B.; PRI, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 6, 1841–1856.

HUANG, M.-H.; WANG, B.-S.; CHIU, C.-S.; AMAGAYA, S.; HSIEH, W.-T.; HUANG, S.-S.; SHIE, P.-H.; HIANG, G.-J. Antioxidant, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of *Xanthii Fructus* Extract. *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 135, 545–552.

HUBER, L. S.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; RIBANI, R. H. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. *Food Chemistry*, **2009**, 113, 4, 1278-1282.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. *Alim. Nutr.*, **2008**, 19, 1, 97-108.

HVATTUM, E., & EKEBERG, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **2003**, 38, 1, 43–49.

ILYASOV, I.R.; BELOBORODOV, V.L.; SELIVANOVA, I.A.; TEREKHOV, R.P. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 1131, 1-27.

IWASHINA, T.; SMIRNOV, S.V.; DAMDINSUREN, O.; KONDO, K. *Saussurea* Species from the Altai Mountains and Adjacent Area, and Their Flavonoid Diversity. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.*, **2010**, Ser. B, 36, 4, 141–154.

JABEEN, S.; ASIF, H. M.; MUMTAZ, K. M.; KHAN, Q. R. W. Natural products sources and their active compounds on disease prevention: A Review. *IJCBS*, **2014**, 6, 76-83.

JACOB, V.; HAGAI, T.; SOLIMAN, K. Structure-Activity Relationships of Flavonoids. *Current Organic Chemistry*, **2011**, 15, 15, 2641–2657.

JIMÉNEZ-ALIAGA, K.; BERMEJO-BESCÓS, P.; BENEDÍ, J.; MARTÍN-ARAGÓN, S. Quercetin and rutin exhibit antiamyloidogenic and fibril-disaggregating effects in vitro and potent antioxidant activity in APP_{swe} cells. *Life Sciences*, **2011**, 89,25-26, 939–945.

JUSTESEN, U. & KNUTHSEN, P. Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, **2001**, 73,245-250.

KACHLICKI, P., PIASECKA, A., STOBIECKI, M., & MARCZAK, Ł. Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques. *Molecules*, **2016**, 21, 11, 1494.

KAISER, A., CARLE, R., & KAMMERER, D. R. Effects of blanching on polyphenol stability of innovative paste-like parsley (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym ex A. W. Hill) and marjoram (*Origanum majorana* L.) products. *Food Chemistry*, **2013**, 138, 2-3, 1648–1656.

KARKLELIENĖ, R.; DAMBRAUSKIENĖ, E.; JUŠKEVIČIENĖ, D., RADZEVIČIUS, A., RUBINSKIENĖ, M., VIŠKELIS, P. Productivity and nutritional value of dill and parsley. *Horticultural Science (Prague)*, **2014**, 41, 3, 131–137.

KASHYAPA, D.; SHARMAB, A.; TULIC, H. S.; SAKD, K.; GARGE, V. K.; BUTTARF, H. S.; SETZERG, W. N.; SETHI, G. Apigenin: A natural bioactive flavone-type molecule with promising therapeutic function. *Journal of Functional Foods*, **2018**, 48, 457–471.

KASOTE, D.M.; KATYARE, S.S.; HEGDE, M. V.; BAE, H. Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications. *International Journal of Biological Sciences*, **2015**, 11, 8, 982–991.

KATERJI, M., FILIPPOVA, M., & DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2019**, 1–29.

KHOUBNASABJAFARI, M., ANSARIN, K., JOUYBAN, A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BioImpacts*, **2015**, 5, 3, 123–127.

KHURANA, V.; & LINDQUIST, S. Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nature Reviews Neuroscience*, **2010**, 11, 6, 436–449.

KNEKT P, JARVINEN R, REUNANEN A, MAATELA J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ*. **1996**, 312, 7029, 478-481.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, **2011**, 89, 3, 217–233.

KUDRYAVTSEVA, A.V.; KRASNOV, G.S.; DMITRIEV, A.A.; ALEKSEEV, B.Y.; KARDYMON, O.L.; SADRITDINOVA, A.F.; FEDOROVA, M.S.; POKROVSKY, A.V.; MELNIKOVA, N.V.; KAPRIN, A.D.; MOSKALEV, A.A.; SNEZHKINA, A.V. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*, **2016**, 7, 29, 44879-44905.

KUMAR, B.R. Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *J. Pharm. Anal.* **2017**, 7, 6, 349-364.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Scientific World Journal*, **2013**, 1627-50.

LECHTENBERG, M.; ZUMDICK, S.; GERHARDS, C.; SCHIMDT, T.J.; HENSEL, A. Evaluation of analytical markers characterising different drying methods of parsley leaves (*Petroselinum crispum* L.). *Pharmazie*, **2007**, 62, 12, 949-954.

LESPADE, L.& BERCIÓN, S. Theoretical investigation of the effect of sugar substitution on the antioxidant properties of flavonoids. *Free Rad. Res.*, **2012**, 46, 346–58.

LIN, L.-Z.; LU, S.; HARNLY, J.M. Detection and Quantification of Glycosylated Flavonoid Malonates in Celery, Chinese Celery, and Celery Seed by LC-DAD-ESI/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 1321-1326.

LIU, F., XU, Y., HUANG, J., GAO, S., & GUO, Q. Sensitive liquid chromatography/mass spectrometry assay for the quantification of azithromycin in human plasma. *Biomedical Chromatography*, **2007**, 21, 12, 1272–1278.

LOTITO, S. B.; FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: Cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology & Medicine*, **2006**, 41, 1727–1746.

LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress in yeast. *Biochemistry (Moscow)*, **2010**, 75, 3, 281–296.

LUTHRIA, D. L., MUKHOPADHYAY, S., KWANSA, A. L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, 86, 9, 1350–1358.

LUTHRIA, D. L.; Influence of experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using a pressurized liquid extractor. *Food Chemistry*, **2008**, 107, 745-752.

LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KWANSA, A. L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, 86, 9, 1350–1358.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Quimica Nova*, **2009**, 32, 4, 946-949.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, **2008**, 613, 1, 1-19.

MAGER, W. H.; & WINDERICKX, J. Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends in Pharmacological Sciences*, **2005**, 26, 5, 265–273.

MAJEWSKA, M. SKRZYCKI, M.; PODSIAD, M.; CZECZOT, H. Evaluation of antioxidant potential of flavonoids: an *in vitro* study *Acta. Pol. Pharm.*, **2011**, 68, 4, 611-615.

MARKHAM, K. R. & ANDERSEN, O. M. Separation and quantification of flavonoids. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. Ed. CRC Press. **2006**. Cap.1.

MATIOLLI, L.S. Avaliação da citotoxicidade e atividade antioxidante de plantas condimentares. Dissertação (mestrado) em Biociências. FCLAS- Universidade Estadual Paulista, **2014**, 115p.

- MENDES, M. D. S. Caracterização química e molecular de espécies das famílias Lamiaceae e Apiaceae da flora aromática de Portugal. Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia, Universidade de Lisboa, **2007**.
- MERKEN, H. M., & BEECHER, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 3, 577–599.
- MEYER, H., BOLARINWA, A., WOLFRAM, G., LINSEISEN, J. Bioavailability of Apigenin from Apiin-Rich Parsley in Humans. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **2006**, 50, 3, 167–172.
- MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*. **2000**, 52, 673.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* **2004**. 85, 2, 231-237.
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: a evolving role in future drug Discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 4769–4807.
- MONTANARI, C.A. & BOLZANI, V.S. Planejamento Racional de Fármacos Baseado em Produtos Naturais. *Quim. Nova*, **2001**, 24, 1, 105-111.
- MORANO, K. A.; GRANT, C. M.; MOYE-ROWLEY, W. S. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **2011**, 190, 4, 1157–1195.
- MUKAI R. & TERAOKA J. Role of dietary flavonoids in oxidative stress and prevention of muscle atrophy. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, **2013**, 2, 385-392
- NAGULA, R. L.; WAIRKAR, S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. *Journal of Controlled Release*, **2019**, 296, 190–201.
- NEGRI, G.; SANTI, D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2012**, 22,5,1024-1034.

- NEHA, K.; HAIDER, M. R.; PATHAK, A.; YAR, M. S. Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2019**, 178, 687-704.
- NEWMAN, D.J.; CRAG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661.
- NEWMAN, D.J.; CRAG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, 83, 3, 770-803.
- NIELSEN, S.E.; YOUNG, J.F.; DANESHVAR, B.; LAURIDSEN, S.T.; KNUTHSEN, P.; SANDSTRON, B.; DRAGSTE, L. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. *Br J Nutr.*, **1999**, 81, 6, 447-455.
- NUTTILA A. M.; KAMMIOVIRTA K.; OKSMAN-CALDENTEY K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*. **2002**, 76, 519–525.
- OCK, C.-Y.; KIM, E.-H.; CHOI, D.J.; LEE, H.J.; HAHM, K.-B.; CHUNG, M.H. 8-Hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol.*, **2012**, 18, 4, 302-308.
- OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2. ed. Atheneu Editora., **2003**, 39-55
- OHADOMA, S. C.; AKAH, P. A.; OKOLO, C. E. Isolation and characterization of flavonol glycosides from leaves extract of *Lupinus arboreus* sims. *UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences*, **2016**, 4, 3, 06-09.
- OZAROWSKI, MARCIN, PIASECKA, ANNA, PASZEL-JAWORSKA, ANNA, CHAVES, DOUGLAS SIQUEIRA DE A., ROMANIUK, ALEKSANDRA, RYBCZYNSKA, MARIA, GRYSZCZYNSKA, AGNIESZKA, SAWIKOWSKA, ANETA, KACHLICKI, PIOTR, MIKOLAJCZAK, PRZEMYSŁAW L., SEREMAK-MROZIKIEWICZ, AGNIESZKA, KLEJEWSKI, ANDRZEJ, & THIEM, BARBARA. Comparison of bioactive compounds content in leaf extracts of *Passiflora incarnata*, *P. caerulea* and *P. alata* and *in vitro* cytotoxic potential on leukemia cell lines. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2018**, 28, 2, 179-191.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. Journal of Nutritional Science, **2016**, 5, 47, 1-15.

PANDEY, A.; TRIPATHI, S. Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. Journal of Pharmacy Phytochemistry, **2014**, 2, 5, 115-9.

PAPASTERGIADIS, A.; MUBIRU, E.; LANGENHOVE, H.V.; MEULENAER. B. Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods. J. Agric. Food Chem. **2012**, 60, 9589–9594.

PÁPAY, Z. E.; KÁLLAI-SZABÓ, N.; LUDÁNYI, K.; KLEBOVICH, I.; ANTAL, I. Development of oral site-specific pellets containing flavonoid extract with antioxidant activity. European Journal of Pharmaceutical Sciences, **2016**, 95, 161–169.

PAPAY, Z.E. & ANTAL, I. Study on the antioxidant activity during the formulation of biological active ingredient. European Scientific Journal, **2014**, Specialedition, 3, 252 – 257

PAPUC, C.; PREDESCU, C.; NICORESCU, V, STEFAN, G.; NICORESCU, I. Antioxidant Properties of a Parsley (*Petroselinum crispum*) Juice Rich in Polyphenols and Nitrites. Curr Res Nutr Food Sci., **2016**, 4 (Special Issue Confernce).

PAREJO, I., JÁUREGUI, O., VILADOMAT, F., BASTIDA, J., & CODINA, C. Characterization of acylated flavonoid-O-glycosides and methoxylated flavonoids from *Tagetes maxima* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, **2004**, 18, 23, 2801–2810.

PATEL, K.; KUMAR, V.; RAHMAN, M.; VERMA, A.; PATEL, D. K. New insights into the medicinal importance, physiological functions and bioanalytical aspects of an important bioactive compound of foods ‘Hyperin’: Health benefits of the past, the present, the future. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences. **2018**, 7, 31–42.

PATRA, B.; SCHLUTTENHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1829, **2013**, 1236–1247.

PATWARDHAN, B.; WARUDE, D.; PUSHPANGADAN, P.; BHATT, N. Ayurveda and Traditional Chinese medicine: a comparative overview. *Evid Based Comple. Alter Med.* 2, **2005**, 465-473.

PEREIRA, D.M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P. Phenolics: From Chemistry to Biology, *Molecules*, **2009**, 14, 6, 2202-2211.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. *J. Biotech. Biodivers.*, **2012**, 3, 4, 146-152.

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

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 1035-1042.

PRIECINA, L. & KARKLINA, D. Natural Antioxidant Changes in Fresh and Dried Spices and Vegetables. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Nutrition and Food Engineering*, **2014**, 8, 5, 492-496.

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*, **2005**, 53, 10, 4290–4302.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4290–4302.

PROBST, Y. C.; GUAN, V. X.; KENT, K. Dietary phytochemical intake from foods and health outcomes: a systematic review protocol and preliminary scoping. *BMJ Open*, **2017**, 7, 2, e013337.

PROCHÁZKOVÁ, D., BOUŠOVÁ, I., & WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.*, **2011**, 82, 4, 513–523.

QUETTIER-DELEU, C., GRESSIER, B., VASSEUR, J., DINE, T., BRUNET, C., LUYCKX, M., CAZIN, M.; CAZIN, J.-C.; BAILLEUL, F.; TROTIN, F. Phenolic

compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, **2000**, 72, 1-2, 35–42.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSÉGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **2011**, 50, 3, 586–621.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and medicine*, **1999**, 26, 9-10, 1231–1237.

REKHI, H., RANI, S., SHARMA, N., & MALIK, A. K. A Review on Recent Applications of High-Performance Liquid Chromatography in Metal Determination and Speciation Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2017**, 47,6, 524–537.

RICE-EVANS, C., & MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Oxygen Radicals in Biological Systems Part D*, **1994**, 279–293.

RIGER, C.J.; FERNANDES, P.N.; VILELA, L.F.; MIELNICZKI-PEREIRA, A.A.; BONATTO, D.; HENRIQUES, J.A.P.; ELEUTHERIO, E.C.A. Evaluation of heavy metal toxicity in eukaryotes using a simple functional assay. *Metallomics*. *Metallomics*, **2011**, 3, 1355–1361.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids—A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2010**, 23, 7, 726–740.

ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: a new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology*. **2011**, 48, 35–48.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MANCINI FILHO, J.; MOREIRA, A. V. B. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas no sistema b-caroteno/ácido linoleico. Fortaleza: Embrapa, **2006**. (Comunicado Técnico).

SADOWSKA-BARTOSZ, I., PAĆZKA, A., MOŁOŃ, M., & BARTOSZ, G. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **2013**, 13(8), 820–830.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; PAĆZKA, A.; MOŁOŃ, M.; BARTOSZ, G. Dimethyl sulfoxide induces oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, **2013**, 13, 8, 820–830.

SALEH, H. A.-R.; EL-NASHAR, Y. I.; SERAG-EL-DIN, M. F.; DEWIR, Y. H. Plant growth, yield and bioactive compounds of two culinary herbs as affected by substrate type. Scientia Horticulturae, **2019**, 243, 464–471.

SANTOS, T. N.; COSTA, G.; FERREIRA, J. P.; LIBERAL, J.; FRANCISCO, V.; PARANHOS, A.; CRUZ, M.T.; CASTELO-BRANCO, M.; FIGUEIREDO, I.V.; BATISTA, M. T. Antioxidant, anti-Inflammatory, and analgesic activities of *Agrimonia eupatoria* L. infusion. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, **2017**, 1–13.

SATHISHKUMAR T; BASKAR R; SHANMUGAM, S. Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tabernaemontana heyneana* Wall. using L16 orthogonal design. Nat. Sci., **2008**, 6, 3, 10-19.

SAYED-AHMADA, B.; TALOUA, T.; SAADB, Z.; HIJAZIB, A.; MERAHA, O. The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses Industrial Crops & Products, **2017**, 109, 661–671.

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

SHARMA A.K.; GANGWAR M.; CHTAURVEDI A.P.; SINHA A.S.K.; TRIPATHI Y.B. Comparative analysis of phenolic and flavonoid content of *Jatropha curcas* L. Plant Archives. **2012**, 12, 823–826.

SHARMA, K., & MULLANGI, R. A concise review of HPLC, LC-MS and LC-MS/MS methods for determination of azithromycin in various biological matrices. Biomedical Chromatography, **2013**, 27,10, 1243–1258.

SHARMA, K.S. Mass spectrometry—The early years. International Journal of Mass Spectrometry, **2013**, 349– 350, 3– 8.

SHUKLA S. & GUPTA S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm. Res.*, **2010**, 27, 6, 962–978.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **1997**, 82, 2, 291–295.

SLIMESTAD, R. FOSSEN, T.; BREDE, C. Flavonoids and other phenolics in herbs commonly used in Norwegian commercial kitchens. *Food Chem.*, **2020**, 309:125678.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2005**, 41, 1,

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **2005**, 41, 1.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Rev. Bras. Farm.*, **2004**, 85, 2, 45-47.

SÓJKA, M., GUYOT, S., KOŁODZIEJCZYK, K., KRÓL, B., BARON, A., Composition and properties of purified phenolics preparations obtained from an extract of industrial blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) pomace. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, **2009**, 100-106

SOTO-HERNÁNDEZ, M.; PALMA-TENANGO, M.; GARCÍA-MATEOS, M.R. Phenolic Compounds - Biological Activity, InTechOpen, Croatia, **2017**, 236p.

SPENCER, J. Food for thought: The role of dietary flavonoids in enhancing human memory, learning and neuro-cognitive performance: Symposium on ‘Diet and mental health’. *Proceedings of the Nutrition Society*, **2008**, 67, 2, 238-252.

SPENCER, J. P. E. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr.*, **2009**, 4, 243–250.

STEELS, E.L. LEARMONTH’, R.P.; WATSON, K. Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiol.*, **1994**, 140, 569-576.

STOBIECKI, M., KACHLICKI, P., & WOJAKOWSKA, A. Application of LC/MS systems to structural characterization of flavonoid glycoconjugates. *Phytochemistry Letters*, **2015**, 11, 358–367.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 3, 607–616.

SUHAJ, M. Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review. *J. of Food C. and Analysis*, **2006**, 19.6-7, 531-537.

TAN, B.L.; NORHAIZAN, M.E.; LIEW, W.P.P.; SULAIMAN RAHMAN, H. Antioxidant and Oxidative Stress: A Mutual Interplay in Age-Related Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, **2018**, 9, 1–28.

TANG, E. L.; RAJARAJESWARAN, J.; FUNG, S.Y.; KANTHIMATHI, M. S. *Petroselinum crispum* has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. *J. Sci. Food Agric.*, **2015**, 95, 2763–2771.

TANG, E.L.-H.; RAJARAJESWARAN, J.; FUNG, S.; KANTHIMATHI, M. *Petroselinum crispum* has antioxidant properties, protects against DNA damage and inhibits proliferation and migration of cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2015**, 95, 13, 2763–2771.

TELANG, D. R., PATIL, A. T., PETHE, A. M., FEGADE, H., ANAND, S., & DAVE, V. S. Formulation and characterization of an apigenin-phospholipid phytosome (APLC) for improved solubility, *in vivo* bioavailability, and antioxidant potential. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2017**, 108, 36–49.

TIVERON, A.P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, **2010**, 103p

TIWARI R.; RANA C. S. Plant secondary metabolites: a review. *International Journal of Engineering Research and General Science*. **2015**, 3, 5.

TLILI, I., HDIDER, C., LENUCCI, M. S., ILAHY, R., JEBARI, H., DALESSANDRO, G. Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2011**, 24, 307-314.

TOSCANO RICO, J. M. Plantas Medicinai. Academia das Ciências de Lisboa, Instituto de Estudos Acadêmicos para Seniores, Lisboa, **2011**.

TRIFUNTSCHI, S. & ARDELEAN, D. Quantification of phenolics and flavonoids from *Petroselinum crispum* extracts. *Jurnal Medical Aradean (Arad Medical Journal)*, **2012**, XV, 1-4, 83-86.

TUPE, R.S.; KEMSE, N.G.; KHAIRE, A.A. Evaluation of antioxidant potentials and total phenolic contents of selected Indian herbs powder extracts. *International Food Research Journal*, **2013**, 20, 3, 1053-1063.

UDENSI, U. K. & TCHOUNWOU, P. B. Oxidative stress in prostate hyperplasia and carcinogenesis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, **2016**, 35, 1, 1–19.

VALKO M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **2007**, .39, 44-84.

VERMA N.; SHUKLA S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*. **2015**, 2,105–113.

VERSTRAETEN, S.V.; KEEN, C.L.; SCHMITZ, H.H.; FRAGA, C.G.; OTEIZA, P.I. Flavan-3-ols and procyanidins protect liposomes against lipid oxidation and disruption of the bilayer structure. *Free Radic Biol Med.*, **2003**, 34, 84–92.

WANG, M.; FIRRMAN, J.; LIU, L.; YAM, K. A review on flavonoid apigenin: dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota. *BioMed Research International, eCollection*, **2019**, Article ID 7010467, 18 pages.

WANG, S.; YANG, C.; TU, H.; ZHOU, J.; LIU, X.; CHENG, Y.; LUO, J.; DENG, X.; ZHANG, H.; XU, J. Characterization and Metabolic Diversity of Flavonoids in Citrus Species. *Nature: Scientific Reports*. **2017**, 7, 10549.

WANG, T.Y.; BI, Q. L. K.-S. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity, and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2018**, 13, 12–23.

WANG, S.; ALSEEKH, S.; FERNIE, A.R.; LUO, J. The Structure and Function of Major Plant Metabolite Modifications. *Molecular Plant*, **2019**, 12(7), 899-919

WATERMAN, P.G. & MOLE, S. Why are phenolic compounds so importante? In: WATERMAN, P.G.; MOLE, S. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Oxford Blackwell Scientific Publications, **1994**, 3, 44-65.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, **2001**, 126, 485.

WONG, A., XIANG, X., ONG, P., MITCHELL, E., SYN, N., WEE, I., KUMAR, A. P.; YONG, W.P.; SETHI, G.; GOH, B.C., HO, P. C.; WANG, L. A Review on Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods for Rapid Quantification of Oncology Drugs. *Pharmaceutics*, **2018**, 10(4), 221.

WONG, P.Y.Y. & KITTS, D.D. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. *Food Chem.*, **2006**, 97, 505–515.

WOOD, L.G.; GIBSON, P.G.; GARG, M.L. A review of the methodology for assessing *in vivo* antioxidant capacity. *J Sci Food Agric.*, **2006**, 86, 13, 2057–2066.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance?, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **2017**, 57, 9, 1874-1905.

XU, Y.; ZHANG, R.; FU, H. Studies on the optimal process to extract flavonoids from red-raspberry fruits. *Nature and Science*, **2005**, 3, 2, 43-46.

YILDIZ, F. *Physiologically Bioactive Compounds Advances in Food Biochemistry*. Middle East Technical University, Ankara, Turkey. **2009**, 1, 8, 243-247.

YOSHIDA, Y., UMENO, A., SHICHIRI, M. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity *in vivo*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, **2013**, 52, 1, 9–16.

YOSHIKAWA, M.; UEMURA, T.; SHIMODA, H.; KISHI, A.; KAWAHARA, Y.; MATSUDA, H.; Medicinal foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the aerial parts of *Petroselinum crispum* MILL. (Parsley) and structures of 6''- Acetylapiin and a new monoterpeno glycoside, petroside. Chemical Pharmaceutical Bulletin, **2000**, 48,7, 1039–1044.

ZENGIN, G., MAHOMOODALLY, M. F., PAKSOY, M. Y., PICOT-ALLAIN, C., GLAMOCILJA, J., SOKOVIC, M., DIUZHEVA, A.; JEKŐF, J.; CZIÁKYF, Z.; RODRIGUES, M.J.; KOUADIO IBRAHIME SINAN, K.I.; CUSTODIO, L. Phytochemical characterization and bioactivities of five Apiaceae species: Natural sources for novel ingredients. Industrial Crops and Products, **2019**,135, 107–121.

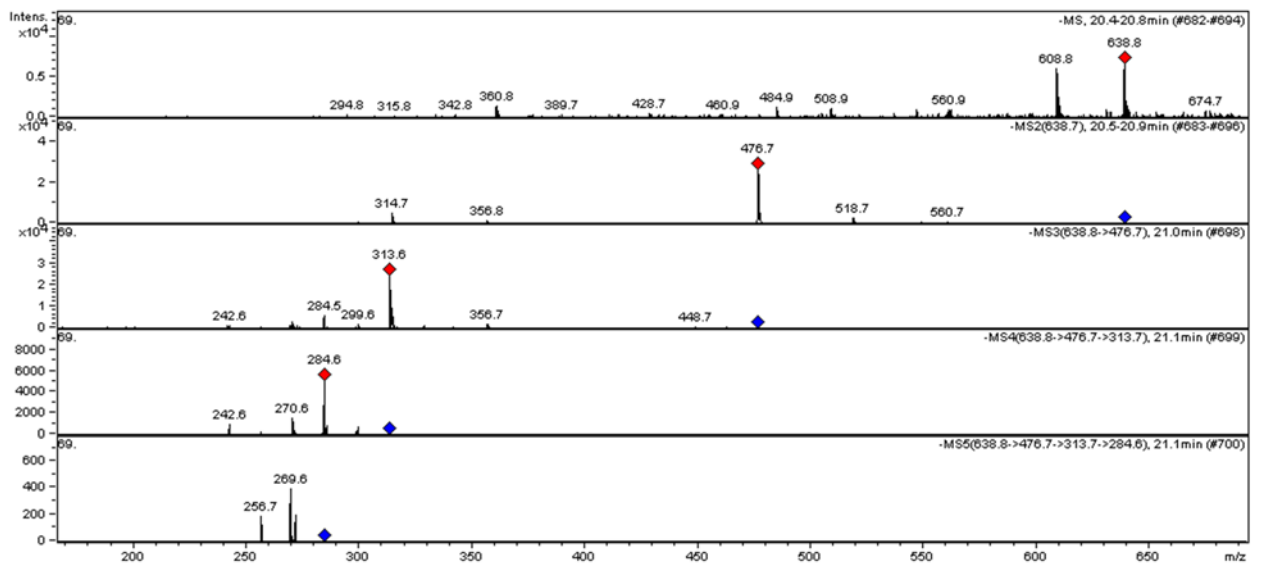
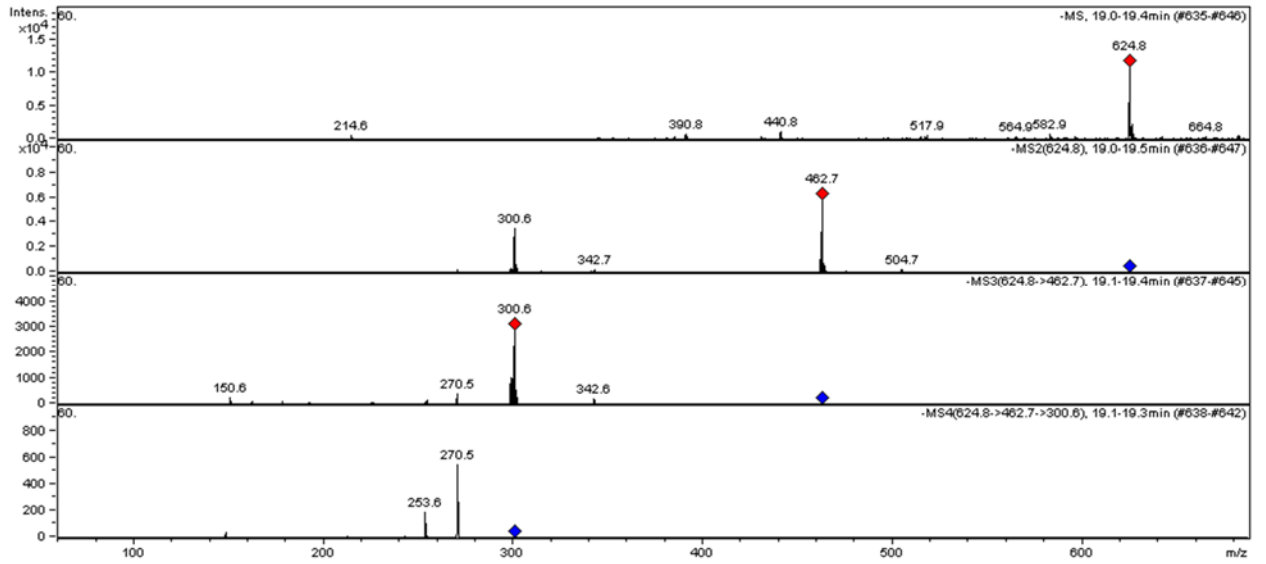
ZHANG, H.; CHEN, F.; WANG, X.; YAO, H.-Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. Food Research International, **2006**, 39, 8, 833–839.

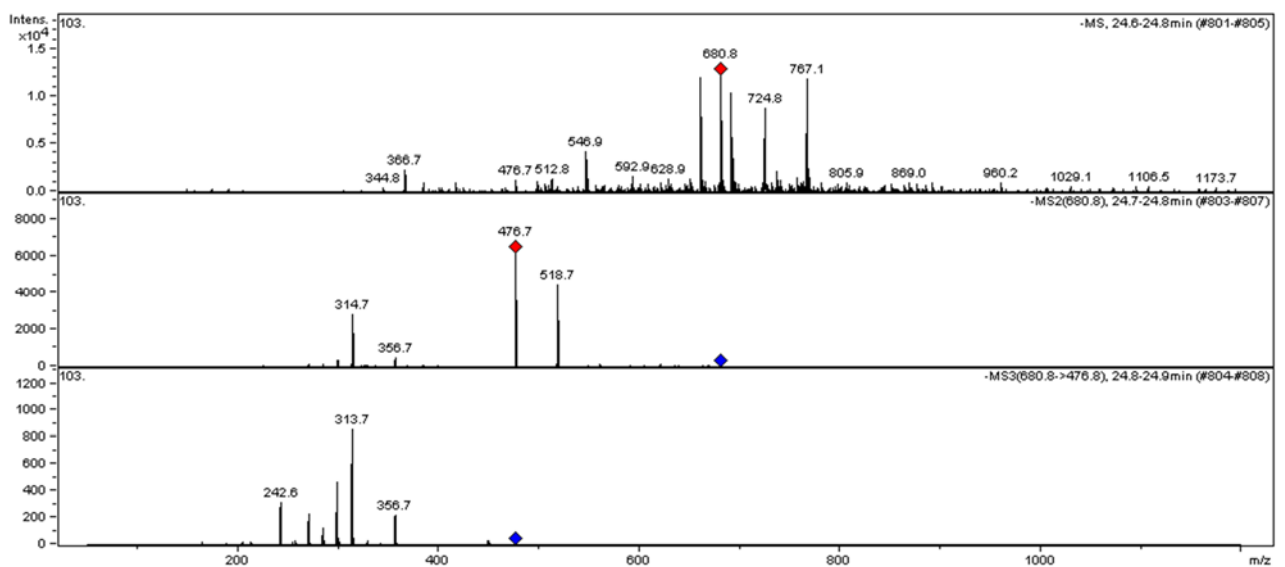
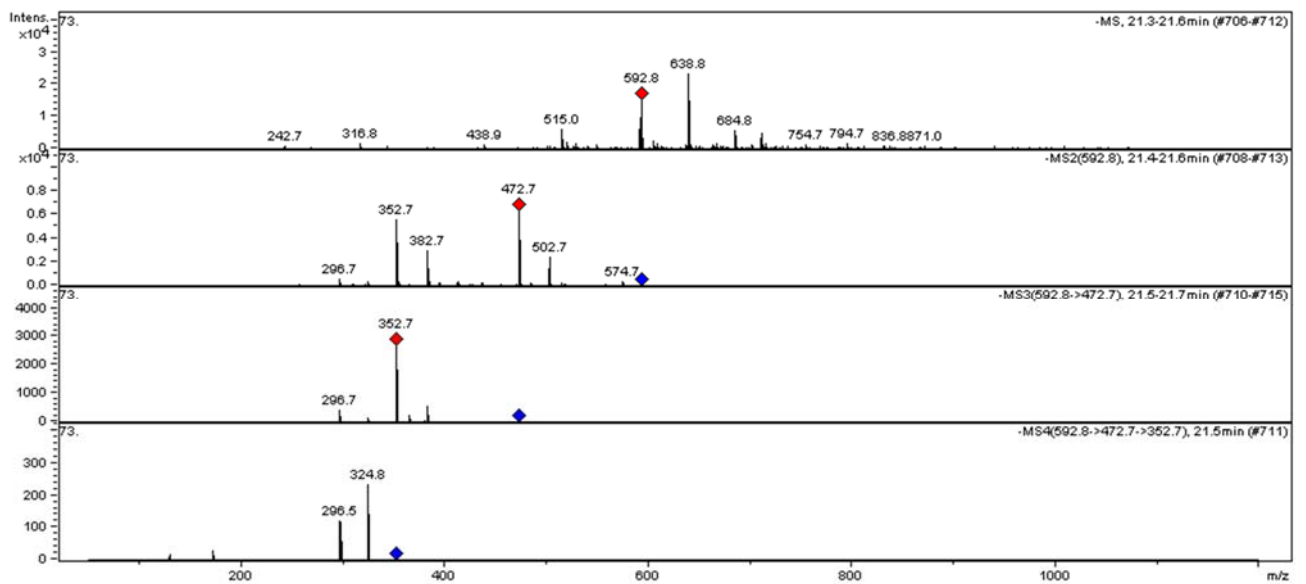
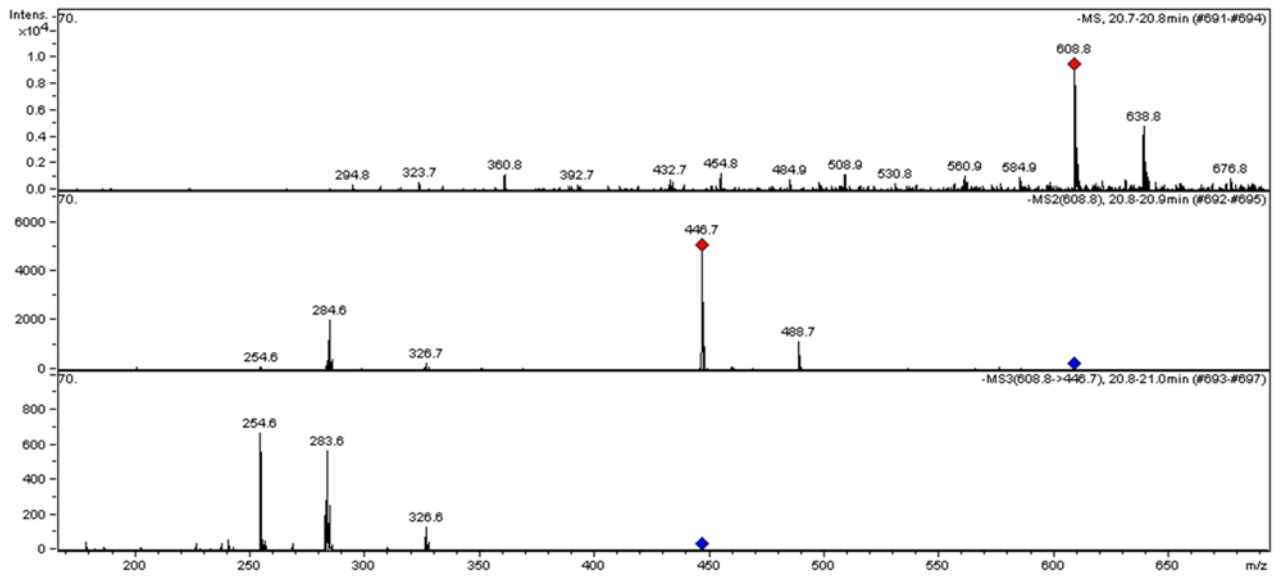
ZHANG, K.; ZHANG, K.J.; GAO, Z.-G.; ZHANG, D.; ZHU, L.; HAN, G.W.; MOSS, S.M.; PAOLETTA, S.; KISELEV, E.; LU, W.; FENALTI, G.; ZHANG, W.; MULLER, C.E.; YANG, H.; JIANG, H.; CHEREZOV, V.; KATRITCH, V.; JACOBSON, K.A.; STEVENS, R.C.; WU, B.; ZHAO, Q. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. Nature, 2014, **509**, 115–118.

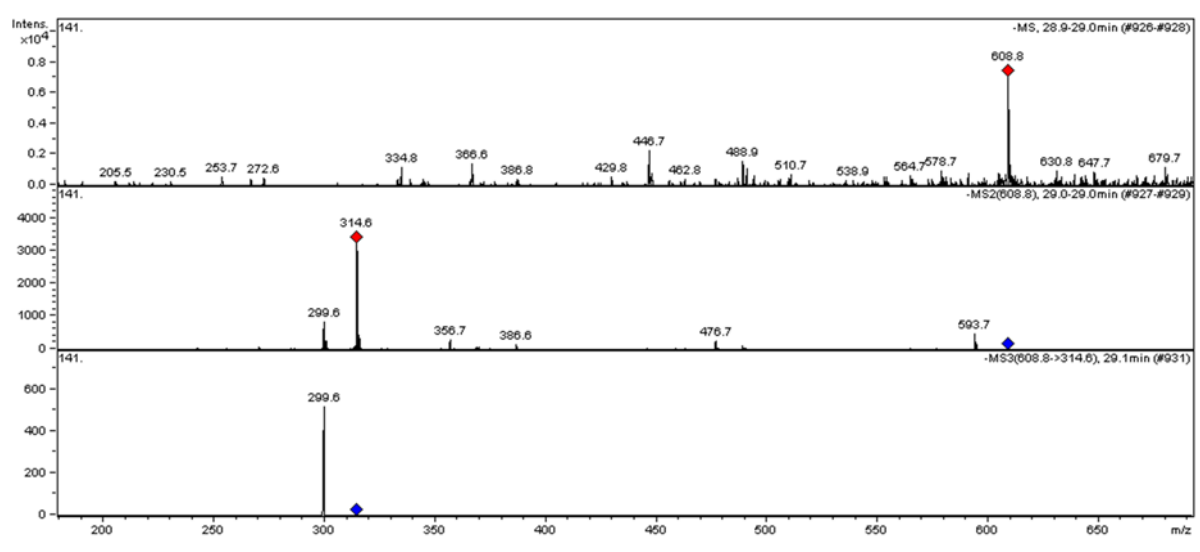
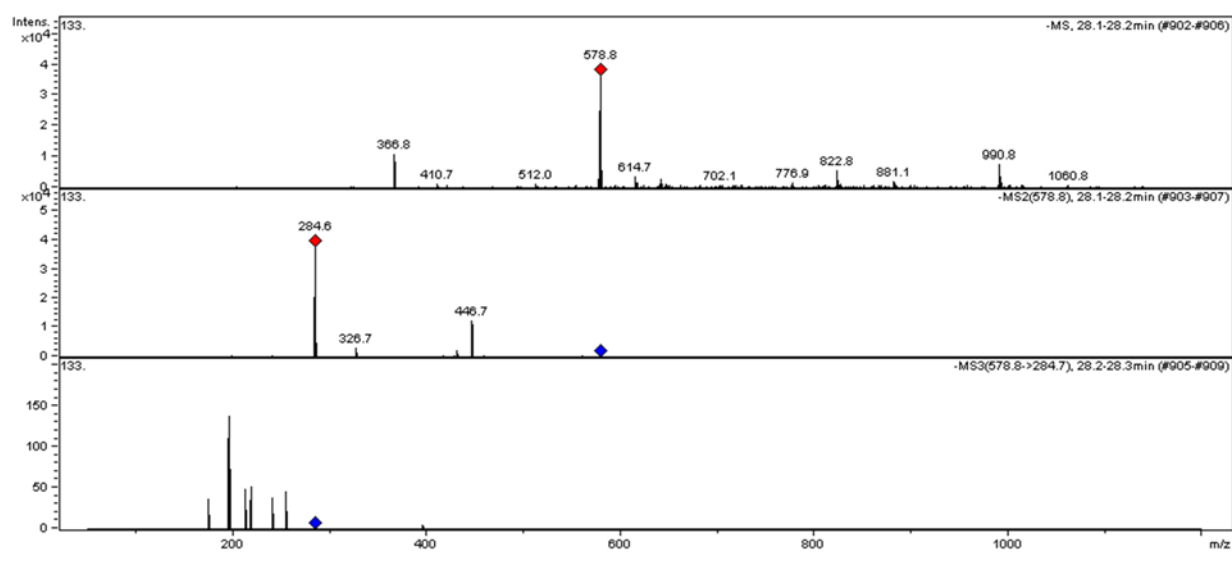
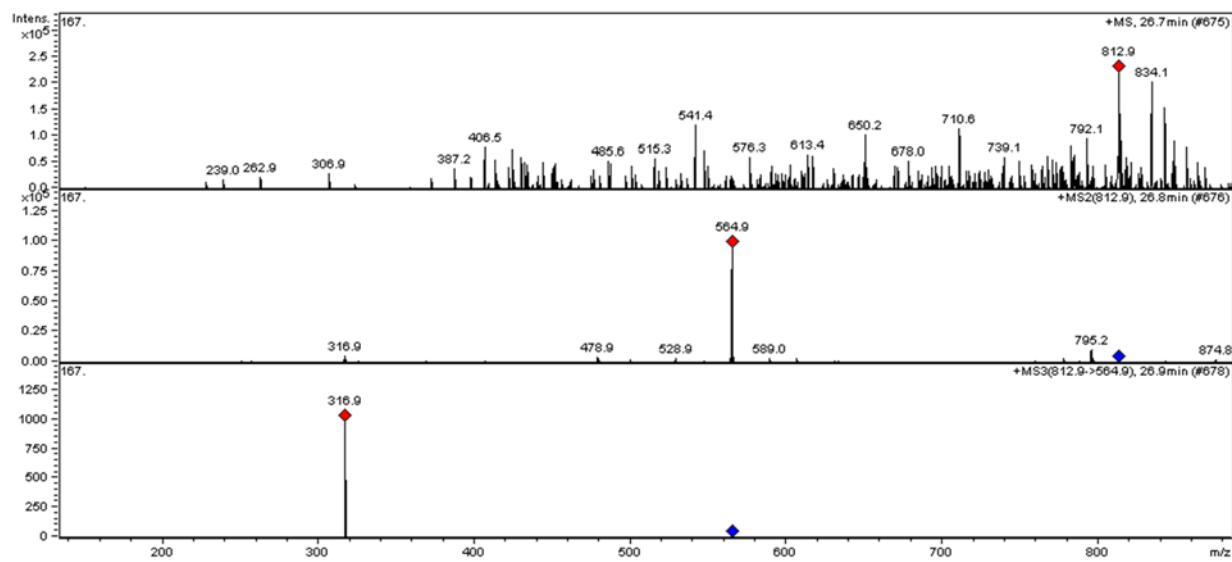
8. ANEXOS

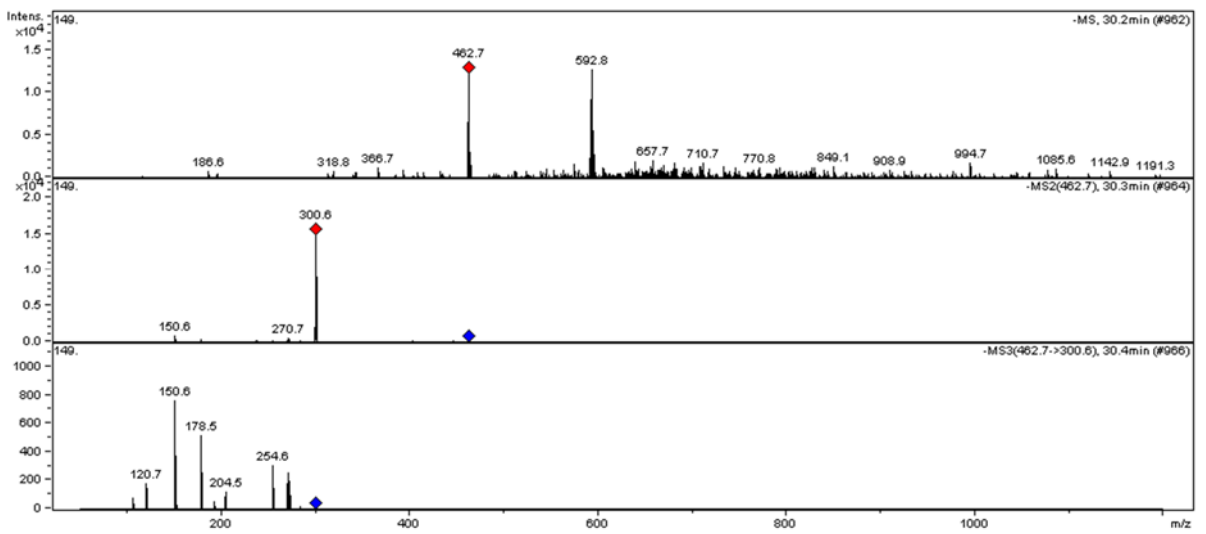
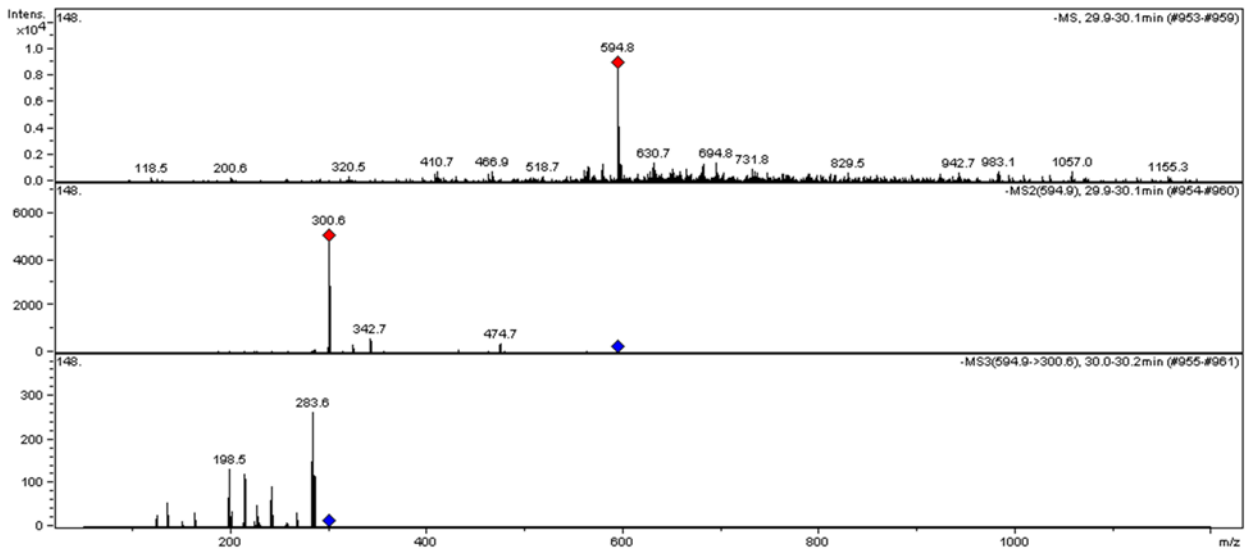
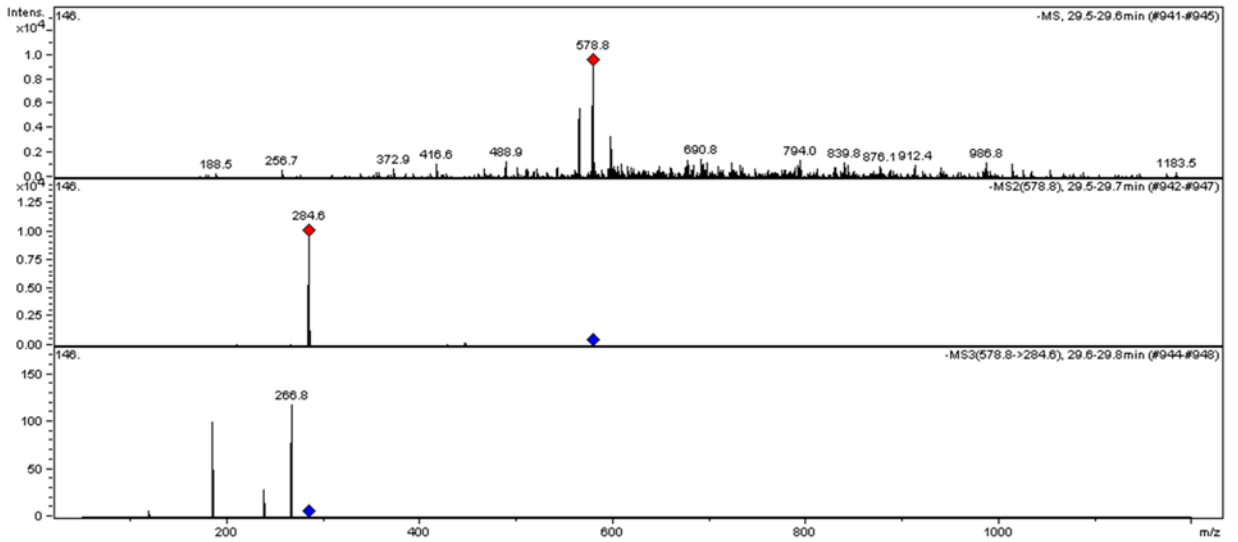
Cromatogramas CLAE-DAD-EM

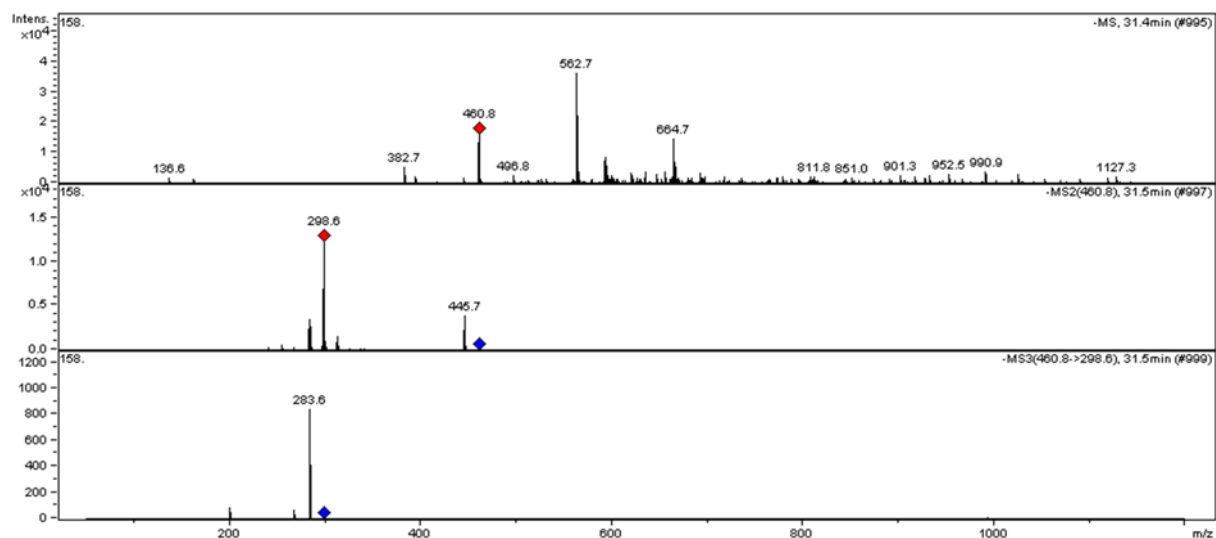
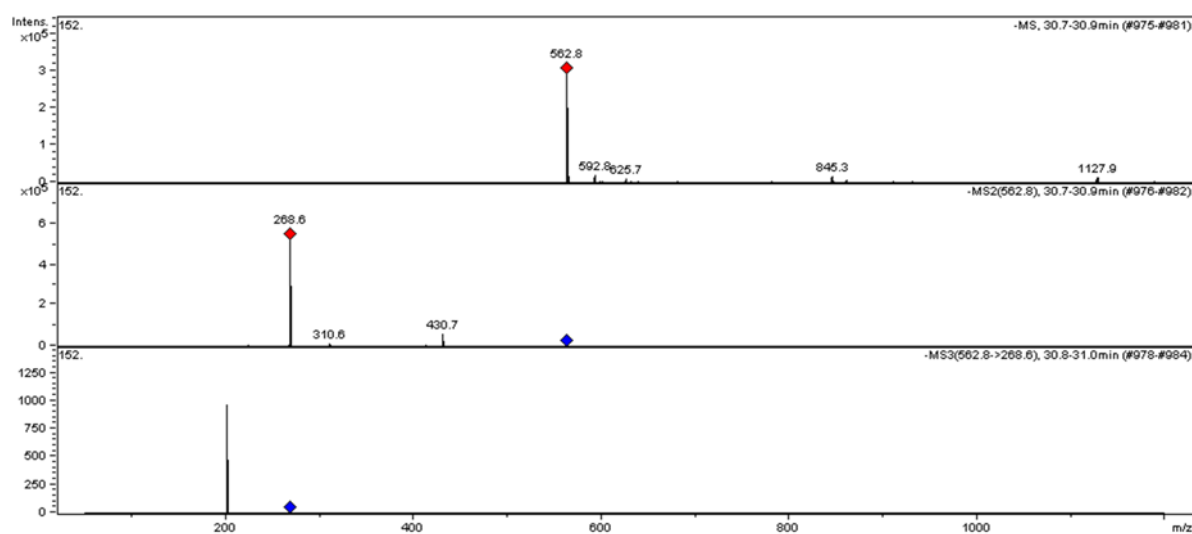
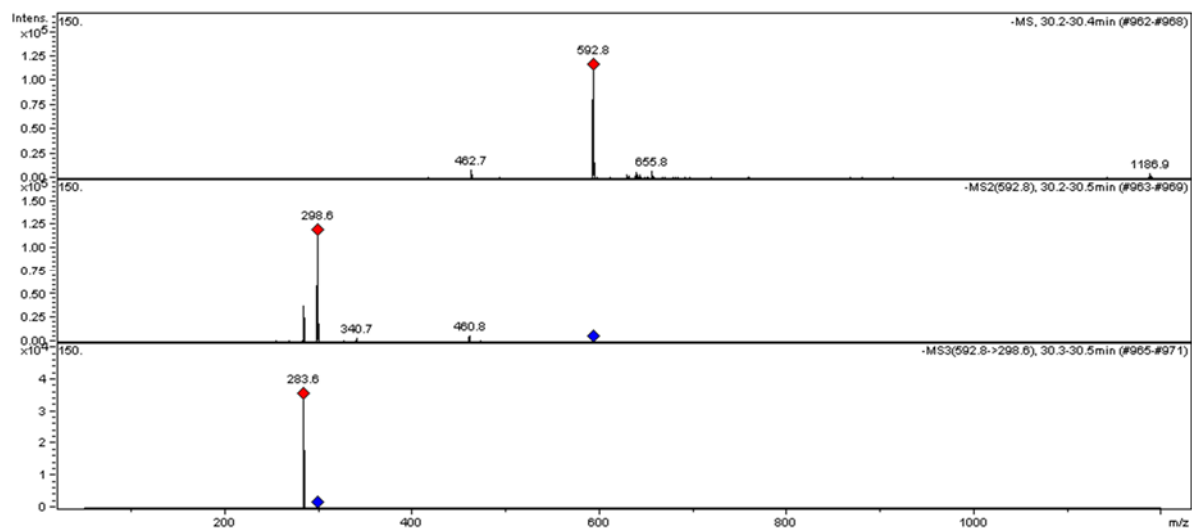
PCC Modo Negativo

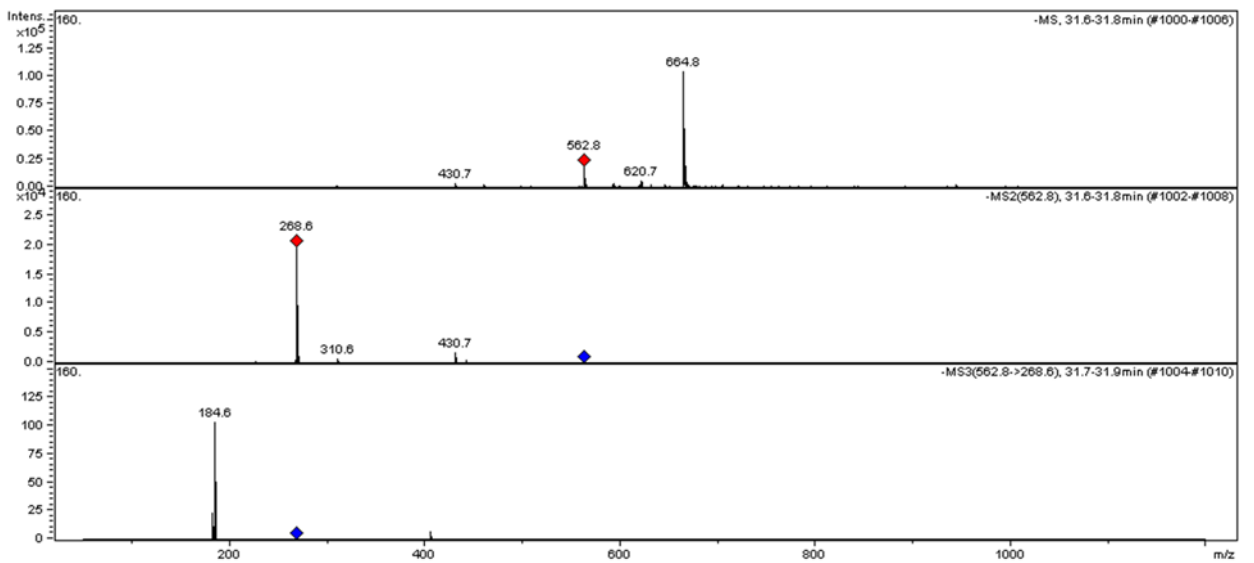
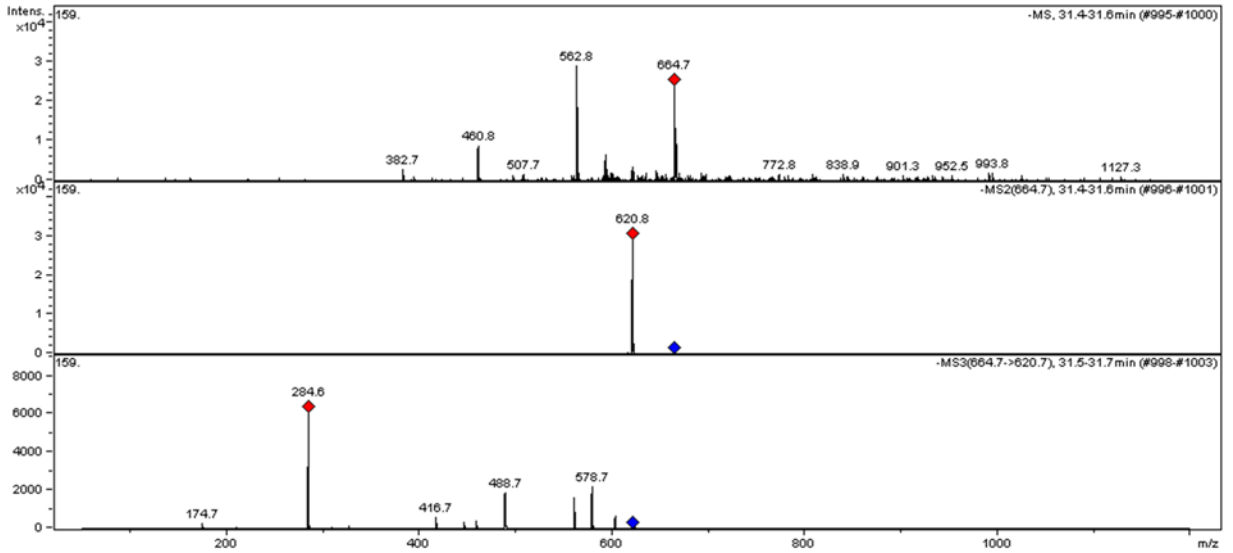
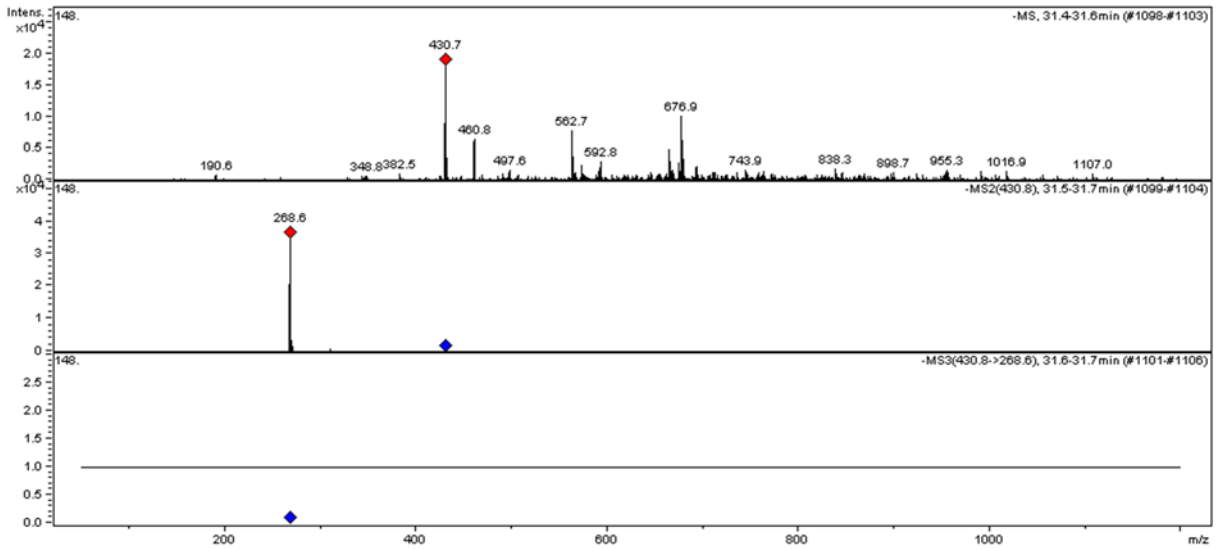


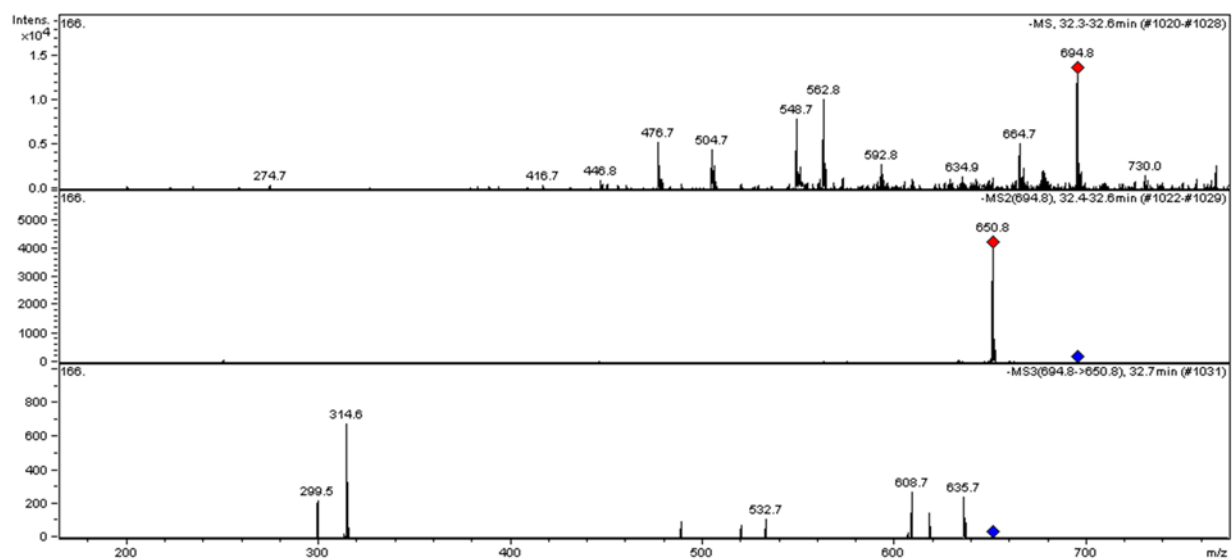
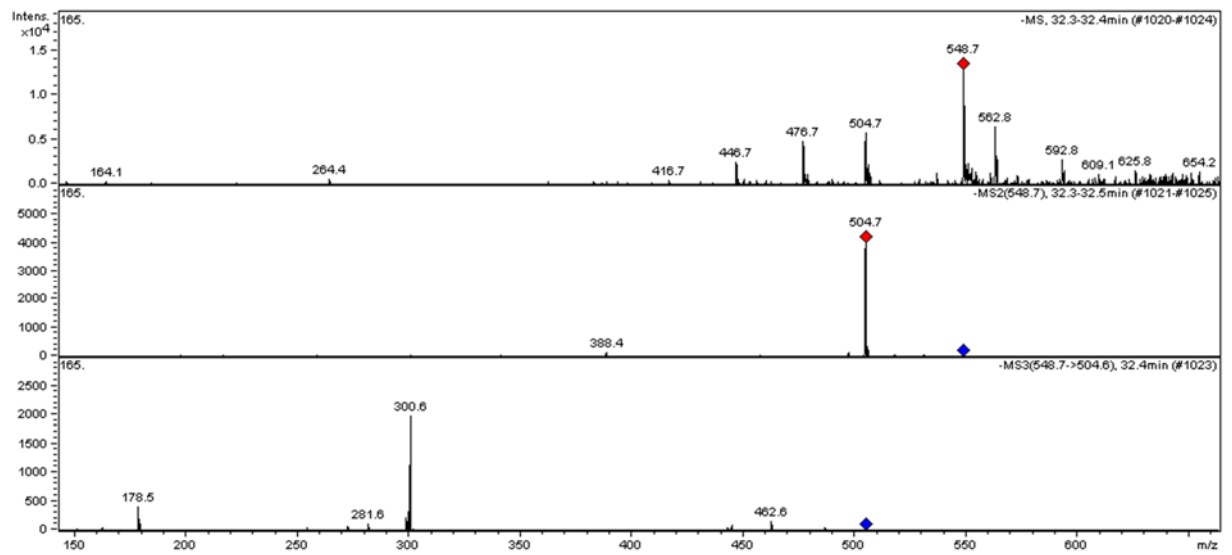
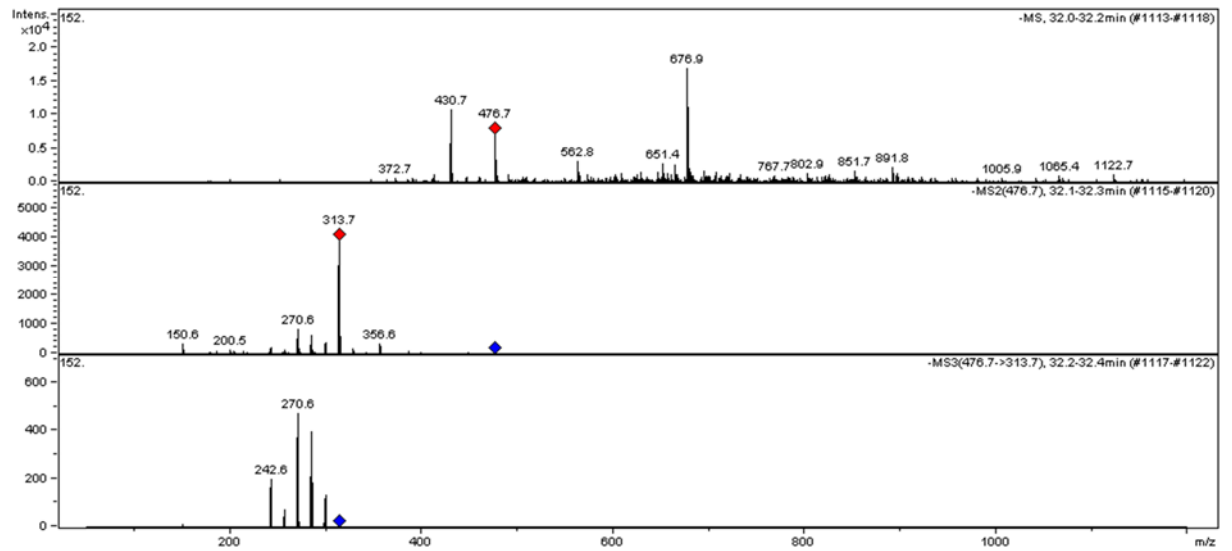


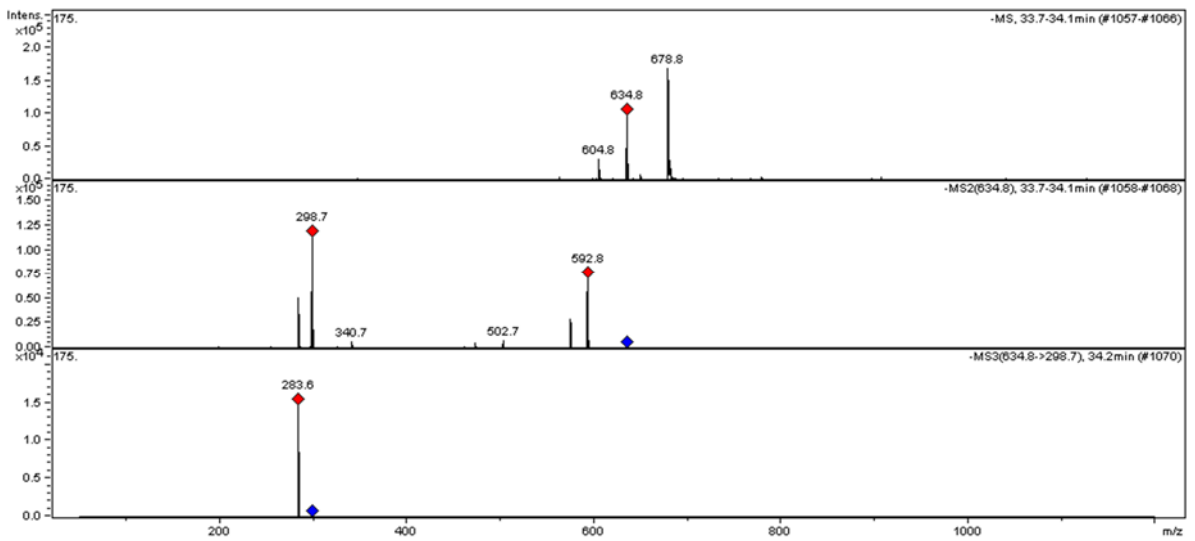
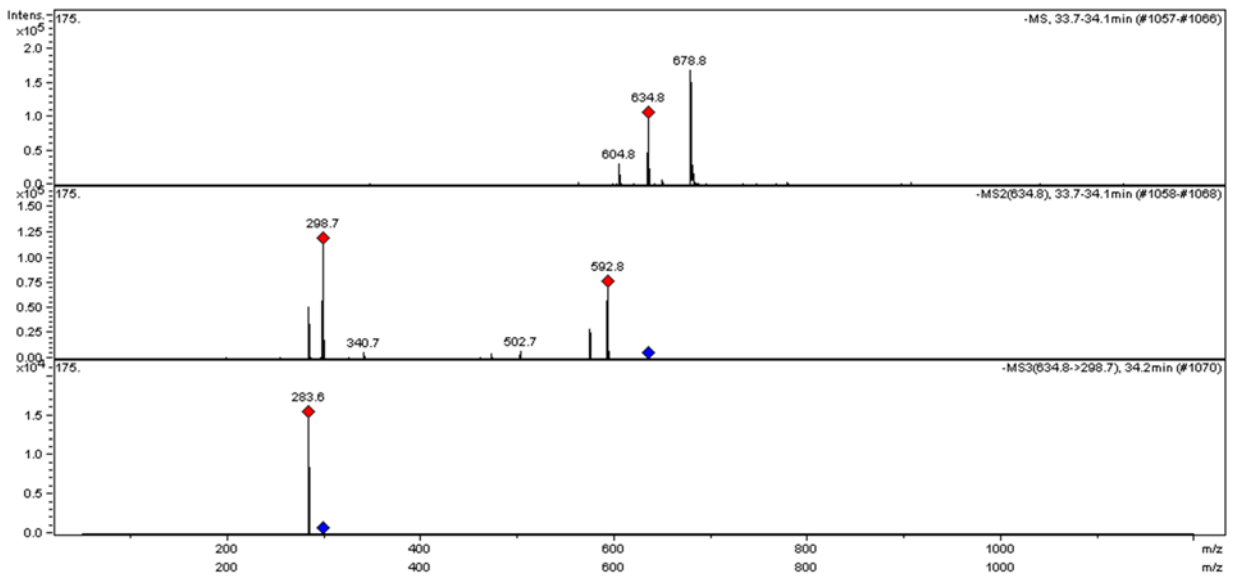
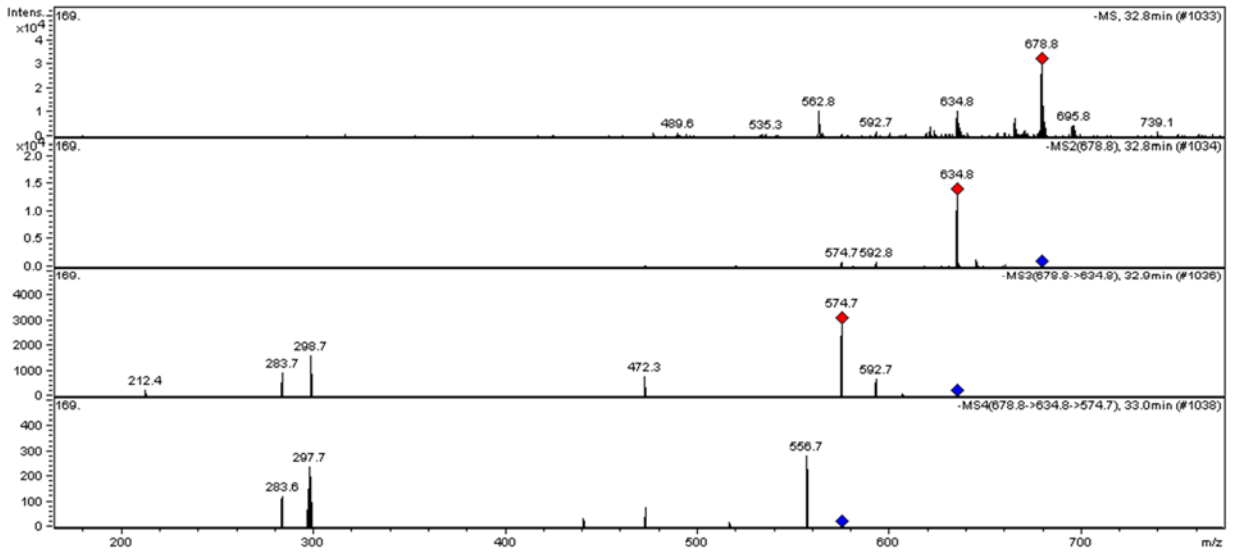












PCC Modo Positivo

