

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

MARILENE BIAVATTI

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOPROTETOR DA FASE VAPOR DO
ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA

PONTA GROSSA

2022

MARILENE BIAVATTI

POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOPROTETOR DA FASE VAPOR DO ÓLEO
ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, área de concentração em Fisiologia e Fisiopatologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Kanunfre

PONTA GROSSA

2022

B579 Biavatti, Marilene
Potencial antioxidante e citoprotetor da fase vapor do Óleo Essencial de Cravo da Índia / Marilene Biavatti. Ponta Grossa, 2022.
54 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas - Área de Concentração: Fisiologia e Fisiopatologia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre.

1. Óleos voláteis. 2. Estresse oxidativo. 3. Viabilidade celular. 4. Cravo da Índia. 5. Dpph. I. Kanunfre, Carla Cristine. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fisiologia e Fisiopatologia. III.T.

CDD: 610.28



Universidade Estadual
de Ponta Grossa

Programa de
Pós Graduação
em Ciências Biomédicas



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NÍVEL DE MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM FISIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA 04/2022 DA MESTRANDA Marilene Biavatti REALIZADA NO DIA 05 DE JULHO DE 2022, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

No primeiro dia do mês de julho do ano de dois mil e vinte dois, às 9h00min, em conformidade com o Art.2º da portaria CAPES n. 36 de 19 de março de 2020, através do sistema de web conferencia da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) via plataforma GoogleMeet – NUTEAD/UEPG, em seção pública, sob a presidência da Professora Dra. Carla Cristine Kanunfre reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas da mestranda Marilene Biavatti na linha de pesquisa “Pesquisa de compostos com atividades biológicas”, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Profa. Ednéia Amancio de Souza Ramos Cavalieri – UFPR e Prof. Airtton Vicente Pereira – UEPG. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa da dissertação de Mestrado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título da dissertação avaliada foi: “POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOPROTETOR DA FASE VAPOR DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA”. Encerrada a defesa, e após reunião, a banca comunicou o resultado final da avaliação da dissertação como aprovada. Considerado requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomédicas, a aluna deverá entregar uma cópia da versão final, no prazo estipulado no item 8 da IN 01/2015, referente a defesa de dissertação com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Para a obtenção do título de mestre, o aluno terá até 6 meses, após a data da defesa da sua dissertação, para apresentar ao Colegiado a carta de submissão do seu artigo em revista indexada no estrato mínimo B3 dentre os periódicos indicados pela área de Ciências Biológicas II vigente. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Profa. Dra. Ednéia Amancio de Souza Ramos Cavalieri – UFPR/PR

Prof. Dr. e Prof. Airtton Vicente Pereira – UEPG/PR

Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre – UEPG/PR

Ponta Grossa, 05 de julho de 2022.

Dedico este trabalho aos meus queridos
pais, Selso e Lucia, que são minha fonte
de força e determinação.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Carla Cristine Kanunfre, pela dedicação, paciência e por todo o trabalho de orientação feito com dedicação. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos e convivermos juntas. Você é um exemplo de força e alegria que levarei para a vida.

Aos meus pais, que sempre me apoiam, incentivam e amparam nos momentos difíceis. Nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis sem vocês.

Ao meu namorado, Munir Reda, que além de todo apoio e incentivo, foi um bom ouvinte das minhas reclamações e desabafos.

À toda equipe do laboratório M-59, especialmente a Laura Lima Verde, pela ajuda nos trabalhos e pelas conversas e risadas que tornaram os dias mais leves. Ao técnico Marcelo Paulo Bueno por ter feito mais que seu trabalho, auxiliando em tarefas do laboratório e ainda por ter ensinado passos da técnica de cultivo celular.

À grande amizade que fiz neste laboratório, Jacqueline Gonçalves dos Santos. Obrigada pelas conversas, companheirismo e principalmente alegria que trouxe para minha vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas por todos os ensinamentos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela infraestrutura e recursos financeiros.

A todas as pessoas não mencionadas aqui, mas que de alguma forma colaboraram com a realização deste trabalho.

RESUMO

BIAVATTI, Marilene. **Potencial antioxidante e citoprotetor da fase vapor do óleo essencial de Cravo da Índia**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022.

Óleos essenciais (OEs) são fontes de compostos com potencial terapêutico para diversas doenças e, especificamente os efeitos antioxidantes vem despertando o interesse de muitos pesquisadores, desde que muitas doenças foram relacionadas ao estresse oxidativo. Devido aos componentes voláteis dos OE poderem ser entregues diretamente ao tecido pulmonar por inalação, investigar os efeitos de sua fase vapor torna-se relevante. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a atividade antioxidante da fase vapor do OE comercial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) e seu possível efeito citoprotetor em fibroblastos de pulmão (linhagem MRC-5) submetidos a estresse oxidativo induzidos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para tanto foi determinada a atividade antioxidante da fase vapor do OE de cravo da Índia empregando os reagentes DPPH e ABTS. Os resultados revelaram que a fase vapor do OE de cravo da Índia foi efetiva no sequestro dos radicais DPPH e ABTS com valores de Cl_{v50} (%AA) correspondentes a 22,04 $\mu g/mL$ e a 117,5 $\mu g/mL$, respectivamente. O potencial reducional de FRAP da fase vapor do OE também foi determinado e apresentou R^2 0,746. A citotoxicidade da fase vapor do OE foi avaliada por meio dos ensaios de redução do MTT e coloração de SRB. Nas concentrações de 25 a 200 $\mu g/mL$ no período de tratamento de 24 horas a fase vapor do OE de cravo da Índia não foi citotóxica. Por conseguinte, ensaios de citoproteção de células MRC-5 submetidas a estresse oxidativo induzido por H_2O_2 (250 e 500 μM) foram realizados empregando pré- e pós-tratamentos com a fase vapor do OE de cravo da Índia. Apesar da fase vapor do OE de cravo da Índia apresentar alta atividade antioxidante, essa não foi eficaz na proteção das células MRC-5 quanto aos danos gerados pelo estresse oxidativo. Ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foram realizados empregando o composto DCFH-DA e revelaram que a fase vapor do OE de cravo da Índia não foi capaz de reduzir a produção de EROs induzida pelo peróxido de hidrogênio e ainda gerou produção de EROs *per se*, apresentando efeito sinérgico em ensaios com o peróxido de hidrogênio. Portanto, apesar da alta atividade antioxidante, mais estudos são necessários para que se possa sugerir o uso da fase vapor do OE de cravo da Índia no tratamento de doenças respiratórias relacionadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Óleos voláteis; Estresse oxidativo; Viabilidade celular; Cravo da Índia; DPPH; ABTS; FRAP.

ABSTRACT

BIAVATTI, Marilene. **Antioxidant and cytoprotective potential of Clove essential oil vapor phase.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2022.

Essential oils (EOs) are sources of potential therapeutic compounds for several diseases. Their antioxidant effects, especially, have been arousing interest of many researchers, since numerous diseases have been related to oxidative stress. Due to the volatile compounds of EOs being directly delivered to lung tissue by inhalation, investigating the effects of their vapor phase becomes relevant. The aim of this study was to evaluate the vapor-phase antioxidant activity of commercial clove EO (*Syzygium aromaticum*) and its possible cytoprotective effect on lung fibroblasts (MRC-5 strain) subjected to oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). For this purpose, the antioxidant activity of the vapor phase of clove EO was evaluated using the reagents DPPH and ABTS. The results revealed that the clove EO vapor phase was effective in scavenging DPPH and ABTS radicals with IC₅₀ (%AA) values corresponding to 22.04 $\mu\text{g/mL}$ and 117.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The FRAP reduction potential of the EO vapor phase was also assessed and presented R^2 0.746. Furthermore, its cytotoxicity was evaluated by MTT reduction and SRB assays. The vapor phase of clove EO at concentrations from 25 to 200 $\mu\text{g/mL}$ in the 24-hour treatment period was not cytotoxic. For that reason, cytoprotection assays of MRC-5 cells subjected to oxidative stress induced by H_2O_2 (250 and 500 μM) were performed employing pre- and post-treatments with its vapor phase. Despite the strong antioxidant activity of the clove EO vapor phase, there was no effectiveness in protecting MRC-5 cells from damage caused by oxidative stress. Assays for the detection of reactive oxygen species (ROS) were performed using the compound DCFH-DA. These tests revealed that the vapor phase of clove EO was not able to reduce hydrogen peroxide-induced ROS production and, instead, it generated ROS production per se, showing a synergistic effect in tests with hydrogen peroxide. Therefore, in spite of its strong antioxidant activity, more studies are necessary before the use of clove EO vapor can be suggested for the treatment of respiratory diseases related to oxidative stress.

Keywords: Volatile oils. Oxidative stress. Cell viability. Cloves. DPPH. ABTS. FRAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos do craveiro da Índia, botão floral e botão floral seco	21
Figura 2. Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia.....	29
Figura 3. Mecanismo proposto para a atividade intracelular do DCFH-DA	33
Figura 4. Atividade antioxidante da fase de vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método DPPH e curva padrão de Trolox	36
Figura 5. Atividade antioxidante da fase de vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método ABTS e curva padrão de Trolox.....	37
Figura 6. Capacidade antioxidante da fase vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método FRAP	39
Figura 7. Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia sobre a viabilidade celular (linhagem MRC-s), determinada pelo ensaio de redução do MTT	40
Figura 8. Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia sobre a viabilidade celular (linhagem MRC-5) determinada pelo ensaio da SRB.....	41
Figura 9. Indução de estresse oxidativo em células MRC-5 – Curva de peróxido de hidrogênio.....	42
Figura 10. Ensaio de citoproteção de células MRC-5 submetidas ao estresse oxidativo com 500 µM de peróxido de hidrogênio e ao pré- e pós-tratamentos com a fase vapor do OE de cravo da Índia	43
Figura 11. Ensaio de citoproteção de células MRC-5 submetidas ao estresse oxidativo com 250 µM de peróxido de hidrogênio e ao pré- e pós-tratamentos com a fase vapor do OE de cravo da Índia	44
Figura 12. Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia na produção intracelular de ROS	46
Figura 13. Formação de EROs em células MRC-5 tratadas e não tratadas com a fase vapor do OE de cravo da Índia na presença de peróxido de hidrogênio	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação.....	15
Quadro 2. Sistemas enzimáticos antioxidantes conforme sua ação biológica e seus sítios de ação	17
Quadro 3. Possíveis mecanismos antioxidantes desempenhados por alguns óleos essenciais.....	20
Quadro 4. Informações gerais e composição química do OE	25

LISTA DE SIGLAS

ABTS: 2,2'azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico

CAT: Enzimas catalase

CO₂: Dióxido de carbono

COX: Ciclooxygenase 2

CPNPC: Câncer de pulmão de não-pequenas células

CPPC: Câncer de pulmão de pequenas células

DCFH-DA: 2,7-diacetato de diclorofluoresceína

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

EROs: Espécie reativa de oxigênio

Fe²⁺: Íon ferroso

Fe³⁺: Íon férrico

FRAP: Poder antioxidante de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

GPx: Glutathione peroxidase

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

Cl_{V50}: Concentração inibitória média do vapor

MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

O₂: Oxigênio

O₂⁻: Radical Superóxido

OE: Óleo Essencial

OH: Hidroxila

OH⁻: Radical hidroxila

PRISMA: Principais itens para relatar em revisões sistemáticas e meta-análise (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*)

SOD: Superoxido dismutase

SRB: Sulfarodamina B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
3.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	17
3.2.1 Sistema Antioxidante Endógeno	17
3.2.2 Sistema Antioxidante Exógeno.....	18
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	19
3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA	21
3.4.1 Eugenol	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 ÓLEO ESSENCIAL	25
4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	25
4.2.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Captura do Radical Livre DPPH°	26
4.2.2 Método de Inibição do Radical ABTS• ⁺	27
4.2.3 Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)	28
4.3 ENSAIO DE CITOPROTEÇÃO, MEDIADO PELA FASE VAPOR DO OE DE CRAVO DE ÍNDIA, EM CÉLULAS MRC-5 SUBMETIDAS A ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H ₂ O ₂)	29
4.3.1 Ensaios de Viabilidade Celular.....	29
4.3.1.1 Ensaio de redução de MTT	30
4.3.1.2 Ensaio de coloração de proteínas sulforodamina B	30
4.3.2 Ensaio de Indução de Estresse Oxidativo com Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂)	31
4.3.2.1 Ensaios de pré-tratamento	31
4.3.2.2 Ensaios pós-tratamento.....	32
4.4 DETECÇÃO DE ROS EM CÉLULAS MRC-5 CULTIVADAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE: (1) PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E/OU (2) FASE VAPOR DO OE DE CRAVO DA ÍNDIA	32
4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são compostos naturais, produzidos e armazenados em órgãos secretores das plantas aromáticas, encontrados em folhas, frutos, flores, raízes, cascas, sementes e caules (CUNHA et. al., 2012). Caracterizados por alta volatilidade e hidrofobia. Trata-se de misturas complexas de compostos químicos que lhes conferem aromas característicos (COSTA, 2008, CUNHA et. al., 2009). Geralmente o constituinte de maior concentração é o que confere a atividade biológica ao OE, porém esta atividade também pode ser resultado do sinergismo entre os compostos (CUNHA et. al., 2012).

Estes OEs possuem grande importância para as industriais cosmética, alimentícia e farmacêutica, podendo ser utilizados como medicamentos ou adjuvantes no tratamento de inúmeras doenças (TRANCOSO, 2013). De fato, diversas pesquisas comprovam os efeitos farmacológicos dos OEs, como: antitumoral (KAILEH et. al., 2007), antifúngico (KORUKLUOGLU et. al., 2008), antibacteriano (AL-TURKI et. al., 2008), antiinflamatório e analgésico (BOSE et. al., 2007).

Muitos dos componentes dos OEs apresentam propriedades benéficas que são atribuídas a sua capacidade de sequestrar ou neutralizar radicais livres, atuando como inibidores da oxidação em sistemas biológicos (OLIVEIRA et. al., 2009). Vale ressaltar que a produção aumentada de radicais livre, condição denominada estresse oxidativo, contribui para a origem de muitas doenças. Assim as terapias antioxidantes surgem como prevenção e tratamento destas doenças, destacando-se câncer, inflamação, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A atividade antioxidante dos OEs tem sido amplamente descrita na literatura (SUHR e NIELSEN, 2003; MORAIS et. al., 2006; JUSTO et. al. 2008; SCHERER et. al. 2009; GOMES et. al., 2018). No entanto a grande maioria dos trabalhos relatam esses efeitos concernentes a sua fase líquida. Porém, considerando a sua alta volatilidade, torna-se relevante investigar os efeitos relativos à fase vapor. Face ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi investigar a atividade antioxidante do vapor do óleo essencial cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), e seu efeito citoprotetor perante estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o potencial antioxidante da fase vapor do OE comercial de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*), bem como avaliar seu efeito citoprotetor em fibroblastos de pulmão (linhagem MRC-5) submetidos a estresse oxidativo induzidos por peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antioxidante da fase vapor do OE de cravo da Índia pelos métodos de sequestro do radical DPPH e do radical ABTS; pela capacidade de redução férrica (FRAP).
- Calcular a porcentagem de atividade antioxidantes (%AA) e a concentração inibitória média da fase vapor (CI_{50}) do OE de cravo da Índia.
- Determinar a citotoxicidade da fase vapor do OE de cravo da Índia em fibroblastos de pulmão MRC-5.
- Investigar o potencial citoprotetor da fase vapor do OE de cravo da Índia em fibroblastos de pulmão MRC-5 submetidos a estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio por meio de ensaios de pré- e pós-tratamento.
- Avaliar atividade pró-oxidante através da detecção da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células tratadas com a fase vapor do OE de cravo da Índia.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são moléculas que possuem pelo menos um elétron não pareado em sua última camada eletrônica, tornando-os altamente reativos com compostos situados próximo a sua órbita externa, podendo ter, por conseguinte, uma função oxidante (doadora) ou redutora (receptora) de elétrons (DAVIES, 1995).

A produção de radicais livres é um processo contínuo e natural a partir de reações do metabolismo celular, sendo produzidos em baixas concentrações nas mitocôndrias durante a respiração celular. Também estão envolvidos nos mecanismos de: (1) defesa durante os processos infecciosos, (2) fagocitose, (3) crescimento celular, (4) sinalizador intracelular, (5) ativação de genes (DAVIES, 1995; FERREIRA, 1997; SHAMI, 2004). A produção de radicais livres pode ser aumentada a partir de fontes oxidantes exógenas, como tabaco, medicamentos, radiação, entre outros (HUSAIN, 1987; DROGE, 2002).

O aumento exacerbado destes radicais livres, caracteriza um estado denominado de estresse oxidativo, prejudicial ao organismo, por gerar peroxidação lipídica, danos às proteínas, carboidratos e DNA (HUSAIN, 1987; DROGE, 2002).

O estresse oxidativo tem sido relacionado a diversas doenças, podendo-se citar como exemplo a diabetes, as doenças neurodegenerativas (Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica, etc.), as doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, disfunções do sistema imune e câncer (SOSA et. al., 2013)

Os efeitos biológicos do estresse oxidativo dependem da concentração de radicais livres produzida, do tempo de exposição e dos mecanismos de proteção e reparação celular do indivíduo (ZHOU et. al., 2014; MEHER et. al., 2017).

Esses radicais livres são denominados de EROs (espécie reativa de oxigênio) ou ERN (espécies reativas de nitrogênio). Podem saturar os mecanismos de defesa celulares, danificando moléculas intracelulares, levando a perda das funções celulares e a morte por apoptose (SZUMIEL, 1994; SOSA et. al., 2013).

As EROs (Tabela 1) distribuem-se em dois grupos, as radicalares, contendo radical hidroxila, radical superóxido, e as não-radicalares, contendo oxigênio singlete e peróxido de hidrogênio (OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010).

Quadro 1 - Principais espécies reativas de oxigênio e seus locais de ação.

Espécies	Descrição	Ocorrência	Ação
Radical superóxido	Radical mais potente na indução de dano celular	Aproximadamente em todas as células aeróbicas	Na maioria das reações atua como agente redutor
Radical hidroxila	Altamente reativo	Formado a partir da homólise da água	DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos
Peróxido de hidrogênio	Não é um radical livre, porque não possui elétrons desemparelhados na última camada	Reações para produção de HO [•]	Proteínas e lipídios
Oxigênio singlete	Molécula de oxigênio excitada; não é um radical livre, porque não possui elétrons desemparelhados na última camada	Produzidos pelos fagócitos, indução luminosa e reações catalisadas pelas peroxidases	Mutações no DNA

Fonte: Adaptado de Oliveira e Schoffen (2010).

Dentre estas, o radical hidroxila é o mais danoso ao nosso organismo, devido a curta meia-vida que dificulta o seu sequestro *in vivo*. Fisiologicamente é formado a partir da reação do peróxido de hidrogênio com metais de transição e na radiólise da água (exposição da água a radiação ionizante) (BARREIROS et. al., 2006).

O radical ânion superóxido faz parte de processos químicos importantes, por exemplo, auxiliando na produção de radical hidroxila, através de quelatos de ferro férrico, formando ferro ferroso. Podendo também atuar na defesa celular, sendo produzido por fagócitos e fibroblastos durante a inflamação, protegendo o organismo contra infecções virais, bacterianas e fúngicas. Este radical pode ser encontrado inativo em meio aquoso, sua dismutação gera uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (FERREIRA et. al., 1997; BARREIROS et. al., 2006).

O oxigênio singleto pode atuar como causa ou um dos intermediários da toxicidade fotoinduzida, sendo assim a forma mais nociva do oxigênio. Sua meia-vida é muito curta em meio aquoso, pois ao se colidir com moléculas de água transfere sua energia, retornando para oxigênio tripleto. Entretanto em meio orgânico possui meia-vida maior, podendo causar reações com algumas biomoléculas (reações do tipo eno e dieno) (BARREIROS et. al., 2006).

No organismo o peróxido de hidrogênio desempenha um papel importante no processo de estresse oxidativo devido a sua capacidade de transpor as membranas celulares e gerar radical hidroxila na presença de metais de transição. Pode ser gerado pela dismutação do ânion superóxido por enzimas oxidases ou pela β -oxidação de ácidos graxos (BARREIROS et. al., 2006).

Como mencionado, os radicais livres reagem com substratos biológicos, podendo gerar danos às biomoléculas, o que compromete a saúde. Um exemplo são as mutações devido à quebra de cadeia do DNA, causada por oxidação, base etiológica das doenças oncogênicas. Assim também, a oxidação lipídica da membrana celular, que leva a perda da integridade e função, culminando na lise e morte celular. Já a oxidação de lipídios no sangue e nas paredes dos vasos sanguíneos, está associada a aterosclerose, trombose, infarto e acidente vascular encefálico (BARREIROS et. al., 2006; MACHADO et. al., 2009).

Sendo assim, nosso organismo conta com sistemas de proteção contra as EROs, de origem própria (sistema antioxidante endógeno), mas podemos adquirir essa proteção do meio externo (sistema antioxidante exógeno) (HALLIWELL et. al., 2000).

3.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

3.2.1 Sistema Antioxidante Endógeno

São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes (Quadro 2).

Quadro 2 - Sistemas enzimáticos antioxidantes conforme sua ação biológica e seus sítios de ação.

Enzima	Ação biológica	Locais
Superóxido dismutase	Catalisa a desmutação do $O_2^{\cdot -}$ convertendo-o em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas	Abundante nas células aeróbicas
Catalase	Catalisa a água e oxigênio para formação de H_2O_2 ,	Eritrócitos,baço, rins e fígado
Glutathiona peroxidase	Catalisa a redução do H_2O_2 , e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida	Citosol
Glutathiona redutase	Mantêm o sistema de proteção celular íntegro através da redução da forma oxidada (GSSG) para a forma reduzida (GSH)	Fígado e linfonodos

Fonte: Adaptado de Oliveira e Schoffen (2010).

O sistema superóxido dismutase, é formado por enzimas que catalisam a dismutação do ânion radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete (OKADO-MATSUMOTO, 2000). Nos mamíferos, é possível encontrar três isoformas da superóxido dismutase: SOD1, presente no citoplasma; SOD2, distribuída na matriz mitocondrial, e a SOD3, encontrada nos fluidos extracelulares, como linfa, fluido sinovial, e plasma (WATANABE et. al., 2014).

O sistema composto pela glutathiona peroxidase e a glutathiona redutase está envolvido na prevenção dos danos oxidativos nas células, através da redução de hidroperóxidos em água e oxigênio, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida (BARREIROS et. al., 2006).

Em condições fisiológicas a glutathiona reduzida é a forma encontrada em concentrações maiores quando comparada com sua forma oxidada. A forma oxidada é produzida, em sua maioria, pela ação catalítica glutathiona peroxidase, assim como através de reações diretas da glutathiona com compostos eletrolíticos, como por exemplo os radicais livres (AQUILANO et. al. 2014). Assim, a proporção entre as

formas oxidada e reduzidas é um importante indicador do ambiente redox (DICKINSON, 2002).

A catalase neutraliza o H_2O_2 em oxigênio e água, além de coordenar SOD citosólico e mitocondrial para promover a rápida degradação do H_2O_2 , impedindo a geração de radicais hidroxila altamente reativos (STEILING et. al., 1999).

3.2.2 Sistema Antioxidante Exógeno

Um excelente componente antioxidante que pode ser adquirido através da dieta é a vitamina C, também conhecida como ácido ascórbico. Trata-se de uma vitamina hidrossolúvel, encontrada na forma de ascorbato no organismo.

O ascorbato tem como característica ser um bom redutor de metais de transição, especialmente Fe^{3+} e Cu^{2+} , presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (HALLIWELL, 1999). Além disso, pode atuar contra a peroxidação lipídica de duas formas: (1) no plasma sanguíneo doando hidrogênios para os lipídios circulantes, impedindo a sua peroxidação e deposição na parede dos vasos, (2) na membrana plasmática, juntamente com o α -tocoferol, também doando hidrogênios aos fosfolipídios, impedindo a peroxidação (BUETTNER, 1993).

A vitamina E é formada por quatro tocoferóis, sendo o α -tocoferol mais ativo (THERIAULT et. al., 1999). Comprovadamente um eficiente inibidor da peroxidação lipídica *in vivo*, a vitamina E age como doadora de hidrogênio para o radical peroxila, interrompendo a reação radicalar em cadeia. Cada tocoferol reage com até dois radicais peroxila, sendo então irreversivelmente desativado. Porém, um mecanismo de regeneração com o ascorbato nas membranas celulares e com a ubiquinona na membrana mitocondrial pode evitar que os tocoferóis sejam desativados (BUETTNER, 1993).

Na maioria dos tecidos biológicos, onde os níveis de oxigênio são baixos, os carotenóides têm grande importância como antioxidantes. Dentre estes, o β -caroteno é uma importante fonte de vitamina A, e formam um tipo incomum de redutores biológicos, pois atuam melhor em baixos níveis de oxigênio, já que altos níveis de oxigênio levam à sua destruição. *In vivo*, os carotenóides desativam o oxigênio singlete e/ou sequestram radicais peroxila, reduzindo a oxidação do DNA e lipídios.

Neste contexto são interessantes no controle de doenças degenerativas, como câncer e doenças cardíacas (BURRI, 1997,1999).

Também é de grande importância citar os polifenóis, principalmente os flavonóides, que atuam no sequestro de radicais livres. A atividade antioxidante dos flavonóides depende muito da sua estrutura e reatividade como doador de hidrogênio e elétrons, da estabilidade do radical flavonil, e da sua capacidade de quelar metais de transição, além é claro da sua solubilidade e interação com as membranas (CAO et. al. 1997).

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Os OEs têm despertado grande interesse devido a sua variedade de compostos bioativos. De acordo com a ISO (International Standart Organization) os OEs são definidos como óleos voláteis, geralmente líquidos e de aparência oleosa em temperatura ambiente, o que lhes conferem essa designação.

Os OEs podem ser obtidos por extração de diferentes partes das plantas, como folhas, frutos e flores, por meio de destilação ou prensagem (SIMÕES e SPITIZER, 2004). A composição química depende de vários fatores, por exemplo, clima, características do solo, época da colheita. Portanto cada OE pode conter diferentes componentes (SILVA, OLIVEIRA e SOUZA, 2011). Este é um aspecto importante, pois apesar de apresentarem compostos qualitativamente semelhantes, as diferenças quantitativas tornam cada óleo único, com características próprias, bem como propriedades químicas e biológicas exclusivas (PROBST, 2012).

O aroma geralmente é agradável, despertando o interesse da indústria cosmética e de perfumaria (TRANCOSO, 2013). De fato, as fragrâncias obtidas a partir dos OEs fazem parte da história da humanidade, muito ligada a experiências nostálgicas, já que as mensagens olfativas são transmitidas para uma área do cérebro ligada com atividade emocional e da memória (DIAS e SILVA, 1996).

Além disso, tem-se conhecimento de diversas atividades farmacológicas dos OEs, como a ação antiespasmótica, cardiovascular, antioxidante, calmante, estimulante de secreções gástricas, analgésica, antiinflamatória, antisséptica (inibindo crescimento de bactérias e fungos), inseticida, entre muitos outros (SIMOES, 2004).

Vale destacar a propriedade antioxidante dos óleos essenciais. Diversas pesquisas mostram que seus compostos possuem a capacidade de neutralizar ou minimizar danos oxidativos das espécies radicalares nas células (MIRANDA et. al., 2010).

No quadro abaixo estão apresentados alguns OEs com atividade antioxidante já descrita na literatura.

Quadro 3 - Possíveis mecanismos antioxidantes desempenhados pelos OEs

Óleo essencial	Possíveis mecanismos de ação antioxidante
<i>Artemísia indica</i> <i>Citrus sinensis</i> <i>Magnólia virginiana</i>	<i>Por sequestro e eliminação de EROs</i>
<i>Beta vulgaris</i>	<i>Por eliminação de EROs</i> <i>Por prevenção da produção EROs através da inativação de íons metálicos</i> <i>Por aumento do sistema enzimático de defesa</i>
<i>Juniperus communis</i> <i>Myric rubra</i> <i>Nigella sativa</i> <i>Sálvia pisdica</i>	<i>Por sequestro e eliminação de EROs</i> <i>Por inibição da peroxidação lipídica</i>

Fonte: Adaptado de Pitthan, K. V. (2021)

Miceli e colaboradores (2009) relataram que OE de *Juniperus communis* (zimbros) atuam como antioxidantes devido ao seu teor de polifenóis livres ou glicosilados que podem reagir com radicais hidroxila, ânio superóxido e radical de peróxido inibindo a oxidação de lipídios. (MICELI et. al., 2009).

Trabalhos *in vitro* empregando os métodos DPPH, ORAC e β -caroteno/ácido linoleico mostraram que o OE de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) possui atividade antioxidante devido a seus componentes monoterpênicos e altos teores de compostos fenólicos (TAKAYAMA et. al., 2016; SILVA et. al., 2011).

Suhr & Nielsen (2003) trabalharam com OE de capim-limão, canela, cravo, mostarda e tomilho. Scherer et. al. (2009) com os óleos de capim-citronela, cravo da Índia e palmarosa. Dentre os OEs estudados o de cravo da Índia destaca-se como excelente antioxidante (CAVALCANTE, 2013).

3.4 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO DA ÍNDIA

Existem descrições desde a antiguidade citando o uso do cravo da Índia para temperar e preservar alimentos, elaboração de perfumes e incensos aromáticos (CAVALCANTE, 2013).

Cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) (Figura 1C) é o botão seco da flor do craveiro (Figura 1B), uma árvore pertencente à família *Myrtaceae* (Figura 1A) (AFFONSO et. al, 2012; CORTÉS-ROJAZ et. al, 2014; ORWA et. al., 2009).

Figura 1 – Fotos do craveiro da Índia (A), botão floral (B), e botão floral seco (D).



Fonte: Pádua et. al. (2013)

O cravo da Índia é amplamente utilizado em produtos para higiene, repelentes de insetos, indústria cosmética e farmacêutica (MENDES-FERRÃO, 1993; MATSUBARA, 1997; OLIVEIRA et. al., 2007; AGRA et. al., 2008; CAVALCANTE, 2013; PÁDUA et. al., 2013).

O OE de cravo da Índia possui diversos componentes importantes, como β -cariofileno, acetil eugenol, metil eugenol, óxido de cariofileno, chavicol, hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, lactonas, ceras, gomas, resinas, flavonoides, triterpenóides livres, glicosilados, tanino elágico, eugeniina e ácido gálico (SOUSA et. al., 2004).

Vale destacar o eugenol, que configura 84% da composição do óleo (FERQUIMA INDÚSTRIA E COMÉRCIO LTDA) e já foi citado pela sua capacidade analgésica (LEE et. al., 2007), antiviral (XIANG; PEN; WANG, 2008), antioxidante (OGATA et. al., 2000; GULÇIN, 2011), antibacteriana (ALEM; DOUGLAS, 2009) e anti-inflamatória (LEE et. al., 2007).

3.4.1 Eugenol

O eugenol, componente majoritário do OE de cravo da Índia, vem despertando o interesse dos pesquisadores devido a sua baixa toxicidade, lipossolubilidade e por apresentar propriedades biológicas (LEE, 2006; LINARD, 2008). Naturalmente sintetizado a partir do aminoácido fenilalanina, através da rota metabólica dos fenilpropanóides, o eugenol é quimicamente chamado como 4-alil-2-metóxi-fenol ou 2-metoxi-4-(2-propenil-fenol) (ESCOBAR, 2002; SENANAYAKE, 1977).

Possui coloração amarelada, consistência líquida e oleosa, com odor característico e sabor picante. Apresenta instabilidade em contato prolongado com o ar, podendo se tornar mais escuro e viscoso (BUDAVARI, 1996; ALMEIDA, 2004).

Devido a sua lipossolubilidade, o eugenol consegue atravessar as membranas biológicas rapidamente e atingir alvos intracelulares como as mitocôndrias, onde impede a oxidação da nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH), diminuindo então os níveis de ATP (ESCOBAR, 2002; USTA et. al., 2002).

Utilizado amplamente em técnicas odontológicas desde o século XIX, o eugenol junto com o óxido de zinco forma o eugenolato de zinco, devido a uma reação de quelação e pode ser aplicado diretamente na cavidade dentária. Quando exposto ao meio aquoso, como a saliva, ocorre hidrólise do eugenolato liberando o hidróxido de zinco e eugenol na polpa dentária, onde tem ação antiinflamatória e anestésica (MARKOWITZ et. al., 1992; ESCOBAR, 2002).

Os efeitos biológicos do eugenol são dependentes da concentração e tempo de exposição ao tecido. Dentre as propriedades farmacológicas descritas em literatura encontra-se: antimicrobiana, antiinflamatória, anticarcinogênica, modulador de respostas imunes e antioxidante (ESCOBAR, 2002).

Seu potencial antimicrobiano é atribuído à sua estrutura fenólica, que em altas concentrações causa degeneração das proteínas nas membranas celulares de bactérias, consequentemente causando danos à membrana celular. Já em baixas concentrações pode estabilizar as membranas celulares humanas, o que dificulta a penetração de bactérias (MARKOWITZ et. al, 1992; ESCOBAR, 2002).

Kim e colaboradores (2003) demonstraram que o eugenol pode suprimir a expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2) em macrófagos de camundongos ativados. Também se constatou a capacidade de inibição da atividade da lipooxigenase-5 em polimorfonucleares humanos (RAGHAVENRA et. al, 2006) e inibição da agregação plaquetária e atividade do tromboxano B2 (SHARMA et. al, 1994; NAIDU, 1995).

Na literatura encontra-se trabalhos que atribuíram a atividade antitumoral ao eugenol (REDDY et. al, 1993; REDDY, 1997). O eugenol suprimiu a mutagenicidade induzida em *Salmonella typhimurium* TA100, pela aflotoxina B1 e pelo N-metil-nitro-N-nitrosiguanidina e em *Salmonella typhimurium* TA98, pelo dimetilbenzantraceno (AMONKAR et. al, 1986; FRANCIS et. al, 1989). O eugenol inibiu de forma reversível a enzima glutathione-S-transferase, reduzindo o crescimento de tumores (ROMPELBERG et. al, 1996; KIM et. al, 1997).

Estudos mostram o efeito do eugenol na inibição da desgranulação de mastócitos em ensaios *in vitro* e *in vivo*, prevenindo reações anafiláticas (KIM et. al, 1997).

A ação do eugenol na resposta imune mediada por células T auxiliares (precedentes da proliferação das células T), induzem a produção de interleucina-2 (IL-2) (SIEBEN, 2001), além de participar na regulação de outras células imunes, como linfócitos B, macrófagos e células T matadoras (SMITH, 1988).

O eugenol possui uma estrutura metóxi-fenólica, que inibe a peroxidação lipídica por radicais livres, o que lhe confere atividade antioxidante (TAIRA et. al, 1992; ABRAHAM, 2001). Também tem capacidade de modular concentração intracelulares de antioxidantes endógenos, como a glutatona (ROMPELBERG et. al, 1996; BOUTHILLIER, CHARBONNEAU e BRODEUR, 1996).

O efeito antioxidante do eugenol também atua na redução da oxidação do LDL-colesterol, por ser capaz de reduzir metais e formar complexos inativos de metil-eugenol que não reagem com o oxigênio (ITO et. al, 2005).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

O OE de cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) foi adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda e foi solubilizado em uma mistura de dois solventes (etanol P.A. e propilenoglicol na proporção 75% e 25%). As diferentes concentrações do OE testadas foram obtidas a partir de uma solução mãe (100.000 µg/mL) empregando-se solução salina (NaCl, 0,9%) como diluente.

O eugenol foi o composto principal encontrado, correspondendo a 84% do OE. Na tabela 4 estão apresentados os principais componentes e outras informações de interesse sobre o OE de cravo da Índia.

Quadro 4 - Informações gerais e composição química do OE.

Óleo essencial e data da análise	Cravo da Índia – 09/11/2020
Principais componentes	eugenol (84%), acetato eugenila (6%), beta-cariofileno (7%), alfa-humuleno (2%)
Impurezas	Isento
Densidade (20°C)	1,038 – 1,0600
Origem	Indonésia
Extração	Destilação a vapor dos botões

Fonte: Ferquima Indústria e Comércio Ltda.

4.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Diversos métodos de determinação de atividade antioxidante com mecanismos de ação, aplicações e fundamentos diferentes estão disponíveis na literatura. Dentre os métodos mais comumente aceitos, validados e padronizados estão os métodos de: redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), baseado na capacidade do DPPH° reagir com doadores de hidrogênio (MELO et. al., 2006; CARDOSO et. al., 2005; STRATIL, 2006); ABTS^{°+} (ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico), que consiste em verificar o decaimento do cátion-

radical ABTS produzido pela oxidação do $\text{ABTS}^{\circ+}$ quando na presença de uma amostra antioxidante (RE et. al., 1999; STRATIL, 2006; KUBAN, 2006) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), baseado na capacidade dos fenóis em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} (BENZIE, 1996; KUBAN, 2006).

4.2.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Captura do Radical Livre DPPH°

Este é um método químico que permite a determinação da atividade antioxidante de um composto pelo seu potencial de sequestrar radicais livres. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio, de coloração violeta, estável e com absorbância entre 515 e 520 nm. A redução deste radical é monitorada pelo decaimento de sua absorbância durante a reação (PRADO, 2009).

Quando em contato com um doador de elétron a intensidade de absorção diminui e a solução DPPH perde a cor de acordo com o número de elétrons capturados. Em outras palavras, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio oriundo do composto antioxidante, ocorre a mudança de cor.

A atividade antioxidante dos OEs pela captura do radical livre DPPH° foi determinada de acordo com o método de Pires, et. al. (2017) com modificações. A técnica consiste na reação do radical livre DPPH (80 μM) com o vapor do OE, por 6 horas. A leitura das absorbâncias foi realizada 520 nm empregando espectrofotômetro (Biotek, μQuant).

Resumidamente, o OE foi solubilizado e diluído como descrito no item 4.1 para obtenção das concentrações de 50 a 200 $\mu\text{g/mL}$. Foi também preparado um ensaio controle (solvente e salina) correspondente a concentração zero e um ensaio denominado branco apenas com salina. O antioxidante utilizado como referência foi o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), construindo-se uma curva analítica padrão para validação do método na condição experimental abaixo relatada.

O ensaio foi realizado em placas de 24 poços. A solução do óleo foi colocada nos 16 poços laterais da placa (1000 μL em cada poço) e a solução de DPPH foi colocada em 4 poços centrais (600 μL em cada poço). Cada placa continha uma única

concentração teste. Após serem totalmente vedadas as placas foram colocadas em estufa, à 37°C e ao abrigo da luz, por 6 horas. Em seguida efetuou-se a leitura da absorbância.

A atividade de captura do radical DPPH foi expressa por meio da porcentagem de ação antioxidante (%AA), onde Ac é a absorbância do controle e Aam a absorbância da amostra, segundo a equação: $\%AA = (Ac - Aam) / Ac \times 100\%$ (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). A concentração de vapor gerada que inibiu 50% do radical DPPH (Clv₅₀), no meio reacional, foi obtida por regressão não-linear utilizando-se os valores de concentração versus porcentagem de inibição.

4.2.2 Método de Inibição do Radical ABTS^{•+}

O radical ABTS^{•+} é produzido a partir do ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin) -6-sulfônico e trata-se de um composto cromóforo estável, altamente solúvel em água e com absorbância máxima a 414 nm (MILLER, 1996). Tal radical é gerado por reações enzimáticas ou químicas, podendo ser solubilizado em meios orgânicos ou aquosos, onde a atividade antioxidante pode ser determinada (ARNAO, 2000). Uma vantagem deste método é poder ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis (LIMA, 2008).

A solução apresenta cor esverdeada devido a reação do ABTS com persulfato de potássio. Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS promovendo a perda da coloração (KUSKOSKI, 2005).

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), foi adaptada de Torres, P. B. et. al. para placas de 24 poços. O antioxidante utilizado como referência foi o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), construindo-se a curva analítica padrão para validação do método na condição experimental abaixo relatada.

O ABTS foi produzido pela reação de 50 mL de ABTS 7 mM (solução mãe) com 880 µL de solução de persulfato de potássio 140 mM. Esta mistura ficou armazenada no escuro e em refrigeração, por no mínimo 16 horas antes da realização das análises. No dia das análises, a solução do radical ABTS foi diluída em metanol

para obtenção de absorbância de $0,8 \pm 1$ a 734 nm em espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda).

O preparo das soluções do OE e as concentrações usadas foram as mesmas descritas para o ensaio de DPPH. O ensaio foi realizado em placas de 24 poços. A solução do óleo foi colocada nos 16 poços laterais da placa (1000 μ L em cada poço) e a solução de ABTS foi colocada em 4 poços centrais (1600 μ L em cada poço). Cada placa continha uma única concentração do OE. Após serem totalmente vedadas as placas foram colocadas em estufa, à 37°C e ao abrigo da luz, por 6 horas. Em seguida efetuou-se a leitura da absorbância.

Os valores medidos da absorbância das concentrações da fase geradas a partir das diferentes concentrações do OE testada foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante utilizando a equação descrita anteriormente e em seguida calculado o Clv₅₀.

4.2.3 Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

No método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) o complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{3+} -TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPZ) quando está na presença de uma substância antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm (BENZIE, 1996).

A metodologia utilizada para a identificação dos compostos redutores de íons de ferro foi descrita por Benzie e Strain (1993), com modificações. Os reagentes utilizados foram: acetato de sódio 300 mM, cloreto férrico 200 mM e TPTZ (2, 4, 6 – trifidril-s-tiazina): 0,070 g e 22,43 mL de HCl 40 mM.

O preparo das soluções dos óleos e plaqueamento seguiu-se os métodos anteriormente citados. Após 6 horas de reação foi realizada a leitura em espectrofotômetro à 593 nm. A atividade antioxidante foi expressa como valor de Fe^{2+} μ M/mM.

4.3 ENSAIO DE CITOPROTEÇÃO, MEDIADO PELA FASE VAPOR DO OE DE CRAVO DE ÍNDIA, EM CÉLULAS MRC-5 SUBMETIDAS A ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO COM PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

Previamente ao ensaio de citoproteção, propriamente dito, foram padronizadas algumas condições experimentais necessárias.

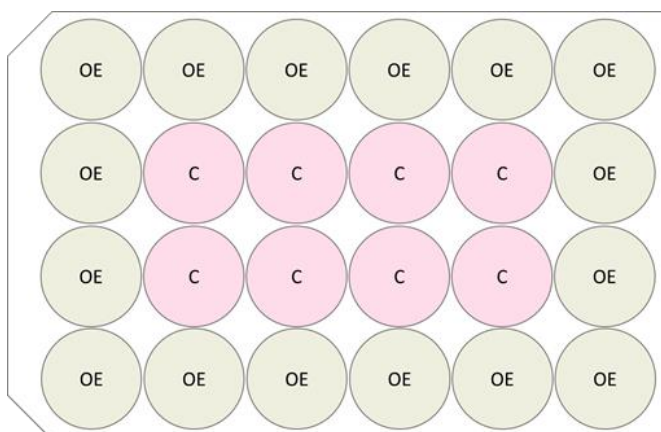
4.3.1 Ensaios de Viabilidade Celular

Com intuito de determinar a citotoxicidade da fase vapor do OE de cravo da índia foram testadas as concentrações de 25 a 200 µg/mL do OE em períodos de tratamento de 24 e 48 horas.

As células foram cultivadas em meio MEM, pH 7,4, suplementado com 15% (v/v) de soro fetal bovino (SFB - Gibco), 2mM de L-glutamina (Vetec), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich), 2g/L de bicarbonato de sódio (Vetec) e 1 mL/L de antibiótico penicilina e estreptomicina-100 U/mL e 10 mg/mL, respectivamente (Sigma Aldrich).

Em placas de 24 poços, adicionou-se 1000 µL de uma suspensão de células (1X10⁴ cél/mL/poço) nos 8 poços centrais (Figura 2). Após 24 horas e total adesão celular, adicionou-se 1000 µL da solução de OE, nas concentrações acima citadas, nos 16 poços laterais, sendo que cada placa continha uma única concentração do OE. As placas foram incubadas em estufa de CO₂ (temperatura de 37°C e 5% de CO₂) pelos períodos de 24 e 48 horas.

Figura 2 - Ilustração da estratégia de semeadura utilizada para avaliar o efeito da fase vapor do OE de cravo da índia.



(C) poços contendo células; (OE) poços contendo o OE de cravo da índia. Dimensões da placa (L x A): 127,5 x 22,45 mm

Após o período de tratamento celular determinou-se a viabilidade celular empregando-se os ensaios de redução de MTT e coloração de proteína/sulfarodamina B.

4.3.1.1 Ensaio de redução de MTT

Esse ensaio colorimétrico é uma reação de redução química que permite avaliar indiretamente a viabilidade celular. O anel tetrazólio do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) é clivado nas mitocôndrias ativas pelas suas desidrogenases, formando cristais de formazan de coloração violeta, que podem ser quantificados por espectrofotometria quando solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (MOSMANN, 1983).

Após o tempo de tratamento (item 4.3.1), o meio de cultivo foi removido e 400 µL da solução de MTT a 0,5 mg/L (Sigma Aldrich) foi adicionada aos poços. As placas foram incubadas por 2 horas e após, a solução de MTT foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. O conteúdo do poço foi homogeneizado e transferido para uma placa de 96 poços a fim de realizar a leitura espectrofotométrica da absorbância em comprimento de onda de 570 nm (Biotek, µQuant). A viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{Abs da amostra}) / (\text{Abs média do controle}) \times 100.$$

4.3.1.2 Ensaio de coloração de proteínas sulforodamina B

Este ensaio utiliza o corante Sulforodamina B que possui grupos sulfônicos que podem se ligar aos aminoácidos de proteínas celulares. Trata-se de uma ligação estequiométrica e a quantidade de corante Sulforodamina B extraído da célula durante o teste é proporcional à quantidade de proteína celular (Nedel et. al, 2011).

A viabilidade celular também foi determinada pelo ensaio colorimétrico empregando-se a sulforodamina B (SRB). Após o tempo de incubação do tratamento, o sobrenadante foi desprezado, as células foram lavadas com tampão de fosfato de sódio pH 7,4; em seguida foi adicionado 200 µL de ácido tricloroacético 10% e então as placas foram mantidas na geladeira durante 30 minutos. Logo após, foi feita a lavagem dos poços com água destilada. Passadas 24 h, adicionou-se 200 µL de solução de SRB (Sigma Aldrich) 0,2% e após 30 minutos as placas foram lavadas com

ácido acético 1%. Depois da total secagem dos poços, 150 µL de TrisBase 10 mM foram adicionados aos poços para solubilizar o conteúdo e então 100 µL de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços (PAPAZISIS et. al., 1997). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada nos comprimentos de onda de 520 nm e 620 nm e, para a normalização dos dados, o valor de leitura em 620 nm foi subtraído do valor de 520 nm e então a viabilidade celular (%) foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ viabilidade} = (\text{Abs em 520nm} - \text{Abs em 620nm}) / (\text{Abs média do controle}) \times 100$$

4.3.2 Ensaio de Indução de Estresse Oxidativo com Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Com base nos relatos de literatura de indução de estresse oxidativo (PONNUSAMY, Y. et. al. 2015), inicialmente fez-se uma curva de peróxido com concentrações de 31,5 à 500 µM, em contato direto com células MRC-5 pelo tempo de 3 horas.

Para tanto as células foram semeadas em placas de 24 poços na concentração de 1X10⁴ cél/mL/poco nas mesmas condições de cultivo descritas no item 4.3.1. Após 24 horas, as células foram submetidas ao estresse oxidativo pelo período de 3 horas. Na sequência foi determinado a viabilidade celular por meio do ensaio de redução de MTT.

A partir destes resultados de viabilidade celular escolheu-se as concentrações de 250 e 500 µM de peróxido de hidrogênio para testes de citoproteção empregando-se pré- e pós-tratamento com a fase de vapor do OE de cravo da Índia.

4.3.2.1 Ensaios de pré-tratamento

Utilizando placas de 24 poços, adicionou-se 1000 µL de células (1X10⁴) nos 8 poços centrais e essas foram mantidas em estufa por 24 horas. Após este período cada placa recebeu uma única concentração de OE (0, 100 e 200 µg/mL), nos poços laterais às células, sendo estas incubadas em estufa de CO₂ por mais 24 horas.

Passado o tempo de tratamento, 4 poços dos 8 contendo as células receberam 100 µL de peróxido de hidrogênio, sendo que cada placa continha uma concentração de peróxido de hidrogênio. Os 4 poços que não receberam adição do peróxido foram denominados controle. Após o tempo de 3 horas o meio de cultivo com

peróxido foi retirado, os poços foram lavados com solução salina 0,9% e a determinação de viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio redução de MTT.

4.3.2.2 Ensaios pós-tratamento

Utilizando placas de 24 poços, adicionou-se 1000 μL de células (1×10^4) nos 8 poços centrais. As placas ficaram em estufa por 24 horas, após este período 4 poços contendo células foram tratados com peróxido de hidrogênio (100 μL por poço), sendo que cada placa recebeu apenas uma concentração de peróxido de hidrogênio. Após 3 horas, o meio de cultivo com peróxido foi retirado, os poços foram lavados e 1000 μL de meio de cultivo foram colocados em cada poço. Em seguida, cada placa recebeu uma concentração diferente de OE (0, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$), nos 16 poços laterais aos 8 centrais contendo as células. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas, na sequência o meio de cultivo foi retirado, os poços foram lavados com solução salina 0,9% e a determinação de viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio redução de MTT.

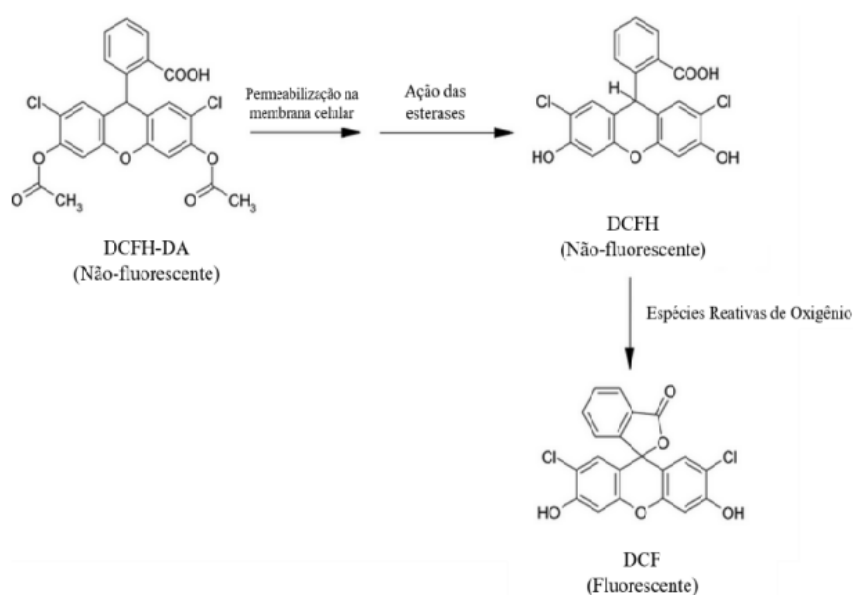
4.4 DETECÇÃO DE ROS EM CÉLULAS MRC-5 CULTIVADAS NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE: (1) PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E/OU (2) FASE VAPOR DO OE DE CRAVO DA ÍNDIA

Existem diversas abordagens que permitem a quantificação e avaliação de ROS em processos bioquímicos que envolvem técnicas para quantificar radicais livres, marcadores de danos oxidativo e antioxidantes envolvidos no sistema redox celular (KOHEN, 2002).

Dentre os métodos mais utilizados na quantificação de ROS, os que empregam marcadores fluorescentes são os mais sensíveis (HEMPEL, et.al, 1999). O ensaio fluorimétrico utilizando o marcador 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) pode ser aplicado para estudos celulares pela facilidade em permear a membrana da célula e poder ser detectada fluorescência ao ocorrer sua oxidação (LAUTRAITE, et.al., 2003).

No interior da célula o DCFH-DA é hidrolisado por enzimas através de esterases, adquirindo a forma não fluorescente DCFH. Na sequência, a presença de peroxidases leva à oxidação do DCFH em DCF, sua forma fluorescente (AULA, et. al., 2015) (Figura 3).

Figura 3 - Mecanismo proposto para a atividade intracelular do DCFH-DA.



Fonte: Adaptado de Aula, et. Al., 2015

A detecção do ROS foi feita seguindo a metodologia descrita por Rocha (2018). Em resumo, as células foram cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de 5×10^4 cél/mL/poço e incubadas a 37°C por 24 horas, para total adesão celular. Após este período, o meio de cultura foi retirado, os poços foram lavados com PBS e 250 μL da solução do marcador DCFH-DA (500 μM em PBS) foram adicionados em cada poço. Após 35 minutos de incubação a solução foi retirada, os poços foram lavados com PBS, e na sequência, adicionou-se 250 μL de peróxido de hidrogênio nas concentrações de 250 ou 500 μM . A quantificação da fluorescência foi imediatamente medida em fluorímetro Biotek Synergy HT utilizando 485 nm e 525 nm emissão:excitação, respectivamente.

4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *Software* GraphPad Prism 5.01 (San Diego, CA, EUA). A diferença entre os grupos experimentais foi testada por análise de variância (*One-Way* ANOVA) seguida do pós-teste de Dunnett's, com intervalo de confiança em 95% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células frequentemente são expostas a ação de ERO, que são gerados naturalmente pelo metabolismo celular. Em baixas concentrações desempenham funções fisiológicas importantes, porém quando em quantidade elevada, geram efeito adversos devido ao estresse oxidativo, responsável por danos em estruturas moleculares como proteínas, lipídios e DNA (STADTMAN, 2004).

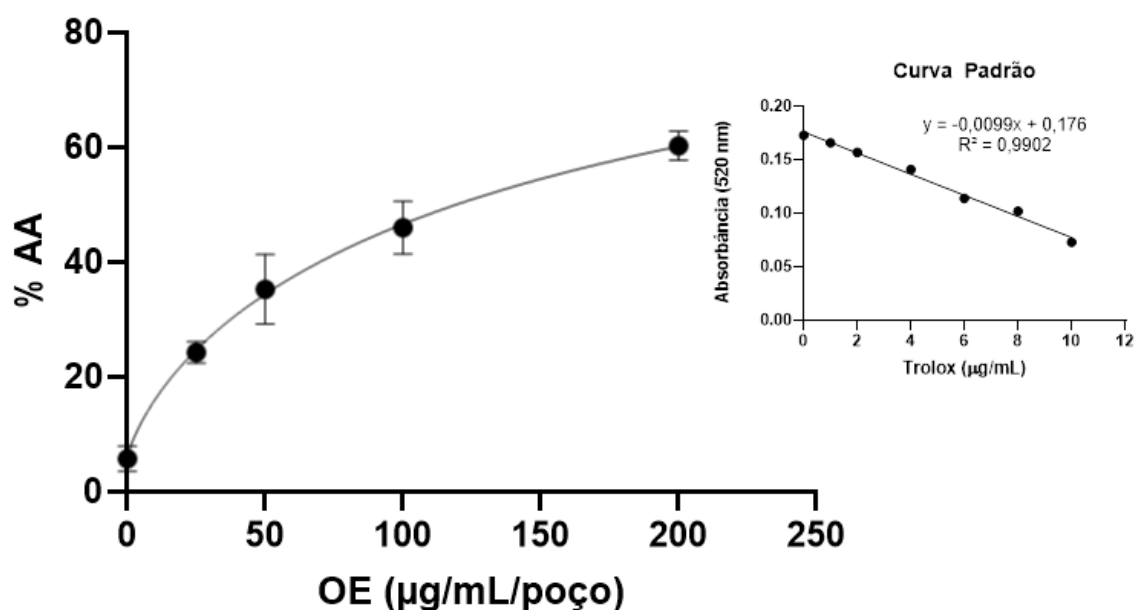
Na tentativa de reversão destes danos, a busca por substâncias antioxidantes se ampliou desde a década de 90, quando se constatou os benefícios de produtos naturais para a saúde. De fato, estudos demonstram que substâncias antioxidantes, por meio de vários mecanismos, neutralizam a ação prejudicial dos oxidantes, como por exemplo, quelando íons metálicos e/ou capturando de radicais livres (TOMEI; SALVADOR, 2007).

O OE de cravo da Índia, na literatura, tem sido referenciado como excelente antioxidante (SOUSA et. al., 2004) e o eugenol relatado como seu composto majoritário (GULÇIN, 2011).

Quanto aos efeitos biológicos da fase vapor deste óleo volátil, não se tem muitas informações relatadas na literatura. Existem descrições apenas da atividade microbiana e antifúngica (ESCOBAR, 2002) e nenhuma menção sobre a atividade antioxidante foi encontrada. Portanto, este trabalho mostra pela primeira vez, por três diferentes métodos químicos, a atividade antioxidante da fase vapor do OE de cravo da Índia.

O OE de cravo da Índia apresentou elevada capacidade antioxidante pelo método DPPH. A curva de concentração versus inibição exibiu boa correlação linear com coeficiente de determinação sendo R^2 0,9702 (Figura 4).

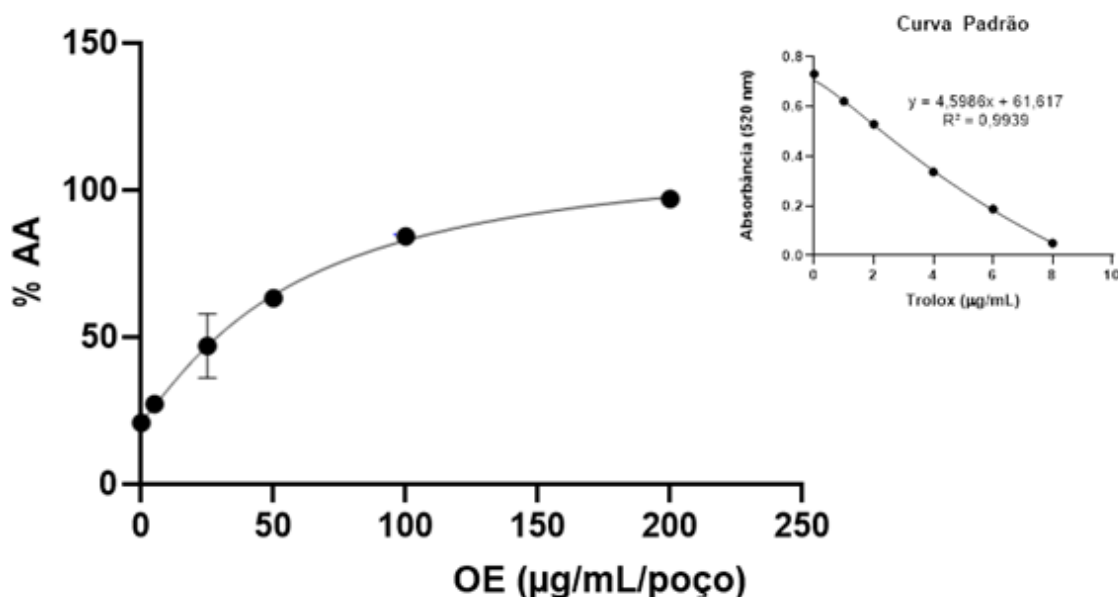
Figura 4 - Atividade antioxidante da fase vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método DPPH e curva padrão de Trolox.



A atividade de captura do radical DPPH^o foi expressa por meio da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) da fase vapor gerada pela concentração do OE testada. A direita e acima está representada a curva padrão do método, realizada nas mesmas condições experimentais, empregado o antioxidante Trolox.

Os resultados encontrados nos ensaios de determinação de atividade antioxidante empregando o método ABTS corroboram que a fase vapor do OE do cravo da Índia é um bom antioxidante com curva de concentração versus inibição exibindo R^2 0,9992 (Figura 5).

Figura 5 - Atividade antioxidante da fase vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método ABTS e curva padrão de Trolox.



A atividade de captura do radical $ABTS^{\bullet+}$ foi expressa por meio da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) da fase vapor gerada pela concentração do OE testada. A direita e acima está representada a curva padrão do método, realizada nas mesmas condições experimentais, empregado o antioxidante Trolox.

Para captura de 50% dos radicais livres de DPPH e ABTS seria necessário produção de vapor a partir da concentração de 22,04 µg/mL e 117,5 µg/mL respectivamente, sendo tais valores considerados a CI_{50} calculado para OE de cravo da Índia.

O mecanismo exato pelo qual os OEs agem como antioxidantes ainda não é conhecido. Tal ação pode resultar de efeitos sinérgicos de seus componentes, ou de seu componente majoritário (BAKKALI ET. AL. 2008).

O OE de cravo da Índia apresenta como principais constituintes os compostos terpênicos, cuja atividade antioxidante e doadora de elétrons já foi descrita na literatura (CARDONA, 2009; DANIEL ET. AL. 2009). O eugenol, o alfa-pineno, o beta-cariofileno e o linalol já foram relatados por apresentarem atividade antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo* (AMANLOU ET. AL., 2005; OZKAN ET. AL., 2007).

Sabe-se que o efeito de captura de radicais livres está relacionado a capacidade da substância de doar hidrogênio, especialmente as que possuam grupo fenólicos como encontrado no OE de cravo da Índia (CHAIEB et. al., 2007).

Comparando com os dados de literatura, que apontam que um bom antioxidante é a substância capaz de impedir, retardar ou prevenir a oxidação mediada por radicais livres, em baixas concentrações (RICE-EVANS, 1996), pode-se afirmar que o OE de cravo da Índia apresentou alta atividade antioxidante. Tal afirmação respalda-se nos artigos que relatam a atividade antioxidante do eugenol.

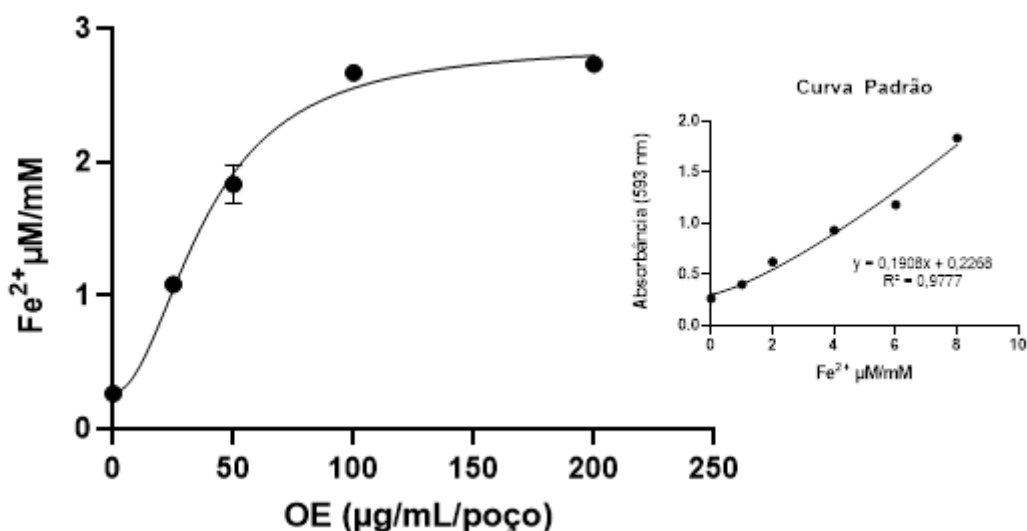
O eugenol, componente majoritário do óleo de cravo da Índia, utilizado na sua forma líquida, mostrou atividade sequestradora do DPPH com CI_{50} de 22,6 $\mu\text{g/mL}$ (ZHANG et. al., 2017). Resultados semelhantes foram mostrados no trabalho de Kim e colaboradores (2018), onde o eugenol foi capaz de eliminar os radicais livres do ABTS (76,9% na dose de 20 $\mu\text{g/mL}$) e DPPH (90,8% na dose de 20 $\mu\text{g/mL}$).

Cabe ressaltar que o eugenol é, não somente, o composto majoritário do OE de cravo da Índia, mas também o principal composto volátil em temperatura ambiente (CHAIEB et. al., 2007).

Devido à complexidade química estrutural dos OEs, a realização de diferentes metodologias se faz necessária (CRAFT et. al., 2012; MIRANDA et. al., 2016; CIESLA et. al., 2016) para corroborar sua atividade antioxidante, como o ensaio de FRAP.

O óleo essencial de cravo da Índia também apresentou alta capacidade redutora pelo potencial reducional (FRAP), resultando na conversão de íons férrico para ferroso (Figura 6).

Figura 6 - Capacidade antioxidante da fase vapor do óleo de cravo da Índia determinada pelo método FRAP.



Atividade Antioxidante do OE de cravo da Índia pelo método FRAP. À direita e acima está representada a curva padrão do método, realizada nas mesmas condições experimentais, empregado o antioxidante Trolox.

A alta capacidade redutora pelo potencial reducional (FRAP) do vapor do OE pode estar relacionado a presença do eugenol, pois conforme relatado por Embuscado (2015), em estudo de avaliação da atividade antioxidante de diferentes espécies vegetais, as que apresentaram maior atividade antioxidante continham o eugenol em sua composição. Estes mesmos achados foram observados por Gülçin (2011).

A capacidade de redução férrica permite avaliar diretamente a atividade antioxidante conforme descrito por Benzie (1996). A atividade redutora dos compostos fenólicos depende do número e da posição dos grupos hidroxila, quanto mais grupos hidroxila maior o poder de redução (KUMAR et. al, 2013). O valor de FRAP encontrado para a fase vapor de cravo da Índia pode ser atribuído à presença do grupo hidroxila no eugenol.

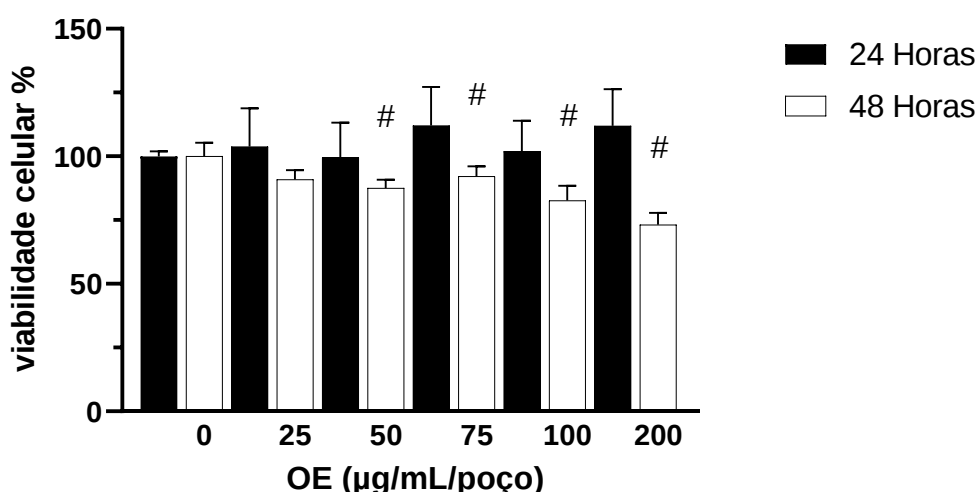
De fato, o eugenol é conhecido por sua atividade antioxidante, podendo ser o principal composto que confere ao óleo de cravo da Índia seu potencial antioxidante. Todavia, pode gerar toxicidade, dependendo da estrutura biológica exposta a ele, bem como do tempo de exposição e da concentração utilizada (SHIH et. al., 2014).

Assim, pensando-se em ensaios de citoproteção a estresse oxidativo, a toxicidade da fase vapor do OE foi avaliada em fibroblastos de pulmão (linhagem MRC-5).

Na figura 7 pode-se observar que no período de tempo de tratamento de 24 horas o vapor do OE de cravo da Índia não foi citotóxico nas concentrações testadas de 25 µg/mL a 200 µg/mL. No entanto, no tratamento de 48 horas observou-se diferença significativa na viabilidade celular a partir da concentração de 50 µg/mL.

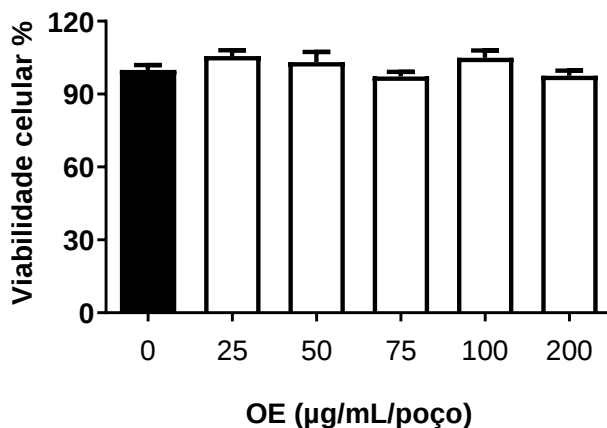
O tempo de tratamento de 24 horas foi adotado para realização dos ensaios de citoproteção, por não gerar toxicidade às células. Ainda para confirmar a ausência de toxicidade das concentrações a serem empegadas, foi realizado o ensaio de coloração de SRB (Figura 8).

Figura 7 - Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia sobre a viabilidade celular (linhagem MRC-5), determinada pelo ensaio de redução do MTT.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT após 24 e 48 de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. *# representam diferença estatística em relação ao respectivo controle (etanol P.A. + solução salina 0,9%) obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett's ($p < 0,05$).

Figura 8 - Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia sobre a viabilidade celular (linhagem MRC-5) determinada pelo ensaio da SRB

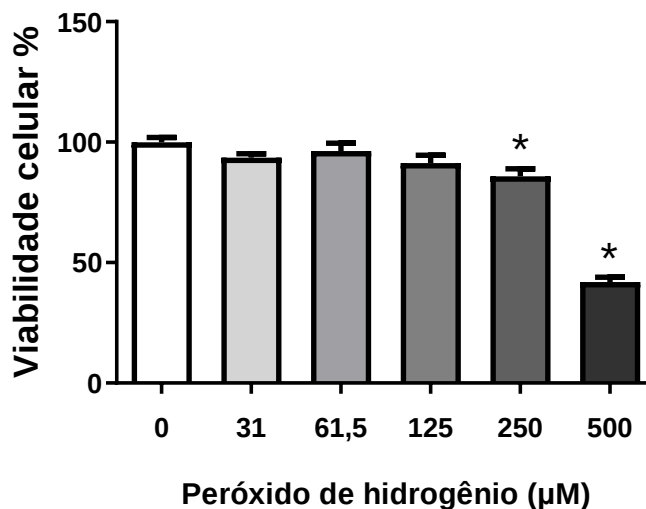


A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de coloração de proteína SRB após 24 horas de tratamento. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio.

Visando avaliar o efeito citoprotetor da fase vapor do OE de cravo, primeiramente foi padronizado o modelo de indução de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio nas células MRC-5 (Figura 9).

A incubação de células com peróxido de hidrogênio gerou redução da viabilidade nas concentrações de 250 e 500 μM , todavia não se observou dose dependência. A concentração de 250 μM peróxido de hidrogênio, gerou redução da viabilidade celular de 15% em relação ao controle e a de 500 μM de 60% (Figura 9).

Figura 9 - Indução de estresse oxidativo em células MRC-5 - Curva de peróxido de hidrogênio



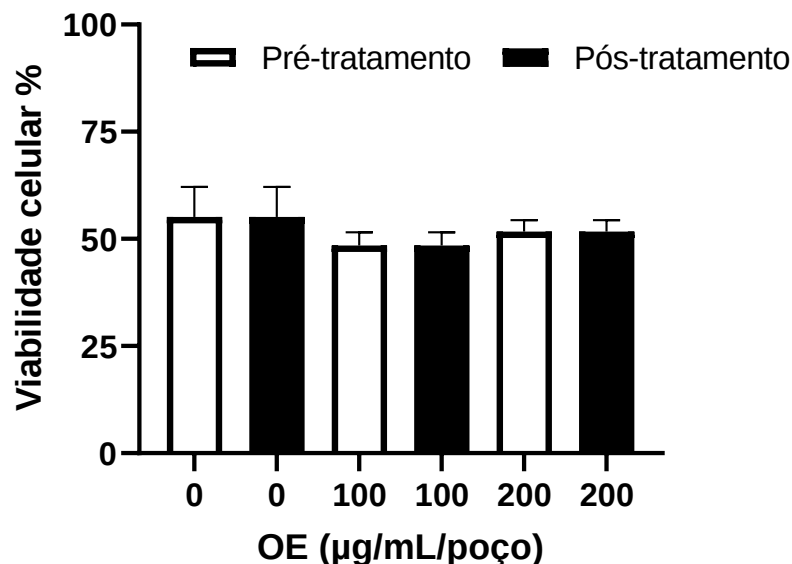
A viabilidade celular (%) foi determinada por meio dos ensaios de redução do MTT após 3 horas de exposição ao peróxido de hidrogênio. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n = 4$ por ensaio. * representa diferença estatística em relação ao controle obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett's ($p < 0,05$).

A capacidade do vapor do OE de cravo da índia para proteger as células dos danos oxidativos foi avaliada em ensaios denominados de pré-tratamento, no qual as células foram tratadas com o a fase vapor do OE previamente (por 24 horas) a indução de estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio 500 μM.

Da mesma forma a capacidade do vapor do OE de cravo da índia para promover a recuperação celular foi avaliada em ensaios de pós-tratamento, em que o óleo foi adicionado após indução do estresse oxidativo pelo período de incubação de 24 horas.

O vapor do OE de cravo da índia não foi citoprotetor ao estresse oxidativo induzido por 500 μM de peróxido de hidrogênio, pois não foi observado aumento significativo na viabilidade celular (Figura 10), tanto nos ensaios de pré-tratamento quanto nos de pós-tratamento.

Figura 10 - Ensaios de citoproteção de células MRC-5 submetidas ao estresse oxidativo com 500 μM de peróxido de hidrogênio ao pré- e pós-tratamentos com a fase vapor do OE de cravo da índia.

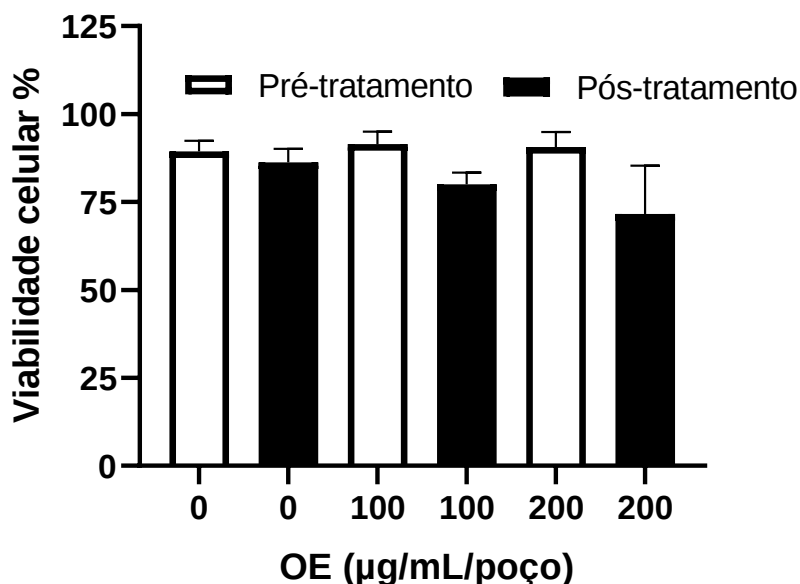


A viabilidade celular (%) foi determinada por meio do ensaio de redução do MTT conforme descrito no item 4.4 de matérias e métodos. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio. # representa diferença estatística em relação ao controle obtida por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Dunnett's ($p < 0,05$).

Bladier e colaboradores (1997) mostraram que dependendo da concentração de peróxido de hidrogênio utilizada nos ensaios, os efeitos da exposição poderiam induzir fibroblastos a senescência celular (50 a 100 μM), ou a senescência seguida de apoptose (200 μM) ou apoptose (300 a 400 μM).

Portanto, foram realizados ensaios de pré- e pós-tratamento empregando-se a concentração de 250 μM de peróxido de hidrogênio (Figura 11), cuja perda de viabilidade celular seria apenas de 15%. Nesta condição experimental o vapor do OE de cravo da índia também não foi citoprotetor.

Figura 11 - Ensaio de citoproteção de células MRC-5 submetidas ao estresse oxidativo com 250 μM de peróxido de hidrogênio e ao pré- e pós-tratamentos com a fase vapor do OE de cravo da Índia.



A viabilidade celular (%) foi determinada por meio da redução do MTT conforme descrito no item 4.4 de matérias e métodos. Os resultados são expressos como média e desvio padrão obtidos de, no mínimo, três ensaios independentes com $n=4$ por ensaio.

O peróxido de hidrogênio é conhecido por causar perda da permeabilidade de membranas, com liberação de conteúdo das organelas, que gera acúmulo de produtos citotóxicos, como enzimas hidrolíticas dos lisossomas, levando a célula à morte (WIJERATNE et. al., 2005). O estresse induzido por peróxido de hidrogênio no modelo utilizado pode ser considerado de difícil reversão devido as características próprias celulares.

Chen (1994) em experimentos de tratamento de fibroblastos imortalizados com peróxido de hidrogênio por duas horas em uma concentração de 200 μM , relatou inibição da síntese de DNA, falha da resposta a estímulos de crescimento, além de observação de características morfológicas de células senescentes.

De fato, um dos principais agentes causadores de danos ao DNA e senescência são as EROs, cuja produção ocorre, principalmente, no interior das mitocôndrias. O mecanismo de dano ao DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio

provavelmente envolve a reação dos íons Fe^{2+} ou Cu^+ , levando a formação de radicais hidroxilas (HENLE; LINN, 1997).

Frippiat e colaboradores (2001) expuseram fibroblastos de pulmão a concentração de 150 μM de peróxido de hidrogênio por duas horas, onde também relataram que após 72 horas as células entraram em senescência. Nesse estudo, as células senescentes foram identificadas pela marcação da enzima beta-galactosidase ($\beta\text{-gal}$), e quantificação dos níveis de $\text{TGF}\beta\text{-1}$, que se mostraram aumentados após a exposição ao peróxido de hidrogênio devido a ativação da proteína P38.

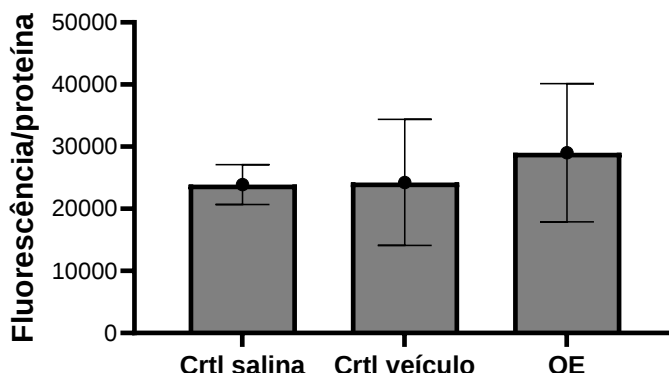
O motivo pelo qual algumas células podem se recuperar da agressão pelo estresse oxidativo e entrar novamente no ciclo celular, enquanto outras não recuperam mais a capacidade proliferativa, entrando num estado de senescência celular e morte ainda não está claro. Segundo Manuel e colaboradores (2012) uma possibilidade pode ser a heterogeneidade do dano causado no DNA pela exposição ao peróxido de hidrogênio, que é dependente do tipo celular.

Portanto, a fase vapor do OE de cravo da índia não protegeu as células MRC-5 contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio, que provavelmente foram induzidas a senescência. Todavia, caberia estudo do papel da fase vapor deste OE na diminuição da indução à senescência celular, conforme demonstrado em fibroblastos tratados com vitamina C, onde essa não protege as células, mas gerou diminuição do número de células em senescência (MANUEL, et. al., 2012).

A possível função protetora dos OE contra o estresse oxidativo, anulando os efeitos deletérios dos radicais livres, é ainda um assunto escasso e controverso na literatura. De um lado, há trabalhos que demonstram um efeito protetor (SOUSA et. al., 2004), e de outro lado, há trabalhos que sugerem um efeito pró-oxidante dos OE (SHIH et. al., 2014).

Para verificar a produção de EROs gerada intracelularmente pelo vapor do OE de cravo da índia, as células foram tratadas com a fase vapor em uma concentração não citotóxica (200 $\mu\text{g/mL}$ /poço) por 24 horas. Na Figura 12 está demonstrada a detecção da produção de EROs induzida pelo vapor do OE de cravo da índia.

Figura 12 - Efeito da fase vapor do OE de cravo da Índia na produção intracelular de EROs.



Deteção da produção de EROs em células MRC-5 tratadas com a fase vapor do OE de cravo da Índia (200 µg/mL/poço) por 24 horas. O ensaio experimental está descrito no item 4.4 de materiais e métodos. Os valores são expressos como média e desvio padrão da intensidade de fluorescência detectada pela absorvância de SRB, referente a coloração das proteínas realizada após realização do ensaio.

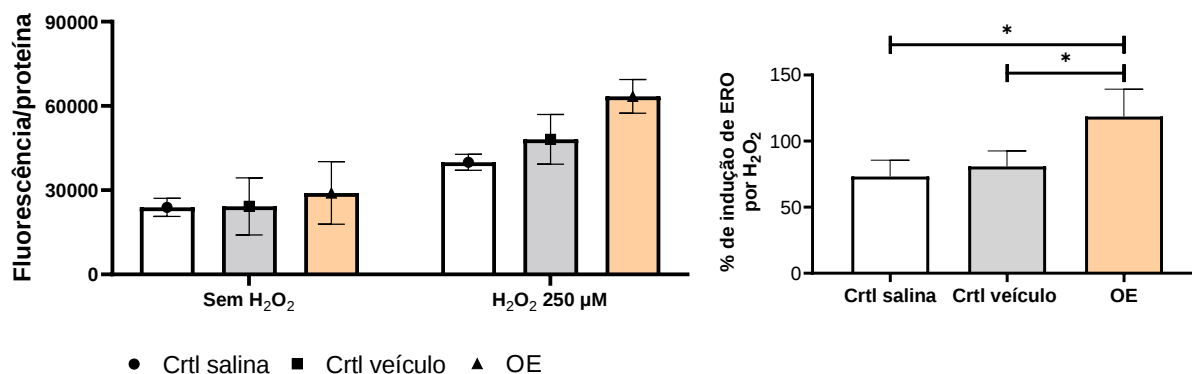
O percentual de produção de EROs em células MCR-5 tratadas com a fase vapor do OE determinada a partir dos controles (considerados 100%) salina e veículo foi de 21,5% e 19,7% respectivamente, todavia sem diferença significativa.

Segundo Fujisawa e colaboradores (2002), o eugenol por sua alta volatilidade e lipossolubilidade, atravessaria a membrana e no interior da célula seria capaz de doar o átomo de hidrogênio fenólico, e assim, estabilizar o radical peroxila.

Assumindo que o eugenol seria o composto ativo da fase vapor do OE de cravo da Índia foram realizados ensaios de detecção de EROs em células tratadas com vapor por 24 horas seguida de desafio com peróxido de hidrogênio, com o intuito de verificar se a presença do eugenol intracelularmente poderia reduzir a produção de EROs induzida pelo peróxido de hidrogênio (Figura 13).

Cabe ressaltar, que a produção de EROs pode ser induzida por peróxido de hidrogênio e, por conseguinte, utilizado como controle positivo nos ensaios que empregam DCFH-DA (ROCHA et. al., 2018).

Figura 13 - Formação de EROs em células MRC-5 tratadas e não tratadas com a fase vapor do OE de cravo da Índia na presença de peróxido de hidrogênio.



Deteção da produção de EROs em células MRC-5 tratadas com a fase vapor do OE de cravo da Índia (200 μ g/mL/poço) por 24 horas após exposição ao peróxido de hidrogênio (250 μ M), controle positivo. O ensaio experimental está descrito no item 4.4 de materiais e métodos. Os valores são expressos como média e desvio padrão da intensidade de fluorescência detectada pela absorbância de SRB, referente a coloração das proteínas realizada após realização do ensaio. No lado direito da figura está demonstrada o percentual de indução de EROs por peróxido de hidrogênio de cada grupo experimental, * $p \leq 0,05$, indica diferenças estatisticamente significativas em relação ao respectivo grupo controle.

A adição de peróxido de hidrogênio aumentou tanto a fluorescência basal dos controles, quanto a gerada pela fase vapor do OE de cravo da Índia, com indução de 73%, 80% e 118% respectivamente. Portanto, a fase vapor do OE de cravo da Índia não conseguiu reduzir a produção de EROs induzida pelo peróxido de hidrogênio e ainda aumentou a oxidação da DCFH a DCF, indicando que ao interagir com algum componente intracelular é capaz de gerar oxidantes, o que refletiu no aumento da fluorescência observado. Portanto, apresentando efeito sinérgico com o peróxido de hidrogênio.

A sonda DCFH pode ser oxidada não apenas por peróxido de hidrogênio e/ou eugenol, mas também por vários outros oxidantes celulares, como peroxidases, íons metálicos, etc. (FORMAN et. al, 2015; CHEN et. al., 2010). Senso necessário ainda confirmar a identidade do oxidante induzido pelo vapor do OE de cravo da Índia.

Como anteriormente mencionado, o eugenol por sua alta volatilidade e lipossolubilidade, atravessaria a membrana e no interior da célula seria capaz de doar o átomo de hidrogênio fenólico, e assim, estabilizar o radical peroxila (FUJISAWA et. al., 2002).

No interior da célula o eugenol é oxidado não enzimaticamente, por meio de um único elétron via radical fenoxila e pode ligar-se covalentemente a grupos tióis em proteínas. As ligações duplas são responsáveis por eliminar o radical peroxialquila e o radical superóxido, devido à diferença de potencial de redução entre o radical e o fenol (FUJISAWA et. al., 2002).

A capacidade do eugenol em inibir a formação do radical superóxido pelo sistema xantina oxidase, evita a geração de radicais hidroxila e a oxidação de Fe^{2+} na reação de Fenton (FUJISAWA et. al., 2002), portanto apresentando efeito antioxidante fisiológico relevante.

Neste sentido, estudos apontam que a produção de EROs juntamente com a presença de baixas concentrações de eugenol têm efeito na transdução de sinal e ciclo celular (BOONSTRA et. Al., 2004).

Os resultados deste trabalho, bem como dados da literatura, apontam que os OEs podem ser utilizados como alternativas terapêuticas efetivas através da aromaterapia. O uso do OE de cravo da Índia como um adjuvante no tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo não visa substituir medicamentos já comercializado, mas sim aumentar a opção terapêutica dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

A fase vapor de cravo da índia apresenta alta atividade antioxidante comprovada tanto pelos métodos de sequestro do radical DPPH e do ABTS quanto pela capacidade de redução férrica (FRAP)/quelante do íon ferro. A concentração inibitória média da fase vapor (CI_{V50}) do OE de cravo da índia calculada a partir do sequestro destes radicais foi de 22,04 $\mu\text{g/mL}$ e a 117,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Por meio de ensaios de determinação da viabilidade celular verificou-se que a fase vapor do OE de cravo da índia nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL/poço}$ não foi citotóxica para fibroblastos de pulmão MRC-5 em período de tratamentos de 24 horas, apresentando toxicidade a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL/poço}$ em ensaios de 48 horas.

Quanto ao potencial citoprotetor, a fase vapor do OE de cravo da índia não protegeu as células MRC-5 dos danos celulares resultantes de estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em ensaios de pré- e pós-tratamento.

A fase vapor do OE de cravo da índia apresentou apenas efeitos pró-oxidantes revelados pela detecção da produção de EROs quando em sinergia com peróxido de hidrogênio empregado como controle positivo da oxidação de DCFH a DCF.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. Anti-genotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. **Food Chem. Toxic.**, v. 39, p. 493-498, 2001.
- AFFONSO, R. S et. al. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**. Rio de Janeiro, v. 4, p. 146-161, 2012.
- AL-TURKI, A.I. et al. Chemical and anti-bacterial characterization of aqueous extracts of oregano, marjoram, sage and licorice and their application in milk and labneh. **Journal of Food Agriculture and Environment** v.6, p.39-44, 2008.
- AQUILANO, K., BALDELLI, S., CIRIOLO, M. R. Glutathione: new roles in redox signaling for an old antioxidant. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, p. 1-12, 2014
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BOSE, A. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. **Fitoterapia**, v.78, p.515-20, 2007.
- BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v.337, p.1-13, 2004.
- BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 1993
- CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, **Tecmedd**, 2004.
- CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Free Radical. **Biol. Med.** v. 22, p. 749, 1997.
- CHAIEB, K.; HAJLAOUI, H.; ZMANTAR, T.; KAHLA-NAKBI, A.B.; ROUABHIA, M.; MAHDOUANI, K.; BAKHROUF, A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum*, L. Myrtaceae): a short review. **Phytotherapy research**, v.21, p.501-506, 2007.
- CIESLA, L. M.; WOJTUNIK-KULESZA, K. A.; ONISZCZUK, A.; WAKSMUNDZKAHAJNOS, M. Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, p. 412-419, 2016.
- CRAFT, B. D.; KERRIHARD, A. L.; AMAROWICZ, R. Phenol-based antioxidants and the in vitro methods used for their assessment. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, p. 148-173, 2012.

CUNHA, A. P., et al. **Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações**, Lisboa. 2012.

DAVIES, K.J. **Oxidative stress: the paradox of aerobic life**. Biochemical Society Symposium, v.6, p. 1–31, 1995.

DIAS, S.; SILVA, R. Perfumes, uma química inesquecível. **Química Nova na Escola**. São Paulo, v. 4, p. 1-4, 1996.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811-819, 2015.

ESCOBAR, R. G. Eugenol: Propriedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Cubana Estomatol**, 2002.

FARAH, C. S.; BHATIA, N.; JOHN, K.; LEE, B. W. Minimum intervention dentistry in oral medicine. **Australian Dental Journal**, v.58, p. 85–94, 2013.

FENG, J; LIPTON, J. M. Eugenol: antipyretic activity in rabbits. **Neuropharmac**.v.26 p.1775-1778, 1987.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista de Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FUJISAWA, S.; ATSUMI, T.; KADOMA, Y.; SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v.177, p.39-54, 2002.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of eugenol: a structure – activity relationship study. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 975-985, 2011.

HALLIWELL, B. Vitamin C: poison, prophylactic or panacea? **Trends in Biochemical Sciences**, 1999.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. **Hydrogen peroxide in the human body**. v. 486, p. 10-13, 2000.

HEMPEL, S. L., BUETTNER, G. R., O'MALLEY, Y. Q., WESSELS, D. A., FLAHERTY, D. M. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: Comparasin with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. **Free Radic. Biol. Med.** 1999.

HOFF, P. M. G. et al. **Tratado de oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013.

JUSTO, O. R. et al. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, v. 31, p. 1699-1705, 2008.

KAILEH, M. et al. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 510-6, 2007.

KOHEN, R., NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative estress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**. 2002

KORUKLUOGLU, M. et al. Antifungal properties of olive leaf extracts and their phenolic compounds. **Journal of Food Safety**, v.28, p.76-87, 2008

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUSKOSKI E. M.; ASUERO A. G.; TRONCOSO A. M. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Cien Tecnol Aliment**. 2005.

LAUTRAITE, S., BIGOT-LASSERRE, D., BARS, R. CARMICHAEL, N. Optimisasio of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. **Toxicol. Vitr**. 2003.

LE PECHOUX C, DUNANT A, SENAN S, WOLFSON A, QUOIX E, FAIVRE-FINN C, et al. Standard-dose versus higher-dose prophylactic cranial irradiation (PCI) in patients with limited-stage small-cell lung cancer in complete remission after chemotherapy and thoracic radiotherapy a randomised clinical trial. **The lancet oncology**. 2009

LEE, M.H; YEON, K.Y; PARK, C.K; LI, H.Y; FANG, Z; KIM, M.S; CHOI, S.Y; LEE, S.J; LEE, S; PARK, K; LEE, J.H; KIM, J.S; OH, S.B. Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. **Jounal. Dent. Res.**, v. 84, p. 848-851, 2005.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (caryocar brasiliense, camb.)**. Tese Doutorado em Bromatologia - Universidade de São Paulo; 2008.

MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da; YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, p. 84-94, 2009.

MARKOWITZ, K; MOYNIHAN, M; LIU, M; KIM, S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol. **A clinically oriented review. Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.** v. 73, p. 729-37, 1992.

MICELI, N., TROVATO, A., DUGO, P., CACCIOLA, F., DONATO, P., MARINO, A., ELLINGHIERI, V. B., LA BARBERA, T. M., GUVENC, A., AND TAVIANO, M. F. Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. **Turkey Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009.

MILLER N J, RICE-EVANS CA, DAVIES MJ, GOPINATHANN V, MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin Sci.** v. 84, p. 407-12. 1993.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de diversas plantas.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de lavras. 2010.

MIRANDA, C. A. S. F.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies; propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento de espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, p. 213-220, 2016.

OKADO-MATSUMOTO, A., FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver. Cu, Zn-SOD in mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, 2001.

OLIVEIRA, M. C. de; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1333-1342, 2010.

PRADO A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais.** Dissertação [Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos] - Universidade de São Paulo. 2009.

ROCHA, C. M. R.; LEITÃO, A. **Avaliação dos efeitos tóxicos de novas substâncias bioativas: detecção de estresse oxidativo e mutagenicidade.** 2018. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018. Disponível em: < <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/82/82131/tde-29082018-143122/> >.

ROMPELBERG, C. J; PLOEMEN, J. H; JESPERSE, S; VAN DER GREEF, J.; VERHAGEN, H; VAN BLADEREN, P. J. Inhibition of rat, mouse and human glutathione S-transferase by eugenol and its oxidation products. **Chem. Biol. Interact.**, v. 5, p. 85-97, 1996.

SENANAYAKE, U.M; WILLS, B.H; Lee, T.H. Biosynthesis of eugenol and cinnamic aldehyde in *Cinnamomum zeylanicum*. **Phytoch.** v.16, p. 2032-2033, 1977.

SHAMI NJIE, MOREIRA EAM. Licopeno como agente antioxidante. **Revista Nutrição.** v.17, p. 227-36. 2007.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo da Índia, citronela e palmarosa. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, p.442-449, 2009.

SHIMADA K, FUJIKAWA K, YAHARA K, NAKAMURA T. Antioxidative properties of xanthan on the auto-oxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*. v. 40, p. 945-948. 1992.

SILVA, A. M. O.; ANDRADE-WARTHA, E. R.; CARVALHO, E. B. T. L. et. al. Efeito do extrato aquoso de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o estresse oxidativo em ratos diabéticos. *Revista de Nutrição*, v.24, p. 121-130, 2011

SILVA-SANTOS, A., ANTUNES, A.M.S.; BIZZO, H.R.; D'AVILA, L.A.; Análise técnica, econômica e de tendências da indústria brasileira de óleos essenciais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, 2006.

SILVA, T.C.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, S.J.O. Extração de Eugenol a partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. *Revista Crase.edu*: Goiás, v. 1, p. 1-12, 2011.

SIMÕES C M O. SCHENKEL E. P, GOSMANN, G, MELLO J C P, MENTZ L A, PETROVICK P R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre. Ed da Universidade UFRGS. 2001

SIMÕES, C.M.O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, et. al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SOSA, V., MOLINÉ, T., SOMOZA, R., PACIUCCI, R., KONDOH, H., LLEONART, M. E. 2013. Oxidative stress and cancer: an overview. *Ageing Research Reviews*, v. 12, p. 376-390. 2013.

STRAIN JJ. The ferric reducing ability of plasma (Frap) as a measure of antioxidant power: the frap assay. *Anal Biochem*. 1996.

TAKAYAMA, C.; DE-FARIA, F. M.; ALMEIDA, A. C. A. et. al. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2016

TRANCOSO, M.D. Projeto Óleos Essenciais: extração, importância e aplicações no cotidiano. *Revista Práxis*: Rio de Janeiro, 2013.

ZHOU, D.; SHAO, L.; & SPITZ. D. R. Reactive Oxygen Species in Normal and Tumor Stem Cells. *Adv Cancer Res*. v.122, p. 1-67. 2014.