

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Mariana Piana

**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E
ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Solanum corymbiflorum***

Santa Maria, RS

2017

Mariana Piana

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE
Solanum corymbiflorum

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane de Freitas Bauermann

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Piana, Mariana
Avaliação fitoquímica, antioxidante e anti-inflamatória de *Solanum corymbiflorum* / Mariana Piana.- 2017.
56 p.; 30 cm

Orientadora: Liliâne de Freitas Bauermann
Coorientadora: Sara Marchesan de Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

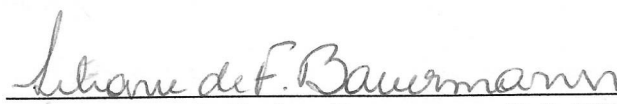
1. *Cyphomandra corymbiflora* 2. baga-de-veado 3. dermatite 4. ácido clorogênico I. de Freitas Bauermann, Liliâne II. Marchesan de Oliveira, Sara III. Título.

Mariana Piana

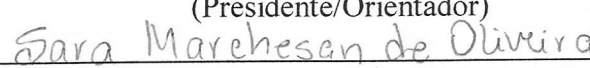
**AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE
*Solanum corymbiflorum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Farmacêuticas**.

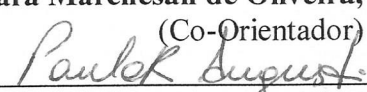
Aprovada em 20 de fevereiro de 2017:



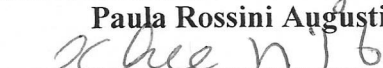
Liliane de Freitas Bauermann, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



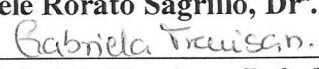
Sara Marchesan de Oliveira, Dr^a. (UFSM)
(Co-Orientador)



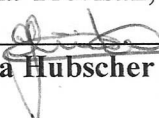
Paula Rossini Augusti, Dr^a. (UFRGS)



Michele Rorato Sagrillo, Dr^a. (UNIFRA)



Gabriela Trevisan, Dr^a. (UFSM)



Gilberti Helena Hubscher Lopes, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico à minha mãe Ivanilda, a meu pai Wilson e a meus irmãos Mercedita e Mateus que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente e por me fazer acreditar que tudo é possível.

Agradeço às orientadoras Liliane de Freitas Bauermann, Margareth Linde Athayde (*in memoriam*) e Sara Marchesan de Oliveira pelo apoio concedido nos momentos difíceis, pela motivação, amizade e confiança, pela acolhida e oportunidades concedidas e demais aspectos relacionados a orientação.

Aos meus pais Vilson Aires Piana e Ivanilda Rafain Piana pelo amor, pelos exemplos de força e superação, pelos valores morais e éticos que norteiam minhas ações e pelo incentivo à busca de conhecimento e desenvolvimento de minha vida acadêmica. Aos meus irmãos Mercedita Piana Marquadt e Mateus Piana pelo total apoio e incentivo. As minhas avós por todo carinho e pelo conhecimento etnofarmacológico transmitido. Ao Christian e a Lenira pelo incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica, pelo incansável incentivo, companheirismo, e também suporte prático e teórico.

Aos colaboradores da pesquisa: Camila Camponogara, Sílvio Terra Stefanello e professor Michel Mansur Machado.

Ao professor Renato Aquino Záchia, do Departamento de Biologia da UFSM, pela identificação da espécie em estudo.

A CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria, aos professores e aos técnico-administrativos que diariamente com zelo executam suas atribuições e também cooperaram de forma direta e indireta no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que, de alguma maneira, com seu apoio, tempo e atenção, transmitiram energia e confiança sem os quais a jornada seria mais difícil.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me
apoiei sobre os ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

RESUMO

AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Solanum corymbiflorum*

AUTORA: MARIANA PIANA

ORIENTADORA: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

As plantas possuem compostos que estão relacionados a diferentes atividades biológicas. Entre estes compostos, destacam-se os compostos fenólicos que são capazes de eliminar radicais livres, e portanto, estão envolvidos em várias reações como a redução da oxidação de lipídios e proteínas. Desta forma, estes compostos estão associados à prevenção e tratamento de várias doenças relacionadas à processos inflamatórios. A *Solanum corymbiflorum*, conhecida popularmente como baga-de-veado, é utilizada na medicina popular como anti-inflamatória e até o momento não existem estudos relacionados a essa espécie. Assim, o objetivo desse estudo foi quantificar metabólitos secundários, avaliar a atividade antioxidante e anti-inflamatória dessa espécie. Em análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato bruto (EB) e frações das folhas, e frações dos frutos observou-se a presença de ácido cafeico, ácido gálico, rutina e ácido clorogênico. Esse último foi encontrado em grande quantidade no EB das folhas e na fração acetato de etila (AcOEt) dos frutos. Compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e alcaloides foram quantificados por espectrofotometria. Para as folhas, o EB apresentou maior quantidade de polifenóis, assim como melhores resultados relacionados à capacidade antioxidante pela inibição do radical 2,2-difenil, 1-picrihidrazila (DPPH). A fração clorofórmica (CHCl₃) das folhas mostrou maior quantidade de alcaloides e melhor redução de marcadores do estresse oxidativo (oxidação da diacetato de diclorofluoresceína-DCFH-DA e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico-TBARS). Os mesmos resultados foram encontrados para as frações AcOEt e CHCl₃ dos frutos as quais apresentaram maior quantidade de polifenóis e alcaloides, respectivamente. O EB das folhas foi utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória após aplicação tópica do agente irritante óleo de cróton. Esta atividade anti-inflamatória foi verificada através da medida do edema de orelha (inibição de 87±3%) e da avaliação da infiltração de neutrófilos, verificada pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) (redução de 45±7%). Então, as folhas e frutos de *S. corymbiflorum* possuem pronunciada atividade antioxidante avaliada por diferentes métodos de estresse oxidativo e o EB das folhas apresentou atividade anti-edematogênica e anti-inflamatória comprovando o uso popular da espécie para o tratamento de doenças inflamatórias de pele.

Palavras chaves: *Cyphomandra corymbiflora*, baga-de-veado, dermatite, ácido clorogênico

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EVALUATION OF *Solanum corymbiflorum*

AUTHOR: MARIANA PIANA
ADVISER: LILIANE DE FREITAS BAUERMANN

The plants have compounds that are related to different biological activities. Among these compounds, stand out the phenolic compounds which are capable of eliminate free radicals, and therefore, are involved in several reactions as reduction of the lipids and proteins oxidation. This way, these compounds are associated to prevention and treatment of various diseases related to inflammatory processes. The *Solanum corymbiflorum*, popularly known as *baga-de-veado*, is used in the folk medicine as anti-inflammatory and until the moment there are no studies related to this species. So, the aim of this study was quantify secondary metabolites, evaluate the antioxidant and anti-inflammatory activities of this species. In analysis by high performance liquid chromatography (HPLC) of the crude extract (CE) and fractions of the leaves, and fractions of the fruits observed the presence of caffeic acid, gallic acid, rutin and chlorogenic acid. This last was found in large quantity in the leaves CE and in the ethyl acetate (AcOEt) fraction of the fruits. Phenolic compounds, flavonoids, condensed tannins and alkaloids were quantified by spectrophotometry. For the leaves, the CE presented higher amounts of polyphenols, as well as better results related to antioxidant capacity by radical 2,2-diphenyl, 1-picrihidrazila (DPPH) inhibition. The chloroform fraction (CHCl₃) of the leaves showed higher amount of alkaloids and better reduction of markers of oxidative stress (oxidation of the dichlorofluorescein diacetate–DCFH-DA and substances reactive to thiobarbituric acid–TBARS). The same results were found for the AcOEt and CHCl₃ fractions of the fruits that presented higher amount of polyphenols and alkaloids, respectively. The CE of the leaves was used for evaluation of the anti-inflammatory activity after topical application of the irritating agent croton oil. This anti-inflammatory activity was verified through the measurement of ear edema (inhibition of 87±3%) and of the leukocyte infiltration evaluation, verified by enzyme myeloperoxidase activity (MPO) (reduction of 45±7%). Then, the leaves and fruits of *S. corymbiflorum* have pronounced antioxidant activity evaluated by different methods of oxidative stress and the leaves CE presented anti-edematogenic and anti-inflammatory activities, proving the popular use of the species for the treatment of inflammatory skin diseases.

Keywords: *Cyphomandra corymbiflora*, *baga-de-veado*, dermatites, chlorogenic acid

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Descrição da planta	12
2.2	Família Solanaceae	12
2.2.1	Gênero <i>Solanum</i>	13
2.2.2	<i>Solanum corymbiflorum</i>	14
2.2.3	Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	15
2.3	Inflamação	17
2.4	Metabólitos vegetais das plantas	19
3.	OBJETIVOS	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos	24
	APRESENTAÇÃO	25
4.	RESULTADOS	26
	Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of <i>Solanum corymbiflorum</i> Fractions (Leaves and Fruits)	27
	Topical anti-inflammatory activity of <i>Solanum corymbiflorum</i> leaves	34
5.	DISCUSSÃO GERAL	40
6.	CONCLUSÃO	44
7.	PERSPECTIVAS	45
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	54
	ANEXO B – LICENÇA PARA REUTILIZAÇÃO DO ARTIGO “Topical anti-inflammatory activity of <i>Solanum corymbiflorum</i> leaves”	55

1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto à civilização humana, e por muito tempo produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico contra doenças (EISENBERG et al., 1998; RATES, 2001). Foi a partir de estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, baseados na medicina tradicional que surgiram os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como a digitoxina (isolada da *Digitalis purpurea*), a morfina (isolada dos frutos imaturos da espécie *Papaver somniferum*), a quinina (isolada das cascas da *Cinchona officinalis*) e a pilocarpina (extraída das folhas do gênero *Pilocarpus*) (BUTLER, 2004).

Inúmeras espécies vegetais foram incorporadas à medicina tradicional pelo acaso ou pelo uso empírico de espécies vegetais, seguido da avaliação mesmo que rústica, dos sinais e sintomas que apareciam após seu consumo, até selecionar pela qualidade das respostas se determinada espécie seria útil ou não (MING, 1996; BARBOSA et al., 2012).

Segundo Spjut e Perdue Junior (1976), a seleção etnofarmacológica favorece com maior probabilidade a descoberta de novas substâncias bioativas, por apresentar alta porcentagem de acerto em testes investigativos. Tal fato foi verificado quando esses autores analisaram drogas anticâncer e relataram que foram descobertas duas vezes mais espécies para essa doença, partindo-se das pesquisas etnofarmacológicas do que das escolhidas ao acaso.

Planta medicinal, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é “todo ou qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com finalidades terapêuticas ou sejam precursores de fármacos semissintéticos”. Esse conceito não pode ser confundido com o de fitoterápicos que, de acordo com a RDC N. 14, de 31 de março de 2010, são “os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas”.

Os produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma matéria-prima vegetal em um fitoterápico deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para garantir esses objetivos a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos,

toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 1999; BRUM et al., 2011).

O interesse pela pesquisa de extratos vegetais com diferentes atividades biológicas tem aumentado muito nos últimos anos (SILVA et al., 2012). Entre essas atividades, a capacidade de eliminar radicais livres (RLs) é uma das mais estudadas porque a presença exacerbada desses compostos está associada a várias reações como a mutação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a oxidação de proteínas e lipídeos (SANTOS et al., 2010). Desta forma, os RLs estão envolvidos no desenvolvimento de várias doenças como aterosclerose, cardiopatias, câncer, bem como nas inflamações (NUNES; ABREU, 2012).

Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de mediadores e enzimas inflamatórias, e também de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desta forma, moléculas ou plantas que possam reduzir a liberação desses mediadores ou eliminar essas EROs são consideradas promissoras no tratamento de inflamações e têm atraído a atenção de muitos pesquisadores (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016).

Neste sentido, são de grande interesse para a pesquisa científica as plantas utilizadas na medicina tradicional que possuam compostos antioxidantes (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos) pois essas espécies podem inibir e/ou impedir a progressão de processos inflamatórios através da eliminação de RLs, e conseqüentemente a redução dos processos oxidativos em proteínas e lipídios (DALLE-DONE et al., 2003; MAHESHWARI et al., 2011). A espécie *Solanum corymbiflorum* (Sendtn.) Bohs, conhecida popularmente como baga-de-veado, é muito utilizada por indígenas para o tratamento de processos inflamatórios, no entanto, até o momento não existem estudos relacionando seus compostos fitoquímicos a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Descrição da planta

2.1.1 Família Solanaceae

A família Solanaceae é constituída por cerca de 3.000 espécies distribuídas em 106 gêneros, com distribuição cosmopolita, sendo a América do Sul um dos principais centros endêmicos e de diversidade (AGRA; NURIT-SILVA; BERGER, 2009). Está representada no Rio Grande do Sul por 28 gêneros, destes, 23 apresentam espécies nativas, enquanto 5 são representados exclusivamente por espécies introduzidas (SOARES; VIGNOLI-SILVA; MENTZ, 2011).

De um modo geral, as Solanáceas são constituídas por compostos que apresentam ação tóxica para o homem, animais e alguns micro-organismos, com destaque para os alcaloides como a solanina, a nicotina e seus derivados, anabastina, solanocapsina, além de glicosídeos esteroidais e nitratos (KISSMANN; GROTH, 2000). Várias espécies são cultivadas para a extração destes metabólitos que possuem aplicações medicinais e apresentam grande interesse de pesquisadores em virtude da utilização abundante na medicina popular (BARBOSA et al., 2012).

Por apresentarem metabólitos secundários com significativa toxicidade, as Solanáceas são citadas como controladoras de insetos, tais como: *Nicandra physaloides* contra moscas; *Nicotiana tabacum* contra vários insetos; *Datura stramonium* no controle da cigarrinha verde; as folhas de *Lycopersicum esculentum* para o controle da mariposa branca (LOVATTO; GOETZE; THOMÉ, 2004). Outras espécies possuem grande importância econômica e agrícola, sendo que várias delas se destacam por seu caráter alimentício como *Solanum tuberosum* L. (batata-inglesa), *Solanum melongena* L. (berinjela), *Lycopersicum esculentum* L. (tomate) e *Capsicum annuum* L. (pimentão) (ALBUQUERQUE; VELAZQUEZ; VASCONCELLOS-NETO, 2006). Além disso, são fonte de substâncias de interesse farmacológico como a atropina (*Atropa belladonna* L.) e a hiosciamina (*Hyoscyamus niger* L.) (SILVA; AGRA, 2005) utilizadas na clínica médica devido às suas atividades anticolinérgicas e antiespasmódica, respectivamente (NEGRI, 2011).

2.1.2 Gênero *Solanum*

O gênero *Solanum* é o maior e mais complexo da família Solanaceae, com cerca de 1.500 espécies (MELO et al., 2011; VORONTSOVA; KNAPP, 2012). O nome *Solanum*, segundo alguns autores, é originado do latim *Solamen*, que significa consolo, alívio, referindo-se às propriedades sedativas atribuídas a algumas espécies (SACCO et al., 1985).

As plantas desse gênero destacam-se pela capacidade de biossintetizar esteroides e alcaloides livres ou na forma de heterosídeos, metabólitos secundários estruturalmente diversificados e complexos. Muitos destes compostos são de interesse terapêutico porque apresentam diversas atividades, como citotóxica, anti-inflamatória e antiulcerogênica (PINTO et al., 2011).

Além dos alcaloides, neste gênero são produzidos diferentes metabólitos secundários com importância terapêutica e comercial, como os compostos fenólicos, aos quais são atribuídas diferentes ações farmacológicas e de proteção do vegetal contra fitopatógenos (BLANKEMEYER et al., 1998).

As espécies do gênero *Solanum* possuem diferentes propriedades farmacológicas, *Solanum americanum* é utilizada popularmente como analgésica, sedativa, expectorante, afrodisíaca, diurética, emoliente e depurativa. Além de ser um vermífugo eficaz, é empregada também como cicatrizante, para psoríase e eczema (LORENZI; MATOS, 2002). Já a espécie *Solanum aethiopicum* é utilizada na medicina popular como purgante, sedativa, antidiabética e anti-inflamatória (ANOSIKE; OBIDOA; EZEANYIKA, 2012). A *Solanum melongena* apresenta atividades antioxidante, analgésica e hipolipidêmica (HAN et al., 2003) e a *Solanum chrysotrichum* é utilizada em doenças fúngicas de pele (AGUILAR-SANTAMARÍA et al., 2013).

A solamargina e solasonina são glicoalcaloides predominantes nas espécies de *Solanum* aos quais são atribuídos seus efeitos terapêuticos. Além disso, apresentam grande importância econômica, uma vez que a parte esteroidal aglicônica, a solasodina, é amplamente utilizada como matéria prima inicial para a síntese de fármacos esteroidais (SOARES-MOTA et al., 2010).

A presença desses glicoalcaloides esteroídicos no gênero *Solanum* está relacionada não somente com a atividade biológica, mas também ao perfil toxicológico de várias espécies e são importantes indicadores taxômicos da família (COUTINHO, 2009). Entre os compostos isolados no gênero *Solanum*, o cafeato de metila isolado a partir do extrato metanólico dos frutos de *Solanum torvum*, apresentou moderada atividade antibacteriana, antifúngica, e

também uma potente atividade *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* confirmando o uso popular dessa espécie (BALACHANDRAN et al., 2012).

Em outro estudo, o lupeol, o ácido protocatequico e o ácido transcinâmico foram isolados do extrato clorofórmico de *Solanum spirale*, e nele o lupeol apresentou atividades anticâncer para uma das linhagens de células utilizadas (KEAWSA-ARD et al., 2012).

2.1.3 *Solanum corymbiflorum*

A espécie *S. corymbiflorum* (Figura 1) frequentemente encontrada na literatura sob a designação de *Cyphomandra corymbiflora* (SOARES; MENTZ, 2006) é conhecida popularmente como baga-de-veado, (KINUPP, 2007), baga-de-bugre, *õryva*, *manduchu*, *kururu ka'a* e *yryvu ka'a* (KELLER; PRANCE, 2012). Está presente nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul no Brasil; (SOARES; MENTZ, 2006) e também na Argentina (KELLER, 2003). Apresenta-se na forma de arbustos ou arvoretas de 0,8 – 1,5 m de altura. A lâmina foliar inteira possui consistência membranácea, com 2,4 – 24,8 cm de comprimento e 1,6 – 17,9 cm de largura. Seus frutos são verdes amarelados ou amarelos (KELLER; PRANCE, 2012), possui forma elipsóide a globoso, com até 6,5 cm de altura e até 3 cm de diâmetro (SOARES; MENTZ, 2006).

Os frutos dessa espécie são consumidos frescos em comunidades Guaranis (KELLER; PRANCE, 2012) e foram citados como comestíveis por Smith e Downs (1966). Segundo Kinupp (2007), os frutos que são comestíveis e não convencionais, maduros com polpa esverdeada possuem sabor dulcíssimo e aroma agradável, na forma de sucos apresentam leve espumação possuindo potencial para fabricação de doces em calda, geleias, licores e outras sobremesas. De acordo com alguns relatos de moradores da região do Alto Uruguai (Rio Grande do Sul), os frutos são utilizados sobre ferimentos inflamados, principalmente nos membros inferiores, com o objetivo de diminuir a inflamação.

Keller e Prance (2012) realizaram pesquisas em comunidades indígenas e foram informados que a decocção das folhas de *S. corymbiflorum* é utilizada para tratamento de transtornos cardíacos, especialmente para taquicardia. As folhas são usadas para tratamento de feridas na pele decorrentes da mordida de carrapatos e sarna, e também são adicionadas às bebidas alcoólicas com o intuito de incentivar o abandono do alcoolismo. Além disso, são aplicadas na forma de cataplasma quente e friccionadas para aliviar dores de cabeça e nas costas, em furúnculos e vários tipos de inflamações, tais como mastite, otite e inflamação nos pés. Na forma de chá, as folhas podem auxiliar no tratamento de cálculos renais

(REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, 2008). Entretanto, até o momento não existem estudos relacionados a sua composição fitoquímica e a comprovação de seu uso terapêutico popular.

Figura 1 - *Solanum corymbiflorum*, amostra coletada no município de Gaurama/RS.



Fonte: Arquivo pessoal

Quando ocorre processos inflamatórios ou outros transtornos como os citados acima, são produzidos RLs como as ERO pelo organismo humano, essas moléculas podem ser mediadores de várias doenças como câncer, aterosclerose, doenças auto-imunes, artrite reumatóide, entre outras (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.2 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

Os compostos orgânicos, inorgânicos e os átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, com existência independente, podem ser classificados como RLs. Essas estruturas químicas apresentam alta instabilidade energética e cinética, e para manterem-se estáveis precisam doar ou retirar elétrons de outra molécula (HALLIWELL, 1994; COTINGUIBA et al., 2013).

O organismo humano sofre ação constante de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas por alguma disfunção biológica ou proveniente do meio ambiente. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO•), superóxido

($O_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Entre as ERN incluem-se o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$). Enquanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outros são reativos apenas com os lipídios (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A produção de ERO e ERN entre outras espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano e tem importante função biológica, como na fagocitose, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor. Por outro lado, quando ocorre um desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, a produção exacerbada dessas espécies resulta no estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007).

Esse desequilíbrio tem indicado o papel chave dos RLs e de outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento, doenças autoimunes, doenças infecciosas e/ou inflamatórias, câncer, doenças cardiovasculares, hepatopatias, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ABRAHÃO et al., 2010; PEREIRA; CARDOSO, 2012). No entanto, o organismo possui antioxidantes que são produzidos ou absorvidos da dieta (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009). Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, como a glutatona peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase (FINKEL; HOLBROOK, 2000) ou não enzimaticamente como a glutatona, os peptídeos de histidina, as proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), o ácido diidrolipoico e o ubiquinol-10. Além desses agentes não enzimáticos, o organismo utiliza antioxidantes provenientes da dieta como o α -tocoferol, o β -caroteno, o ácido ascórbico, e os compostos fenólicos no qual se destacam os ácidos fenólicos e os flavonoides (HALLIWELL et al., 1995; BARREIROS DAVID; DAVID, 2006).

Levando em consideração a importância desse processo, os estudos da avaliação do estresse oxidativo como a oxidação de lipídeos e proteínas vêm adquirindo relevância, pois são importantes ferramentas utilizadas na elucidação dos mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo (REYES et al., 2006).

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos RLs sobre os lipídios insaturados das membranas celulares. O resultado dessa reação é a formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal e os isoprostanos. Esses compostos gerados podem causar alterações nas membranas, levando a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias. Isso resulta na redução da seletividade para a entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, em alterações do DNA e no

comprometimento dos componentes da matriz extracelular (proteoglicanos, colágeno e elastina) (LIMA; ABDALLA, 2001; COTINGUIBA et al., 2013).

O dano oxidativo em proteínas constitui um processo em que os aminoácidos são oxidados por espécies reativas (DALLE-DONNE et al., 2003; BARBOSA et al., 2010) diretamente pela oxidação dos resíduos de lisina, arginina, prolina e treonina, gerando derivados carbonilados (RADAK et al., 2011), ou indiretamente mediante ligação de glicose (processo de glicooxidação) ou ligação a aldeídos (inclusive aqueles formados durante a peroxidação lipídica) (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). O aumento exponencial desses grupos está associado a diversas patologias inflamatórias como artrite reumatóide, fibrose cística, lúpus eritematoso sistêmico e diabetes (RADAK et al., 2011).

A peroxidação lipídica produz também ácidos graxos poliinsaturados, na forma livre ou esterificada, esses compostos estão ligados a geração de eicosanoides pró-inflamatórios como as lipoxigenases, ciclooxigenases, e monooxigenases do citocromo P450 que são consideradas as principais participantes enzimáticas de reações inflamatórias. Essas moléculas podem fazer parte do processo fisiológico normal e também dos processos fisiopatológicos como em doenças inflamatórias agudas e crônicas (ZHANG et al. 2002). Assim, a peroxidação lipídica e a formação de seus produtos estão relacionados aos processos inflamatórios.

2.3 Inflamação

A inflamação é definida como uma resposta fisiopatológica imune e complexa, resultante da reação a uma lesão celular ou tecidual num determinado local. Resulta da resposta a um variado conjunto de agentes, nomeadamente, físicos (traumas, queimaduras, radiação e cirurgias), biológicos (micro-organismos infecciosos e reações imunológicas) e químicos (substâncias cáusticas e irritantes) (STICKEL; PATSENKER; SCHUPPAN, 2005).

A exposição das células aos patógenos e à lesão tecidual induz a produção e a liberação de diversos mediadores químicos, que são responsáveis pelas características do processo inflamatório (dor, calor, rubor, edema e perda de função) (MEDZHITOV et al., 2010) e também por eliminar os estímulos prejudiciais, afim de permitir a manutenção da homeostase (ALESSANDRI et al., 2013).

O primeiro passo da cascata inflamatória é uma resposta vascular com hiperemia e aumento da permeabilidade da parede vascular. Inicialmente, uma vasoconstrição arteriolar transitória é observada e promovida pela contração de músculos lisos. Subsequentemente,

uma vasodilatação arteriolar leva a um aumento do fluxo sanguíneo para a área lesionada resultando em hiperemia local. Nesta fase inicial as alterações no endotélio vascular são detectáveis com consequente exsudação de proteínas plasmáticas do sangue para dentro do tecido (meio extravascular) desencadeando a formação de edema (PETERS et al., 2006; ALESSANDRI et al., 2013).

Na fase seguinte, ocorre a quimiotaxia caracterizada pela migração de leucócitos da circulação para o tecido (interstício), essas células podem ser fontes de substâncias que incluem citocinas, quimiocinas e ROS (FRANGOIANNIS; SMITH; ENTMAN, 2002; ALESSANDRI et al., 2013). Em seguida ocorre a resolução da inflamação pela apoptose de granulócitos e seu reconhecimento e remoção por fagócitos circundantes (macrófagos) (ALESSANDRI et al., 2013).

Embora a inflamação seja principalmente um processo fisiológico e benéfico, os processos inflamatórios não resolvidos podem estar envolvidos na patogênese e progressão de muitas doenças inflamatórias incluindo aterosclerose, esclerose múltipla, asma, doenças neurodegenerativas e câncer (PETERS et al., 2006). Então, se uma inflamação aguda desregulada progredir para uma situação crônica, isso poderá eventualmente resultar em fibrose. Assim, a indução de apoptose de granulócitos pode ser benéfica no controle de doenças inflamatórias agudas.

Para avaliar a resolução do processo inflamatório, tem sido investigado os níveis de mieloperoxidase (MPO) que é uma das enzimas presente em leucócitos. Sua síntese ocorre durante a diferenciação mieloide na medula óssea e desta forma é encontrada predominantemente em neutrófilos. Essa enzima desempenha um papel crucial na inflamação e no estresse oxidativo a nível celular (ANATOLIOTAKIS et al., 2013) porque possui a capacidade de catalisar a conversão de peróxido de hidrogênio e íons cloreto em ácido hipocloroso (um oxidante reativo) que promove reações de oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Consequentemente a MPO está envolvida na lesão tecidual e na inflamação, por isso tem sido utilizada na área científica como um marcador de infiltração de neutrófilos em processos inflamatórios (DAVIES, 2010).

As dermatites integram um grupo de dermatoses inflamatórias cujo processo básico é um fenômeno sero-exsudativo que acomete epiderme e derme papilar. Cursam com eritema, edema, vesículas, crostas e descamação, caracterizando o eczema; e possuem como principal sintoma o prurido e a evidenciação das linhas da pele ou liquenificação (FERREIRA et al. 2014). Os medicamentos indicados com maior frequência para o tratamento das dermatites são os corticosteroides que possuem como mecanismo de ação a redução da quimiotaxia

leucocitária, inibição da fosfolipase A₂, inibição da formação das prostaglandinas e leucotrienos, redução da síntese de moléculas pró-inflamatórias como citocinas, interleucinas e proteases, e redução da permeabilidade capilar (MOTTA et al, 2011).

No entanto esses agentes podem desencadear vários efeitos adversos, os mais frequentes da terapia tópica são atrofia, estrias, rosácea, dermatite perioral, acne e púrpura. Aqueles que ocorrem com menor frequência incluem hipertricoses, alterações de pigmentação, cicatrização tardia das feridas e exacerbação de infecções cutâneas. Reações sistêmicas como hiperglicemia, glaucoma e insuficiência adrenal também podem ocorrer na aplicação tópica (HENGGE et al. 2006). Então, devido a grande quantidade de efeitos adversos causados por esses medicamentos, é de grande importância o estudo de plantas medicinais que possuam atividade anti-inflamatória tópica e que apresentem menores efeitos adversos ao organismo. Além disso, essas plantas podem ser uma alternativa terapêutica com menores custos em países em desenvolvimento, onde a maior parte da população não tem acesso à medicamentos sintéticos devido ao seu alto custo.

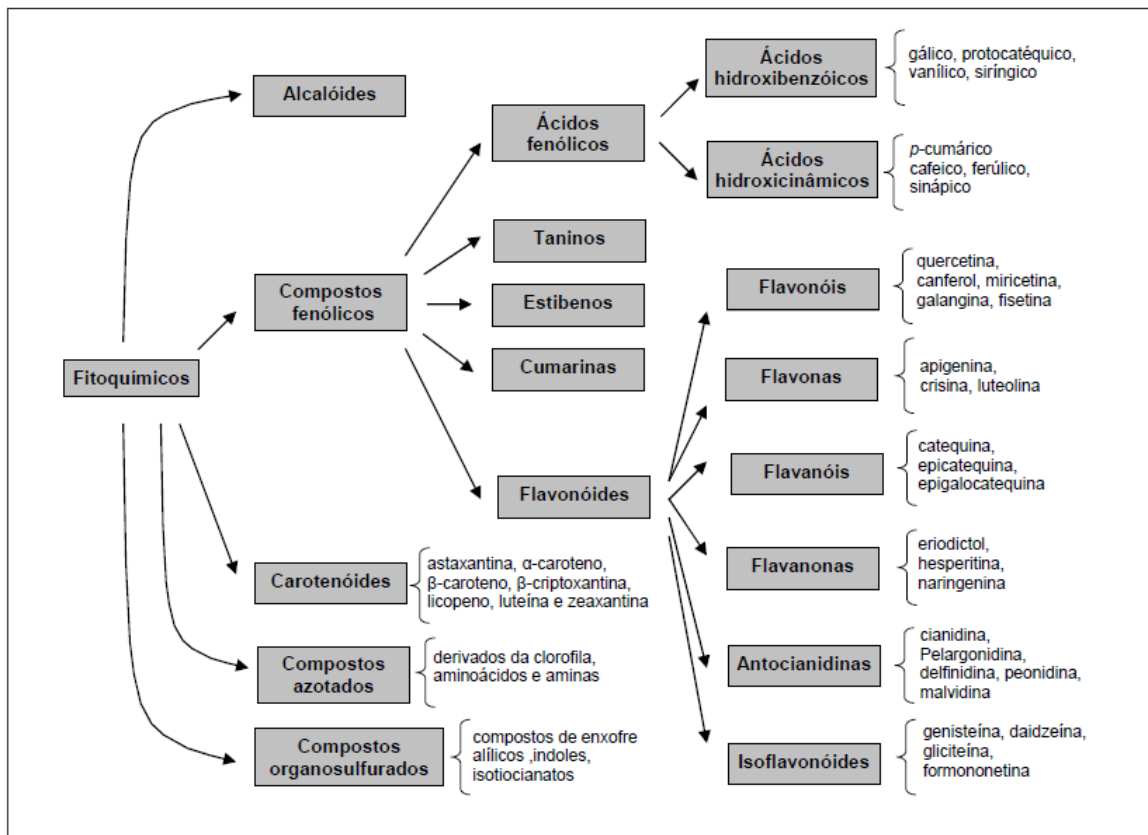
2.1 Metabólitos vegetais das plantas

O metabolismo é definido como o conjunto total de transformações das moléculas orgânicas catalisadas por enzimas que ocorre nas células vegetais vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do seu estado organizado (NELSON; COX, 2002).

Dentro deste contexto, existe o metabolismo primário responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a manutenção das funções vitais, e o metabolismo secundário no qual as substâncias produzidas possuem a função de adaptar e proteger o vegetal frente às radiações ultravioletas e à alguns insetos, e também são as responsáveis pelos efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no organismo humano (VANHAELEN et al., 1991).

As plantas despertam grande interesse pela imensa atividade não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentícia, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA; CORDOSO, 2012). As principais classes de metabólitos e alguns dos principais compostos que apresentam atividade biológica em plantas medicinais e fitoterápicos como os compostos fenólicos, flavonoides e taninos estão mostrados na Figura 2.

Figura 2 - Principais classes fitoquímicas

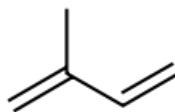


Fonte: FERREIRA e ABREU, 2007 apud LIU, 2004.

Os produtos do metabolismo secundário também podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos (SIMÕES et al., 2010).

Os terpenoides são a classe estruturalmente mais variada, e incluem os monoterpenos (óleos essenciais), sesquiterpenos, triterpenos (uma importante classe de saponinas), entre outros (SIMÕES et al., 2010; VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010). São substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura química do isopreno

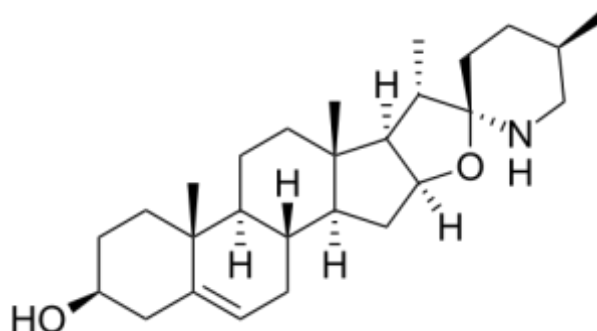


Fonte: Cortesia do usuário Fvasconcellos do site colaborativo WikiProject Chemistry.

Na medicina popular e terapêutica, plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativas, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis contendo essas substâncias possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (PASSOS et al. 2009).

Os alcaloides verdadeiros são compostos orgânicos cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel, como pode ser verificado na estrutura química do alcaloide solasodine (Figura 4), e são classificados de acordo com o seu sistema anelar (SIMÕES et al., 2010; VIZZOTO; KROLOW; WEBER, 2010); já as substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas protoalcaloides; e compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (SIMÕES et al., 2010).

Figura 4 – Estrutura química do alcaloide Solasodine



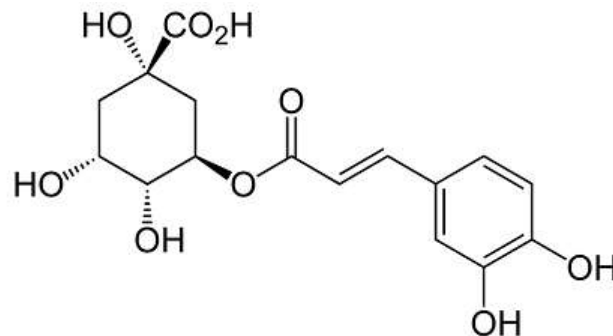
Fonte: Cortesia do usuário Edgar181 do site colaborativo WikiProject Chemistry.

Devido ao seu amargor e toxicidade podem atuar como repelente de herbívoros, borboletas ou aranhas. Essas substâncias apresentam várias atividades biológicas, como a emetina (amebicida e emético), reserpina (anti-hipertensivo), quinina (antimalárico), vimblastina e vincristina (antitumorais), cideína (antitussígeno), morfina (hipnoanalgésico), cafeína (estimulante do sistema nervoso central), entre muitos outros (SIMÕES et al., 2010).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas que possuem um anel aromático no qual ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (SIMÕES et al., 2010), como pode ser verificado na estrutura química do ácido clorogênico (Figura 5). Eles podem ser classificados em compostos solúveis em água (ácidos fenólicos, fenilpropanoides, flavonoides e quinonas) e compostos insolúveis em água (taninos condensados e ácidos hidroxicinâmicos de parede celular) (HAMINIUK et al., 2012). Essas moléculas são consideradas os antioxidantes mais

ativos nos vegetais, elas atuam de várias formas: eliminando os radicais livres através da doação de um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila da sua estrutura aromática, quelando metais de transição como o Fe^{2+} e o Cu^+ , interrompendo a reação de propagação dos RLs na oxidação lipídica e modificando o potencial redox do meio (SUCUPIRA et al., 2012).

Figura 5 – Estrutura química do ácido clorogênico



Fonte: Cortesia do usuário Benjah-bmm27 do site colaborativo WikiProject Chemistry.

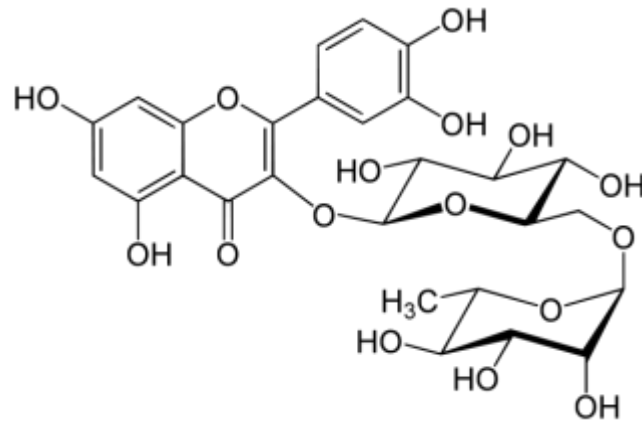
Além disso, os compostos fenólicos possuem efeitos anti-inflamatórios já descritas na literatura, e vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar as suas ações anti-inflamatórias, tais como: atividade antioxidante; modulação das atividades celulares relacionadas com a inflamação em mastócitos, macrófagos, linfócitos e neutrófilos; modulação de atividades enzimáticas pró-inflamatórias tais como fosfolipase A_2 , cicloxigenase, lipoxigenase e óxido nítrico; e modulação de expressão de genes pró-inflamatórios (BELLIK et al. 2013).

O ácido clorogênico foi estudado por Santos et al. (2006) que verificaram sua atividade antiedematogênica e antinoceptiva. Os mesmos autores atribuíram esses efeitos a ação inibitória na liberação de mediadores inflamatórios como o fator de necrose tumoral- α e óxido nítrico. O flavonoide rutina (Figura 6) que também pertence a classe dos polifenóis, foi um dos compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do gel de *Viola tricolor* em estudos realizados por Piana et al. (2013).

Assim como os compostos citados anteriormente, os alcaloides também podem exercer essa atividade. Estudos de Emmanuel et al. (2006) verificaram o efeito anti-inflamatório do extrato metanólico de *Solanum trilobatum* e de Solasodine (alcaloide isolado). Além disso, espécies do gênero *Solanum* são frequentemente estudadas quanto a atividade anti-inflamatória, como Zakaria et al. (2009) em folhas de *Solanum nigrum*; Ndebia,

Kamgang e Nkeh-chungaganye (2007) em folhas de *Solanum torvum* e de Pandurangan, Khosa e Hemalatha (2010) em raízes de *Solanum trilobatum*, as quais apresentaram interessantes atividades.

Figura 6 – Estrutura química da rutina



Fonte: Cortesia do usuário Yikrazuul do site colaborativo WikiProject Chemistry.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar um estudo fitoquímico, antioxidante e anti-inflamatório da espécie *S. corymbiflorum*.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar polifenóis, flavonoides, taninos condensados e alcaloides no extrato bruto (EB) e frações das folhas e frações dos frutos de *S. corymbiflorum*;
- Caracterizar o EB e frações das folhas e frações dos frutos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Analisar a capacidade antioxidante do EB e frações das folhas e frações dos frutos de *S. corymbiflorum* por método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH);
- Avaliar possível reversão de dano oxidativo em lipídios de membranas pelas frações das folhas e dos frutos de *S. corymbiflorum* através da redução da formação de MDA;
- Estimar a capacidade das frações das folhas e dos frutos em remover espécies reativas utilizando o método da oxidação de diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA);
- Avaliar o efeito do EB das folhas de *S. corymbiflorum* contra a oxidação proteica através do método de proteínas carboniladas;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato que apresentar melhor atividade antioxidante em um modelo de dermatite de contato irritante.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão sob a forma de dois artigos. Esta tese inclui ainda seções de discussão geral onde os resultados são interpretados em conjunto, de conclusões e de referências que estão relacionadas à introdução, revisão da literatura e discussão geral.

Os testes relacionados ao artigo “Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves” (primeira publicação) foram realizados após a conclusão dos resultados relacionados ao artigo “Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of *Solanum corymbiflorum* Fractions (Leaves and Fruits)” (segunda publicação). Como forma de proporcionar uma melhor compreensão da tese e na ordem em que os experimentos ocorreram, a primeira publicação está anexada posterior a segunda publicação.

4. RESULTADOS

Os resultados relacionados à análise fitoquímica e atividade antioxidante das frações das folhas e dos frutos da espécie estão no artigo intitulado “Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of *Solanum corymbiflorum* Fractions (Leaves and Fruits)” que foi publicado na revista Journal of Food and Nutrition Research.

Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of *Solanum corymbiflorum* Fractions (Leaves and Fruits)

Mariana Piana^{1*}, Roberta da Silva Jesus¹, Aline Augusti Boligon¹, Sílvia Terra Stefanello², Thiele Faccim de Brum¹, Camilla Filippi dos Santos Alves¹, Natalia Jank Mossmann¹, Bianca Vargas Belke¹, Félix Alexandre Antunes Soares², Sara Marchesan de Oliveira³, Liliâne de Freitas Bauermann¹

¹Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²Post-Graduate Program in Biochemical Toxicology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

³Post-graduate Program in Biological Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

*Corresponding author: marianarpiana@gmail.com

Abstract The antioxidant activity and phenolic compounds of the chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (AcOEt) and *n*-butanol (*n*-BuOH) fractions from *Solanum corymbiflorum* leaves and fruits were evaluated. The AcOEt fraction of the leaves presented the highest content of total polyphenols (114.00 mg GAE/g) and the best antioxidant capacity by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) test (IC₅₀ = 31.90 µg/mL). For the fruits, the same fraction exhibited the highest content of phenolics (99.77 mg GAE/g) and best results in the DPPH test (IC₅₀ = 141.47 µg/mL). In relation to 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays, the CHCl₃ fraction of leaves and fruits showed better results than the other samples analyzed. Besides of the phenolic compounds, the alkaloids contributed in the activity. Rutin, chlorogenic and caffeic acids quantified by HPLC are some of phenolic compounds responsible by this activity. *S. corymbiflorum* can be a promising source of natural antioxidants. However, more in vivo studies are required to stimulate the consumption and its other potentialities.

Keywords: *Solanum corymbiflorum*, antioxidant activity, HPLC, chlorogenic acid, *Cyphomandra corymbiflora*

Cite This Article: Mariana Piana, Roberta da Silva Jesus, Aline Augusti Boligon, Sílvia Terra Stefanello, Thiele Faccim de Brum, Camilla Filippi dos Santos Alves, Natalia Jank Mossmann, Bianca Vargas Belke, Félix Alexandre Antunes Soares, Sara Marchesan de Oliveira, and Liliâne de Freitas Bauermann, "Antioxidant Activity and Phytochemical Composition of *Solanum corymbiflorum* Fractions (Leaves and Fruits)." *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 4, no. 11 (2016): 736-741. doi: 10.12691/jfnr-4-11-6.

1. Introduction

Several crude extracts and pure natural compounds from plants are reported for having radical scavenging capacity. Intensive research has been performed to characterize the antioxidant properties of extracts or isolates, and identify the compounds that have this activity leading to the development of natural antioxidant formulations in areas as food, medicine and cosmetics [1]. This is possible due the ability of these substances to reduce oxidative stress by neutralizing of the reactive species by hydrogen donation, before they attacking cells and other biological components [2].

For this reason, the commercial value of fruits is increasing in domestic and international markets due also to the recognition of its nutritional and therapeutic properties, so it have been subject to several studies conducted around the world, reporting their nutritional values, especially in relation to the evaluation of the antioxidant activity [3]. Concern about improving health involving natural products with benefits, has enhanced research on antioxidants, because many degenerative human diseases including cancer, cardiovascular and brain diseases have been recognized as being a possible

consequence of free radical damage to lipids, proteins and nucleic acids [4].

This way, epidemiological studies suggest the consumption of natural antioxidant such as polyphenol rich foods, teas, fresh fruits or vegetables that have protective effects against diseases [5].

Solanum corymbiflorum (syn. *Cyphomandra corymbiflora*) is popularly known as "baga-de-veado". Occurs in the southern states of Brazil [6], and in Argentina, where is known as "ka'a Kururu" (Herb of frog), its leaves are popularly applied on swollen or inflamed legs caused by an infection, in scabies, tick bite, boils, mastitis, low back pain and otitis. Piana et al. [7] confirmed anti-edematogenic and anti-inflammatory activities of this species. In addition to these properties, the fruits of this species are consumed in many Guarani communities and border areas of Brazil [8], second Kinupp [9], when mature with green pulp possess very sweet flavor and pleasant aroma, in the form of juices have mild foaming and potential for making syrup, jams, liqueurs and other desserts.

Considering the several popular uses of the leaves and fruits and absence of research related to this species. The aim of this study was quantify for the first time total polyphenols, flavonoids, condensed tannins and alkaloids in the chloroform (CHCl₃), ethyl acetate (AcOEt) and *n*-butanol (*n*-BuOH) fractions from *S. corymbiflorum* leaves

and fruits, also evaluate the antioxidant activity by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) oxidation methods. Taking into account phytochemical analysis, polyphenols were quantified by high performance liquid chromatography (HPLC).

2. Methodology

2.1. Chemicals

All chemicals used in the tests were of analytical grade. Solvents for the extractions (ethanol, methanol, chloroform, ethyl acetate, and *n*-butanol), Folin-Ciocalteu reagent and iron sulfate (FeSO₄) were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). Rutin, gallic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, DPPH, tris-HCl, thiobarbituric acid and DCFH-DA were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Plant Collection and Extractions

Fruits and leaves of *S. corymbiflorum* were collected in Gaurama (Rio Grande do Sul State of Brazil) in October (2012). A dried voucher specimen is deposited in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria (SMBD 13159). The fruits were used in natura and the leaves were dried in stove for 36 h (temperature of 40°C) and powdered in a knife mill, both were separately macerated with 70% ethanol for a week with daily shake-up. After filtration, the hydroalcoholic extracts were evaporated under reduced pressure to remove the alcoholic solvent. The remaining aqueous was partitioned with solvents of increasing polarity (chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol), and were dried (temperature below 40°C) to give each corresponding fraction.

2.3. Phytochemical Composition

2.3.1. Polyphenols Content

The polyphenol content was evaluated by the colorimetric method described by Chandra and Mejia [10], using the Folin-Ciocalteu reagent. Samples were prepared at a concentration of 0.15 mg/mL. The absorbance were measured at 730 nm. Gallic acid (10 – 100 µg/mL) were used in the calibration curve and the results were expressed in mg of gallic acid equivalents per g of fraction (mg GAE/g).

2.3.2. Flavonoids Content

The flavonoids were quantified by method described by Woisky and Salatino [11] which used aluminum chloride (AlCl₃ 2%) as reagent. The absorbances were measured at 420 nm. Samples were prepared at a concentration of 1 mg/mL. The data were evaluated based on the calibration curve (10 – 100 µg/mL) of rutin and expressed in mg of rutin equivalents per g of fraction (mg RE/g).

2.3.3. Determination of Condensed Tannins

Condensed tannins were quantified by vanillin method described by Morrison et al. [12]. Solutions of 25 mg/mL of the fractions were used, and absorbance were measured

at 500 nm. The data were expressed in mg of catechin equivalent per g of fraction (mg CaE/g), based on the calibration curve (5 – 30 µg/mL) of catechin.

2.3.4. Determination of Total Alkaloids

Total alkaloids were determined by reaction of precipitation with Dragendorff's reagent, described by Sreevidya and Mehrotra [13]. The extracts were prepared at concentration of 80 mg/mL and the absorbance used was 435 nm. Total alkaloid content was quantified by a calibration curve of bismuth nitrate (5 – 30 µg/mL), the values were expressed in mg of total alkaloids per g of fraction (mg/g).

2.3.5. HPLC analysis Phenolic Compounds

HPLC analysis was assessed on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A) with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser, CBM 20A integrator, UV-VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software. The chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm × 4.6 mm) packed with 5 µm diameter particles. Solvent 1 (water containing 2% acetic acid) and Solvent 2 (methanol) composed the mobile phase used, according to slightly modified method of Piana et al. [14]. The samples were prepared at concentrations of 10 mg/mL were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA, USA). The flow rate was 0.6 mL/min and the injection volume was 40 µL. Identification of phenolics was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with those of standards. For quantification, was used integration of the peaks using the external standard method and calibration curve (5–40 µg/mL). Chlorogenic acid, caffeic acid, gallic acid and rutin.

2.4. Antioxidant Activity

2.4.1. DPPH Test (Radical scavenging Capacity)

The fractions of the fruits and leaves were assessed in the presence of DPPH stable radical, according to method of Choi et al. [15]. The samples were tested at 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 µg/mL. Spectrophotometric analysis were used to measure the antioxidant capacity and to determine the inhibitory concentration required to inhibit 50% of the DPPH in the assay, expressed as IC₅₀ (µg/mL).

Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution for 30 min. The absorption was measured at 518 nm. A solution of DPPH in ethanol was used as negative control and gallic acid as positive control. The tests were performed in triplicate and the calculation of the antioxidant capacity followed the equation: Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of the samples without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH.

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \quad (1)$$

2.4.2. DCFH-DA Oxidation Assay

Male Wistar rats with 3.0–3.5 months of age and weighing 270–320 g were kept in 3–4 animals per cage. They had continuous access to water and food in the place

with controlled temperature ($22\pm 3^\circ\text{C}$). The animals were used in accordance to the guidelines of the Brazilian Association for Laboratory Animal Science (COBEA). The rats were killed and the brain tissue was quickly dissected, weighed and solubilized in Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (1/10, w/v). The homogenate was centrifuged for 10 min at 4,000 rpm and the supernatant was used in the analyses. The experimental protocols were approved by the Ethics Animal Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM; Protocol 23081.005770/2009-38).

The substrate DCFH-DA was used to evaluate intracellular formation of reactive species, according to Myrhe et al. [16]. The supernatant of the homogenate was incubating at 37°C with different concentrations of the fractions (7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$) for 60 min. Aliquots were removed and placed to a assay tube with DCFH-DA for 1 hour in the dark. The fluorescence was measured using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. The results were expressed as μmol of oxidized DCF per mg protein and calculated by interpolation in a standard curve of oxidized DCF (constructed in parallel), corrected by the content of protein. Ethanol was used as negative control, gallic acid as positive control, and the concentration of the fraction required to reduce intracellular formation of reactive species was expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

2.4.3. TBARS Assay - Inhibition of Lipid Peroxidation

The same homogenate of the previous assay was used in the TBARS assay. An aliquot of 100 μL was incubated for 1 h at 37°C with recently prepared FeSO_4 (10 μM), in the presence of the different concentrations of samples (7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 $\mu\text{g/mL}$). The TBARS production was determined as described by Ohkawa et al. [17]. Gallic acid was used as positive control and the concentration of the fraction required to reduce the lipid peroxidation in 50% was expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

2.5. Statistical Analysis

All assays were performed in triplicate. For phytochemical composition were used calibration curves, the values found were expressed as $\text{mean}\pm\text{S.D.}$ and statistically analyzed by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey test, and $p < 0.05$ were considered significant. For antioxidant activity assays, the IC_{50} values were statistically analyzed by same way and expressed $\text{mean}\pm\text{S.E.M.}$

3. Results and Discussion

3.1. Phytochemical Composition

The contents of total polyphenols, flavonoids and condensed tannins were higher in the fractions of the leaves than in the fruit fractions, as shown in the Table 1.

For the leaves, the AcOEt fraction presented the highest content of total polyphenols (114.00 mg GAE/g), followed by *n*-BuOH and CHCl_3 fractions. The quantity of flavonoids showed the same trend of the polyphenols, which were higher in the AcOEt fraction (54.66 mg RE/g). Piana et al. [7] also found these compounds in the leaves crude extract of the same species, agreeing with the results of this study.

The AcOEt fraction of the fruits exhibited the highest content of phenolics compounds (99.77 mg GAE/g) followed by *n*-BuOH fraction (49.90 mg GAE/g). For the determination of flavonoids contents, all samples exhibited modest values, while the AcOEt and *n*-BuOH fractions did not show significant differences of values ($P > 0.05$). For the leaves and fruits, the condensed tannins are present only in the AcOEt and *n*-BuOH fractions and the total alkaloids were found in all the fractions, but the highest content are in the CHCl_3 fractions, as expected.

Table 1. Total polyphenols (TP), flavonoids (TF), condensed tannins (CT) and total alkaloids (TA) in the fractions of *S. corymbiflorum* leaves and fruits

	TP (mg GAE/g)	TF (mg RE/g)	CT (mg CaE/g)	TA (mg/g)
Leaves				
CHCl_3	54.11 ± 1.21^c	23.33 ± 1.53^c	-	17.73 ± 1.54^a
AcOEt	114.00 ± 1.62^a	54.66 ± 0.65^a	19.82 ± 1.55^a	14.58 ± 1.62^b
<i>n</i> -BuOH	63.00 ± 1.55^b	28.9 ± 0.81^b	16.22 ± 0.92^b	10.05 ± 1.87^c
Fruits				
CHCl_3	44.57 ± 0.74^c	3.30 ± 0.76^c	-	27.82 ± 0.06^a
AcOEt	99.77 ± 0.33^a	5.32 ± 0.14^a	7.11 ± 0.15^b	19.13 ± 0.04^b
<i>n</i> -BuOH	49.90 ± 0.11^b	5.40 ± 0.23^a	11.64 ± 1.34^a	10.27 ± 0.05^c

Values are expressed as mean \pm standard deviation. GAE: gallic acid equivalents, RE: rutin equivalents, CaE: catechin equivalents, ^{a-c}Means with the different letters in each column for leaves and fruits are significantly different ($p < 0.05$), by analysis of variance (One-way ANOVA) ($n = 3$).

Studies by Hari et al. [18] found alkaloids, flavonoids, tannins in *Solanum nigrum* extracts. Another study in *Solanum guaraniticum* leaves, Zadra et al. [19] found the same trend for the amount of polyphenols (AcOEt fraction $>$ *n*-BuOH fraction $>$ CHCl_3 fraction), and showed presence of alkaloids and flavonoids in similar quantity in the AcOEt fraction when compared with same fraction of the *S. corymbiflorum* leaves.

In all fractions of the leaves analyzed by HPLC were possible find antioxidant compounds (Table 2 and Figure 1). The AcOEt and *n*-BuOH fractions of the leaves showed a large amount of rutin (53.55 and 24.79 mg/g, respectively), chlorogenic (49.11 and 47.38 mg/g, respectively) and

caffeic acids. Gallic acid was found in AcOEt fraction in a lesser amount, as well as the chlorogenic and caffeic acid in the CHCl_3 fraction. Research performed by Piana et al. [7] showed which the chlorogenic acid and rutin were some the compounds responsible by anti-inflammatory activity of this species.

The AcOEt fraction of the fruits showed large amount of chlorogenic (87.37 mg/g) and caffeic (11.59 mg/g) acids, and modest values these compounds in CHCl_3 fraction. Gallic and chlorogenic acid were found in the *n*-BuOH fraction (Table 2 and Figure 2). Chlorogenic acid and caffeic acid both have vicinal hydroxyl groups, they have antimutagenic, carcinogenic and antioxidant activities [20].

Table 2. Amount of phenolic compounds analyzed by HPLC/DAD.

	CHCl ₃ (mg/g)	AcOEt (mg/g)	<i>n</i> -BuOH (mg/g)
Leaves			
Gallic acid	-	3.10 ± 0.22 ^a	-
Chlorogenic acid	2.04 ± 0.37 ^a	49.11 ± 0.23 ^d	47.38 ± 0.38 ^d
Caffeic acid	3.04 ± 0.11 ^b	28.73 ± 1.99 ^c	12.14 ± 0.49 ^a
Rosmarinic acid	-	19.14 ± 0.45 ^b	15.32 ± 0.89 ^b
Rutin	-	53.55 ± 0.13 ^e	24.79 ± 1.31 ^c
Fruits			
Gallic acid	-	-	2.05 ± 0.08 ^b
Chlorogenic acid	2.04 ± 0.17 ^a	87.37 ± 0.21 ^a	47.38 ± 0.17 ^a
Caffeic acid	1.67 ± 0.03 ^b	11.59 ± 0.33 ^b	-

Mean ± standard deviation; - phenolic compounds not found in the fraction. ^{a-e} Means with the different letters in each column for leaves and fruits are significantly different ($p < 0.05$), by analysis of variance ($n = 3$).

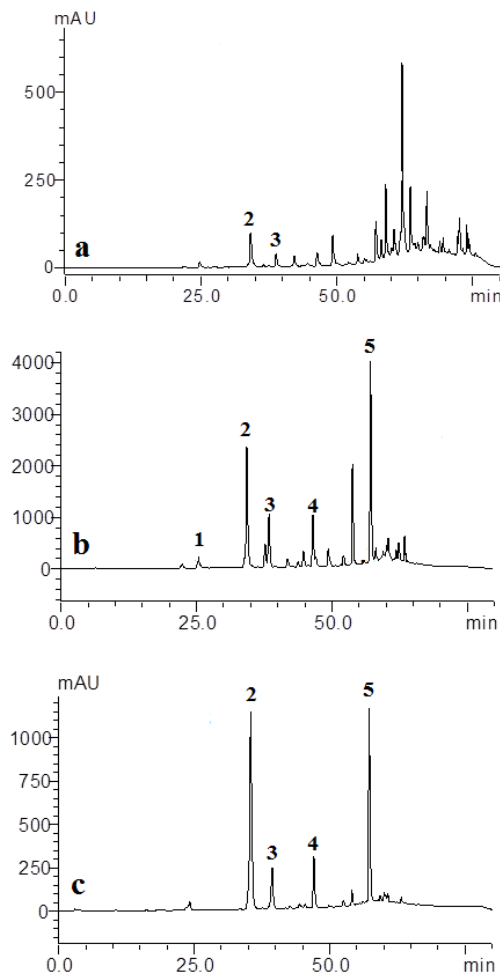


Figure 1. Chromatographic profile of the fractions leaves (a) CHCl₃, (b) AcOEt (c) *n*-BuOH of *S. Corymbiflorum* leaves at 326 nm. 1 correspond to gallic acid peak (RT: 14.06 min), 2 chlorogenic acid (RT: 34.73 min), 3 caffeic acid (RT: 38.12), 4 rosmarinic acid (RT: 44.72) 5 rutin (53.48 min); RT: retention time

3.2. DPPH Test

Taking into consideration the IC₅₀ values, the fractions of the leaves showed better antioxidant activity than fractions of the fruits.

The AcOEt fraction of the leaves showed the best antioxidant capacity (IC₅₀ = 31.90 µg/mL), similar value of the gallic acid standard (IC₅₀ = 29.12 µg/mL) (Table 3), followed by the *n*-BuOH fraction (IC₅₀ = 63.97 µg/mL), and finally, the higher IC₅₀ value was of the CHCl₃

fraction. The results found in the DPPH test followed the same trend of the amount of polyphenols and flavonoids found in each fraction. Boligon et al. [21], showed similar results in fractions of *Tabernaemontana catharinensis* leaves, who found lower IC₅₀ value in the AcOEt followed by *n*-BuOH fractions. In accordance with the authors, this fact could be explained based on the similarity between compounds with high antioxidant capacity, which were extracted by these organic solvents. In study of Piana et al. [7], the crude extract of the leaves showed IC₅₀ = 23.94 µg/mL, agreeing to our results.

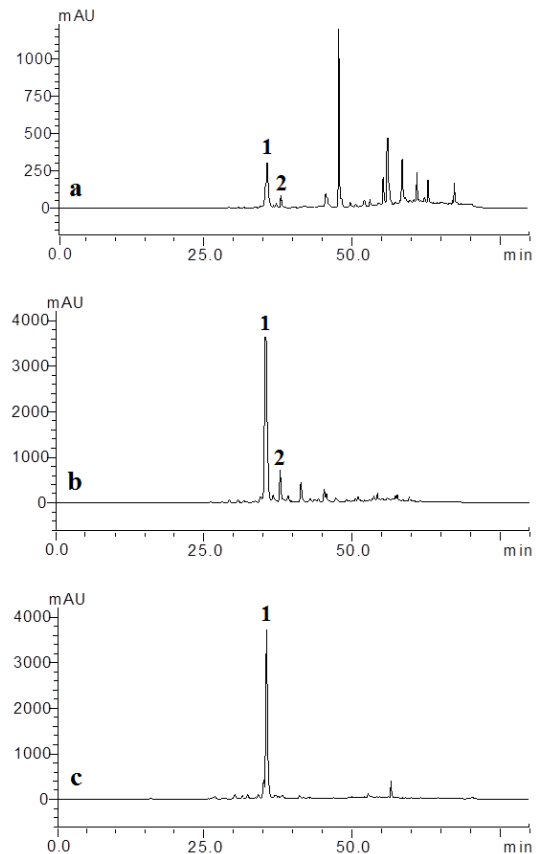


Figure 2. Chromatographic profile of the fractions of the fruits. (a) CHCl₃, (b) AcOEt (c) *n*-BuOH of *S. Corymbiflorum* leaves at 326 nm. 1 correspond to chlorogenic acid (RT: 34.73 min), 2 caffeic acid (RT: 38.12) RT: retention time

Table 3. IC₅₀ values for antioxidant activity assays.

	DPPH (µg/mL)	DCFH-DA (µg/mL)	TBARS (µg/mL)
Fruits			
CHCl ₃	-	136.17 ± 0.54	105.59 ± 10.62 ^b
AcOEt	141.47 ± 0.25 ^b	-	-
<i>n</i> -BuOH	165.69 ± 0.27 ^c	-	-
Leaves			
CHCl ₃	126.55 ± 0.74 ^d	57.55 ± 0.63	100.73 ± 2.37 ^b
AcOEt	31.90 ± 1.63 ^b	-	162.29 ± 10.48 ^c
<i>n</i> -BuOH	63.97 ± 0.21 ^c	-	-
Gallic acid	29.12 ± 0.32 ^a	-	80.07 ± 2.89

Values are expressed as mean ± S.E.M. ^{a-d} Means with the different letters in each column for leaves and fruits are significantly different ($p < 0.05$), by analysis of variance (One-way ANOVA) ($n = 3$).

Just the AcOEt and *n*-BuOH fractions of the fruits showed good DPPH radical scavenging capacity, with IC₅₀ values of 141.47 and 165.69 µg/mL, respectively (Table 2), higher slightly values compared to the gallic acid standard (IC₅₀ 29.12 µg/mL). It is probable that

mainly the phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins found in higher concentrations in these fractions, have greatly contributed in this activity. Studies of Piana et al. [14], showed the best antioxidant capacity for AcOEt fraction by DPPH test in *Tabernaemontana catharinensis* fruits. Furthermore, Sudha et al. [22] found antioxidant properties in AcOEt extract of *Solanum muricatum* fruit associated to phenolic and flavonoids contents.

So, the phenolic compounds found in plants demonstrated potent antioxidant activity mainly due their redox properties, which allow them to act as reducing agents, singlet oxygen quenchers, hydrogen donors and chelating agents of metal ions [20].

3.3. DCFH-DA Oxidation Assay

Only the CHCl₃ fractions of the leaves and fruits were able to reduce the oxidation of DCFH-DA in 50% compared to the basal group (IC₅₀ = 57.55 and 136.17 µg/mL, respectively), demonstrating excellent antioxidant activity (Table 2).

These results are agreeing with Zadra et al. [19] where the CHCl₃ fraction from *Solanum guaraniticum* showed activity in this assay. Besides the phenolic compounds and flavonoids, other substances as alkaloids may have contributed in this activity and acted synergistically, mainly, in this fraction. Research conducted by Jung et al. [23] found inhibitory effects of two isolated alkaloids from rhizoma of *Coptis chinensis* (groenlandicine and coptisine) by DCFH-DA oxidation assay.

Furthermore, Koduru et al. [24] isolated two steroid alkaloids (tomatidine and solasodine) from *Solanum aculeastrum* and found strong antioxidant activity and synergistic effect in DPPH test of the isolated compounds. This fact can explain, at least in part, the activity of the CHCl₃ fractions that has considerable amount of alkaloids.

3.4. TBARS Assay

The antioxidant activity evaluated by the TBARS assay is based on the formation of malondialdehyde (MDA), a subproduct of lipid peroxidation. The level of MDA in brain tissue was affected mainly by the treatment with the CHCl₃ fraction of the leaves, that showed the best result (IC₅₀ = 100.73 µg/mL), followed by AcOEt fraction. The CHCl₃ fraction of the fruits presented similar activity (IC₅₀ = 105.59 µg/mL) compared with same fraction of the leaves (Table 3). The gallic acid showed IC₅₀ = 80.07 µg/mL.

Lipids are components of cell membranes and its have as function maintain the control and cell structure. They are the first target of the attack of reactive species. The lipid peroxidation is associated with various human diseases such as atherosclerosis, cancer, diabetes, lung and neurodegenerative disorders. The TBARS assay is the most commonly used to evaluate this condition [25].

To protect the cells, humans developed an antioxidant protection system, which works interactively and synergistically with antioxidant compounds of the plants, neutralizing free radicals before they start attacking the cells [26].

In CHCl₃ fractions of the leaves and fruits besides polyphenols, larger quantity of alkaloids were found, these compounds have shown antioxidant properties [27]. A possible hypothesis for the mechanism of action is the

presence of aromatic hydroxyl group, that may be responsible for its antioxidant efficiency, similarly to phenolic antioxidants, which have chain-breaking mechanism by donation of phenolic hydrogen. Moreover, antiperoxidative activity of alkaloids has been also reported [28].

4. Conclusion

The results clearly prove by the first time that the fractions leaves and fruits of *S. corymbiflorum* possess notable antioxidant activity and contributed to reveal some phytochemical characteristics of this species. All the fractions showed considerable presence of phenolics and alkaloids. For leaves and fruits, the AcOEt fraction showed the best antioxidant capacity in the DPPH test, which can be attributed to its high content of total polyphenols, mainly the rutin and chlorogenic acid. Otherwise, the CHCl₃ fraction showed the best result in the DCFH-DA oxidation and TBARS assays. Besides of the phenolic compounds, the alkaloids also contributed in this activity. Caffeic acid and a small quantity of gallic acid were found by HPLC confirms the free radical scavenging activity. *S. corymbiflorum* have antioxidant potential and can be a promising source of natural antioxidants. However, more in vivo studies are required to stimulate the consumption and its other potentialities.

Acknowledgments

The authors would like to thank Margareth Linde Athayde for advice and Renato Zacchia (Botanical Department of Federal University of Santa Maria) for providing the identification of *S. corymbiflorum*. The authors thanks the financial support of CNPq/CAPES/FAPERGS (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul) /Brazil.

References

- [1] Boligon, A.A., Pereira, R.P., Feltrin, A.C., Machado, M.M., Janovik, V., Rocha, J.B.T. and Athayde, M.L. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresour Technol.* 100, 6592-6598, 2009.
- [2] Erkan N. Antioxidant activity and phenolic compounds of fractions from *Portulaca oleracea* L. *Food Chem.* 133, 775-781, 2012.
- [3] Moo-Huchin, V.M., Estrada-Mota, I., Estrada-León, R., Cuevas-Glory, L., Ortiz-Vazquez, E., Vargas, M.L.V., Betancur-Ancona, D. and Sauri-Duch, E. Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico. *Food Chem.* 152, 508-515, 2015.
- [4] Choi, Y. and Lee, J. Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol- rich fraction from grape seeds. *Food Chem.* 114, 1386-1390, 2009.
- [5] Almeida, M.M.B., Sousa, P.H.M., Arriaga, Â.M.C., Prado, G.M., Magalhães, C.E.C., Maia, G.A. and Lemos, T.L.G. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res Int.* 44, 2155-2159, 2011.
- [6] Soares, E.L.C. and Mentz, L.A. As espécies de *solanum* subgênero *bassovia* seção *pachyphylla* (= *cyphomandra* Mart. ex Sendtn. - solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisas botânica.* 57, 231-254, 2006.

- [7] Piana, M., Camponogara, C., Boligon, A.A., Machado M. M., Brum, T.F., Oliveira, S.M. and Freitas Bauermann, L. 2016. Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves. *J Ethnopharmacol.* 179, 16-21, 2016.
- [8] Keller, H.A. and Prance, G.T. Etnobotánica de las especies de *Solanum*, Subgénero *Bassovia*, sección *Pachyphylla* (Solanaceae) De Misiones, Argentina. *Bonplandia.* 21, 45-54, 2012.
- [9] Kinupp, V.F. Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre. *Federal University of the Rio Grande do Sul* (Doctoral Thesis), 2007.
- [10] Chandra, S. and Mejia, E.G. 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem.* 52, 3583-3589, 2004.
- [11] Woisky, R.G. and Salatino, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res.* 37, 99-105. 1998.
- [12] Morrison, I.M., Asiedu, E.A., Stuchbury, T. and Powell, A.A. Determination of lignin and tannin contents of Cowpea seed coats. *Ann Bot Lond.* 76, 287-290, 1995.
- [13] Sreevidya, N. and Mehrotra, S. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J AOAC Int.* 86. 1124-1127, 2003.
- [14] Piana, M., Boligon, A.A., Brum, T.F., Brum, T.F., Zadra, M., Belke, B.V., Froeder, A.L., Frohlich, J.K., Nunes, L.T., Pappis, L., Boligon, A.A. and Athayde, M.L. Phytochemical analysis and antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Fruits and branches. *An Acad Bras Ciênc.* 86, 881-888, 2014.
- [15] Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H. and Kim, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 163, 1161-1168, 2002.
- [16] Myrhe, O., Andersen, J.M., Aarnes, H. and Fonnum, F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol.* 65, 1575-1582, 2003.
- [17] Ohkawa, H., Ohishin, N. and Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95, 351-358, 1979.
- [18] Hari, R., Vasuki, R., Anbu, J., Muralikrishna, B., Manasa, G. and Geethanjali. Comparative free radical scavenging and analgesic activity of ethanolic leaves and stem extracts of *Solanum nigrum*. *J Med Sci.* 13, 327-336, 2013.
- [19] Zadra, M., Piana, M., Brum, T.F., Boligon, A.A., Freitas, R.B., Machado, M.M., Stefanello, S.T., Soares, F.A.A. and Athayde, M.L. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules.* 17, 12560-12574, 2012.
- [20] Rice-evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 20, 933-956, 2006.
- [21] Boligon, A.A., Freitas, R.B., Brum, T.F., Piana, M., Belke, B.V., Rocha, J.B.T. and Athayde, M.L. Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Free Radicals and Antioxidants.* 3, 77-80, 2013.
- [22] Sudha, G., Priya, M.S., Shree, R.I. and Vadivukkarasi, S. Antioxidant activity of ripe pepino fruit (*Solanum muricatum* Aiton). *Int J Pharm Pharm Sci.* 3, 257-61, 2011.
- [23] Jung, H., Min, B.S., Yokozawa, T., Lee, J.H., Kim, Y.S. and Choi, J.S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis Rhizoma* alkaloids. *Biol Pharm Bull.* 32, 1433-1438, 2009.
- [24] Koduru S, Jimoh FO, Grierson, D.S. and Afolayan, A.J. Antioxidant activity of two steroid alkaloids extracted from *Solanum aculeastrum*. *J Pharmacol Toxicol.* 2, 160-167, 2007.
- [25] Yin, H., Xu, L. and Porter, N.A. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 111, 5944-5972, 2011.
- [26] Boligon, A.A., Machado, M.M. and Athayde, M.L. Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Med chem.* 4, 517-522, 2014.
- [27] Selvendiran, K., Singh, J.P.V., Krishnan, K.B. and Sakthisekaran, D. 2003. Cytoprotective effect of piperine against benzowaxpyrene induced lung cancer with reference to lipid peroxidation and antioxidant system in Swiss albino mice. *Fitoterapia,* 74, 109-115, 2003.
- [28] Račková, L., Májeková, M., Košťálová, D. and Štefek, M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. *Bioorgan Med Chem.* 12, 4709-4715, 2004.

Os resultados relacionados à análise fitoquímica, antioxidante e anti-inflamatória do EB das folhas da espécie *S. corymbiflorum* estão no artigo intitulado “Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves” que foi publicado na revista Journal of Ethnopharmacology.



Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves



Mariana Piana^a, Camila Camponogara^b, Aline Augusti Boligon^a, Michel Mansur Machado^c, Thiele Faccim de Brum^a, Sara Marchesan Oliveira^{b,*}, Liliane de Freitas Bauermann^a

^a Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa-UNIPAMPA, Uruguaiana, RS 97500-970, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 September 2015

Received in revised form

18 December 2015

Accepted 20 December 2015

Available online 22 December 2015

Keywords:

Solanum corymbiflorum

Baga-de-veado

Anti-inflammatory activity

Antioxidant activity

ABSTRACT

Solanum corymbiflorum is popularly known as “baga-de-veado” and its leaves are applied on inflamed legs, scabies, tick bite, boils, mastitis, low back pain and otitis. The aim of this study was evaluate anti-inflammatory *in vivo* activity and relate this activity with antioxidant compounds present in the extract of *S. corymbiflorum* leaves. The extract from *S. corymbiflorum* leaves topically applied was able to reduce the croton oil-induced ear edema and myeloperoxidase (MPO) activity with maximum inhibition of $87 \pm 3\%$ and $45 \pm 7\%$, respectively in the dose of 1 mg/ear. Similar results were found for positive control dexamethasone, which presented inhibitions of ear edema and MPO activity of $89 \pm 3\%$ and $50 \pm 3\%$, respectively in a dose of 0.1 mg/ear. These findings are due, at least in part, the presence of polyphenols (195.28 mg GAE/g) and flavonoids, as chlorogenic acid (59.27 mg/g), rutin (12.72 mg/g), rosmarinic acid, caffeic acid and gallic acid found by high performance liquid chromatography (HPLC) analysis. This species showed potential antioxidant by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), and carbonyl groups in proteins methods which may be related with the presence of this compounds. This species possess anti-inflammatory activity confirming their popular use for the local treatment of skin inflammatory disorders.

© 2015 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Solanum corymbiflorum (Sendtn.) Bohs (syn. *Cyphomandra corymbiflora*), popularly known as “baga-de-veado”, is native in the southern states of Brazil and in Argentina, where is known as “ka’a Kururu” (Herb of frog) (Soares and Mentz, 2006). In the folk medicine its leaves can be applied on inflamed legs, scabies, tick bite, boils, mastitis, low back pain and otitis (Keller and Prance, 2012). However, to our knowledge, there are no studies related to popular use of *S. corymbiflorum* to treat skin inflammatory diseases. Taking into consideration the different uses of this species related to skin anti-inflammatory effects, there is a hypothesis that this activity can be confirmed using an inflammation model induced by topical application of croton oil (da Cunha et al., 2001).

The mechanism inflammatory is attributed, in part, to release of reactive species from activated cells, such as neutrophils and macrophage. Thus, free radicals are mediators that provoke or sustain inflammatory processes and consequently, their neutralization by radical scavengers can attenuate the inflammatory

* Correspondence to: Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Camobi Campus, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

E-mail address: saramarchesan@hotmail.com (S.M. Oliveira).

process (Conforti et al., 2008). In this sense, vegetal extracts with antioxidant effects have been established as a therapeutic approach for treating inflammation (Nijveldt et al., 2001). Moreover, phenolic compounds exhibit a wide range of biological effects including antibacterial, anti-inflammatory, antiallergic, hepatoprotective and anticarcinogenic actions. Many of these biological functions have been attributed to their free radical scavenging capacity (Krishnaiah et al., 2011).

The aim of this study was evaluate the anti-inflammatory *in vivo* activity of the extract of *S. corymbiflorum* leaves and relate their anti-inflammatory activity with antioxidant compounds present in this extract.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All chemicals were of analytical grade. Solvent for the extractions, folin–ciocalteu reagent, iron sulfate, hematoxylin–eosin and paraffin were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Croton oil, hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), tetramethylbenzidine (TMB), dexamethasone, gallic, ascorbic, rosmarinic, chlorogenic and caffeic acids, quercetin, rutin, DPPH,

Tris–HCl, thiobarbituric acid and DCFH-DA were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Isoflurane (Baxter, São Paulo, Brazil), sodium acetate, acetone, absolute ethanol, acetic acid, formaldehyde (all from Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were used.

2.2. Plant collection and extractions

S. corymbiflorum leaves (300 g of an individual) were collected in Gaurama (Rio Grande do Sul state, Brazil) in October (2012). A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria by register number SMBD 13159. The leaves were dried at room temperature and powdered in a knife mill. The powder of leaves was macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with daily shake-up. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol, the aqueous extract was dried in a stove (temperature above 40 °C) to produce the extract.

2.3. Anti-inflammatory activity

2.3.1. Animals

Male Swiss mice (25–30 g) were kept in a temperature-controlled room (22 ± 2 °C) under a 12 h light-dark cycle. Animals were acclimatized to the laboratory for at least 1 h before the experiments and were used only once. All of the experiments were carried out between 8:00 a.m. and 5:00 p.m. The data reported in this study were carried out in accordance with current ethical guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983) and were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (process number 5786050215/2015). The number of animals and the amount of irritant agent were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the drug treatments.

2.3.2. Treatments

The extract of the *S. corymbiflorum* leaves, the irritant croton oil and dexamethasone were applied topically to the right ear of each mouse. Dexamethasone was used as a positive control.

2.3.3. Ear edema measurements

Skin dermatitis was induced by topical administration of croton oil and the inflammatory response was evaluated through of edema formation. The edema was quantified by the increase in ear thickness of mice upon inflammatory challenge. Ear thickness was measured before and after induction of the inflammatory response, using a digital micrometer (Digimess) in animals anesthetized with isoflurane (Silva et al., 2011). The micrometer was applied near the tip of the ear just distal to the cartilaginous ridges. The thickness was expressed in μm . To minimize variation, a single investigator performed the measurements throughout each experiment. The acetone (20 μL /ear) was used as vehicle group. The irritant agent (1 mg/ear), dexamethasone (0.1 mg/ear) and *S. corymbiflorum* extract (0.00001–1 mg/ear) were dissolved and applied topically in a constant volume of 20 μL of acetone to the right ear of each animal.

2.3.4. Croton oil-induced ear edema

Acute inflammation model was induced by a single topical application of croton oil at a concentration of 1 mg/ear in the right ear of the mice according to the method describe previously, with some modifications (da Cunha et al., 2001). The *S. corymbiflorum* extract (0.00001–1 mg/ear) or dexamethasone (0.1 mg/ear), used as a positive control, was applied topically immediately before of the croton oil treatment. Ear thickness was measured prior to and

6 h after the induction of inflammation. Six hours after the application of croton oil, the animals were sacrificed and ear samples (circles of tissue 6 mm in diameter) were collected for further analysis.

2.3.5. Myeloperoxidase activity (MPO) assay

MPO is an enzyme found in cells of myeloid origin and has been used as a biochemical marker of polymorphonuclear cells (mainly neutrophil) infiltration to the tissue. MPO activity was determined using an assay described previously (Oliveira et al., 2014), with some modifications. After 6 h of application croton oil, was assessed the MPO enzyme activity in the ear samples. Tissue samples were homogenized with a motor-driven homogenizer in 300 μL of acetate buffer (8 mM, pH 5.4) containing HTAB. The results were expressed as optical density (OD)/mL of the sample.

2.3.6. Histology

Separate groups of mice were used to verify the histological changes in mouse ear 6 h after croton oil administration or croton oil plus treatments. Mice were euthanized and the right ear was removed and fixed in an alfac solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid). Each sample was embedded in paraffin wax, sectioned at 5 μm and stained with hematoxylin–eosin. A representative area was selected for qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response with a 20x and 40x objectives (Oliveira et al., 2014). To minimize a source of bias, the investigator did not know the group that they were analyzing.

2.4. Phytochemical analysis

2.4.1. Total polyphenols content

The amount of polyphenol was evaluated by method described by Chandra and Mejia (2004), using the Folin–Ciocalteu reagent. The extract samples were prepared at a concentration of 0.15 mg/mL. Absorbance was measured at 730 nm, in triplicate. Gallic acid was used in the calibration curve. The results were displayed in mg of gallic acid equivalents per g of extract (mg GAE/g).

2.4.2. Total flavonoids content

The flavonoids content was determined by the reaction with aluminum chloride using the method described by Woisky and Salatino (1998). Briefly, AlCl_3 solution was added to a aliquot of the sample and after 15 min the absorbance was verified at 420 nm. The data were calculated based on the calibration curve of rutin and expressed in mg of rutin equivalents per g of extract (mg RE/g).

2.4.3. Determination of total alkaloids

Total alkaloids were quantified by reaction of precipitation with Dragendorff's reagent by Sreevidya and Mehrotra (2003). The absorbance was measured at 435 nm and carried out in triplicate. For the results was used a calibration curve of bismuth nitrate which were expressed in mg of total alkaloids per g of extract (mg/g).

2.4.4. HPLC analysis polyphenols

HPLC analysis was performed on a Shimadzu HPLC system (Kyoto, Japan), Prominence Auto-Sampler (SIL-20A), equipped with Shimadzu LC-20 AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser, CBM 20A integrator, UV–VIS detector DAD SPD-M20A and LC Solution 1.22 SP1 software. Reversed phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using a C-18 column (250 mm \times 4.6 mm) packed with 5 μm diameter particles. The mobile phase comprising of solvent 1 (water containing 2% acetic acid) and Solvent 2 (methanol), according to method of Piana et al. (2013) with modifications.

The flow rate used was 0.6 mL/min and 40 μL of injection

volume. The identification of the phenolics was performed by comparing retention times and the Diode-Array-UV spectra with those of standards. Stock solutions (0.00625–0.250 mg/mL) of chlorogenic, caffeic, rosmarinic and gallic acids and rutin, as well as extract samples of *S. corymbiflorum* were dissolved in the mobile phase. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method. All chromatographic operations were performed in triplicate.

2.5. Antioxidant activity

2.5.1. DPPH test

The radical scavenging capacity of the *S. corymbiflorum* extract was evaluated in the presence of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) stable radical, according to a method described by Choi et al. (2002). Briefly, the extract samples were tested at 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125 and 250 µg/mL. Each sample was mixed with 1.0 mL of DPPH 0.3 mM in ethanol solution, after 30 min the absorption was measured at 518 nm. Ascorbic acid and quercetin (positive controls) also was assessed in the same concentrations. The test was performed in triplicate and the calculation of the radical scavenging capacity (%) followed the equation:

Where: Abs_{sample} is absorbance of each fraction; Abs_{blank} is absorbance of the samples without adding the DPPH; Abs_{control} is absorbance the solution of ethanol in DPPH.

$$\% \text{ inhibition} = 100 \frac{(\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100}{\text{Abs}_{\text{control}}} \quad (1)$$

2.5.2. Protein carbonyl content

Human blood samples were employed to obtain the serum used in the protein carbonyls evaluation assays. The experiments were carried out according to the research ethics committee of the Federal University of Santa Maria (Rio Grande do Sul, Brazil), and approved under number 23081.012/2006-94.

The dosages of protein carbonyl were performed, according to Morabito et al. (2004). The extract samples were diluted in PBS buffer in the different concentrations (25, 50, 100 and 200 µg/mL). Human serum and extract diluted in PBS buffer were incubated during at 37 °C in assay tube. After 30 min was added H₂O₂ and incubated for 60 min at same temperature. Then, human serum in the absence or presence of the samples in different dilutions was incubated with 20 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) solution for 60 min. The proteins were precipitated from the solution with the use of 20% trichloroacetate and resuspended in 6 M guanidine at 37 °C for 15 min. The content was determined in the absorbance at 366 nm. Ascorbic acid and quercetin were used as positive controls. The assays were assessed in triplicate and results expressed as nmol/g protein.

2.6. Statistical analysis

For phytochemical composition was used a calibration curve, the experimental values were expressed as mean ± S.D. For antioxidant activity values of SC₅₀ (scavenging concentration required for to inhibit the DPPH radical or decrease carbonyl protein levels in 50%) were obtained by linear regression and expressed as mean ± SE. In the anti-inflammatory activity the results are presented as mean ± SEM with exception of the ID₅₀ values (dose required to reduce the responses of the treated groups by 50% relative to the control group), which are reported as geometric means plus their respective 95% confidence limits. The maximum effect (E_{max}) was calculated based on the response of the control groups. The statistical significance between the groups was assessed by one-way ANOVA followed by a post hoc Newman–Keuls

test. The accepted level of significance for the test was $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Anti-inflammatory activity

3.1.1. Extract of *S. corymbiflorum* leaves on croton oil-induced cutaneous inflammation

The anti-inflammatory activity of the extract of *S. corymbiflorum* in an acute contact dermatitis model induced by croton oil was assessed. A single topical application of croton oil on ear induced an increase of the ear thickness with an E_{max} of 130 ± 9 µm 6 h after the induction, while topical application of the vehicle (acetone) alone did not change ear thickness (Fig. 1 A).

The extract from *S. corymbiflorum* leaves (0.00001–1 mg/ear) topically applied resulted in a dose-dependent inhibition of croton oil-induced ear edema, with an ID₅₀ value of 0.39 (0.12–1.16) µg/ear and a maximum inhibition of 87 ± 3% (at 1 mg/ear). Similar result was found for dexamethasone, used as positive control, which inhibited croton oil-induced ear edema in 89 ± 3% (Fig. 1A).

3.1.2. MPO enzyme activity

MPO is a marker of polymorphonuclear leukocytes and its activity is directly related to the amount of neutrophil infiltration, which is indicative of an inflammatory reaction (Suzuki et al., 1983). In order to verify the effects of the extract on croton oil-induced neutrophil infiltration, MPO activity was assessed. Croton oil caused an increase in MPO activity when compared with the vehicle (acetone), and the application of the extract from *S. corymbiflorum* (0.00001, 0.01 and 1 mg/ear in acetone) promoted a dose-dependent inhibition of MPO activity with a maximum

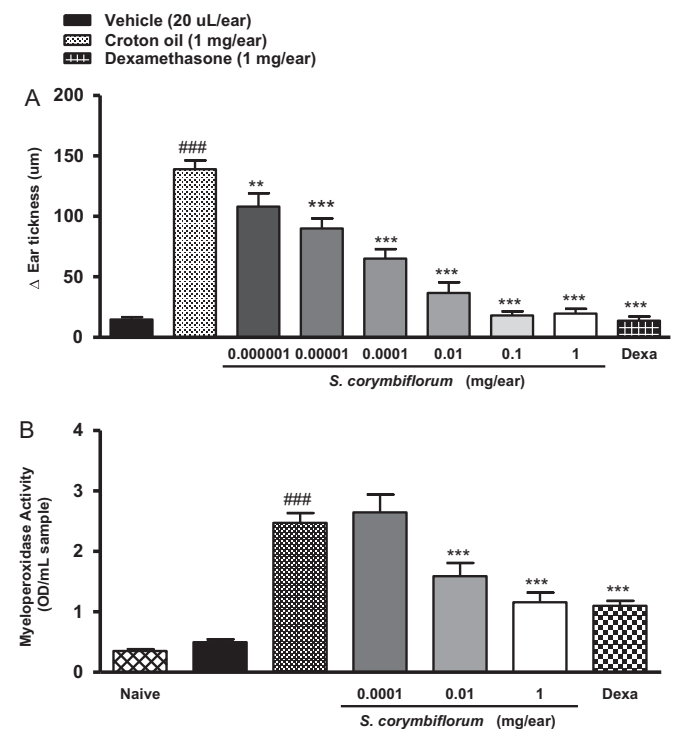


Fig. 1. Effect of the extract of *S. corymbiflorum* leaves and dexamethasone (Dexa) administered topically on inflammatory parameters croton oil-induced. Ear edema (A) and MPO activity (OD/mL sample) (B) of the ear tissue of mice 6 h after croton oil or croton oil plus treatments. Each bar represent the mean ± S.E.M ($n = 5-7$); ### $P < 0.05$ when compared with the vehicle (A) and naïve (B) group. ** $P < 0.05$ and *** $P < 0.01$ when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman–Keuls test).

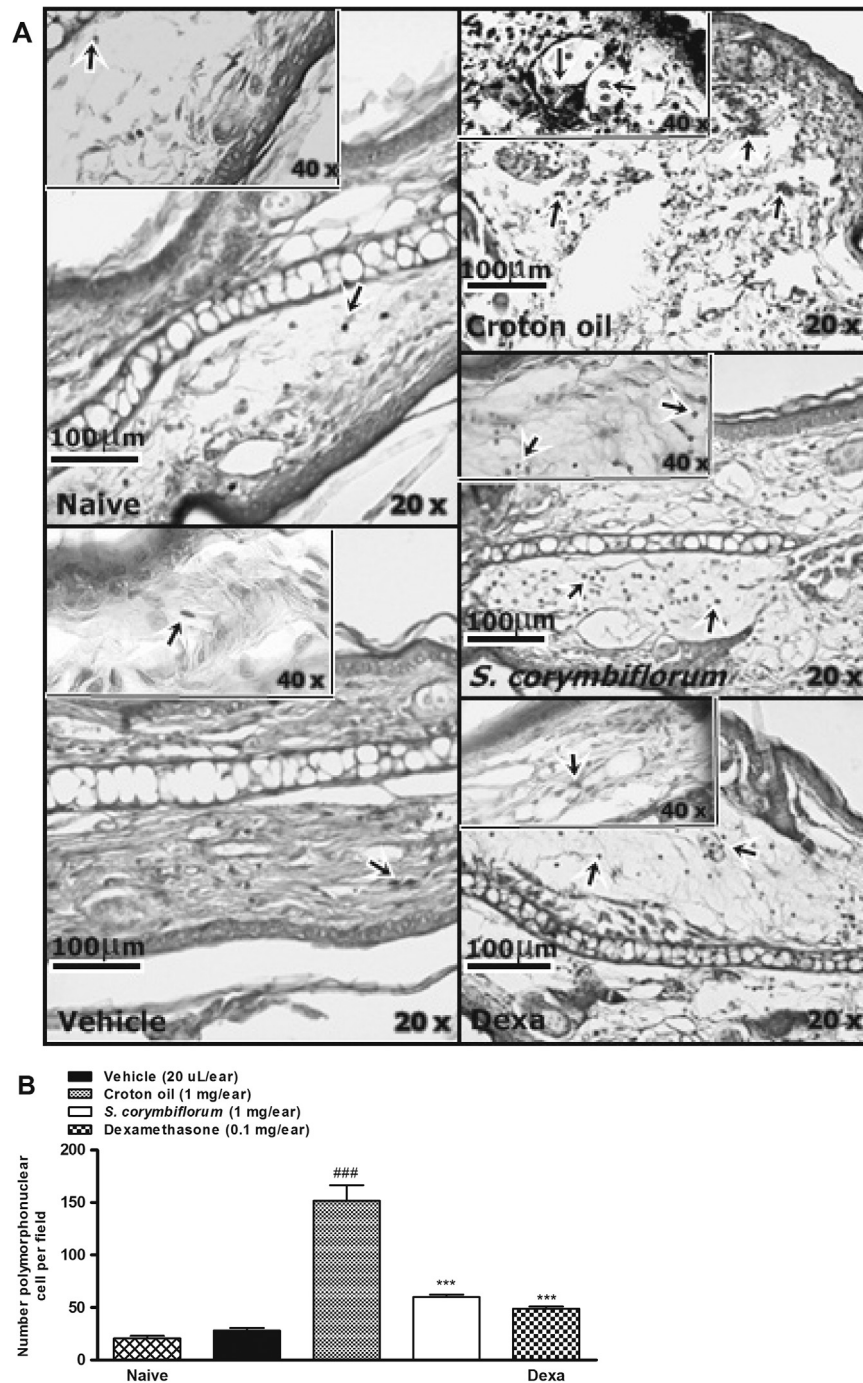


Fig. 2. Effect of the extract of *S. corymbiflorum* leaves and dexamethasone (Dexa) administered topically on cell infiltration croton oil-induced. Ear representative light microphotograph (A arrows indicate polymorphonuclear cells) and quantification of polymorphonuclear cells per field (B) of the ear tissue of mice 6 h after croton oil or croton oil plus treatments. Each bar represent the mean + S.E.M ($n=5-7$); $###P < 0.05$ when compared with the vehicle group. $***P < 0.01$ when compared with the croton oil group (one-way ANOVA followed by post hoc Newman–Keuls test).

inhibition of $45 \pm 7\%$ ($1000 \mu\text{g}/\text{ear}$). Moreover, the positive control dexamethasone also reduced the MPO activity with a maximum inhibition of $50 \pm 3\%$ (Fig. 1B).

3.1.3. Histological assessment of ear tissue

Once we observed an increase in the leukocyte infiltration by the measurement of the MPO (marker for neutrophil) enzyme activity, we carried out histological analysis to confirm the cell infiltration. We observed that the single topical application of croton oil (151.5 ± 14.9 polymorphonuclear cells per field) promoted intense leukocyte infiltration when compared with the

naïve (20.5 ± 2.5 polymorphonuclear cells per field) or vehicle (28 ± 2.5 polymorphonuclear cells per field) groups. The topical application of *S. corymbiflorum* ($1 \text{ mg}/\text{ear}$; 60 ± 2.4 polymorphonuclear cells per field) and the positive control, dexamethasone ($0.1 \text{ mg}/\text{ear}$; 49 ± 2.1 polymorphonuclear cells per field) decreased the cell infiltration when compared to croton oil group (151.5 ± 14.9 polymorphonuclear cells per field) (Fig. 2A and B).

3.2. Phytochemical analysis

The yield of the extract was 7.82% (w/w). The results of the

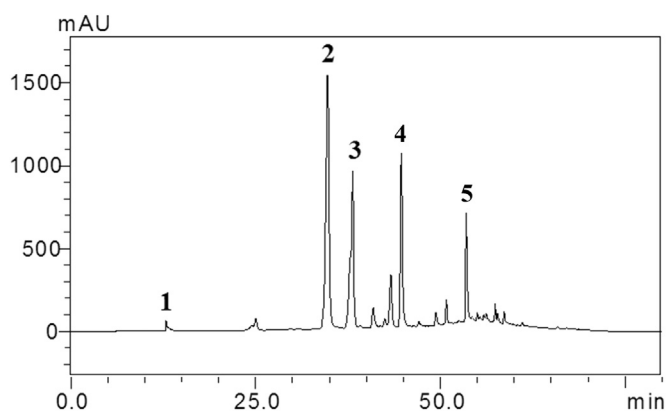


Fig. 3. Chromatogram of the extract of *S. Corymbiflorum* leaves. 1 correspond to gallic acid peak, 2 chlorogenic acid, 3 caffeic acid, 4 rosmarinic acid and 5 rutin.

phytochemical analysis revealed the presence of polyphenols (195.28 ± 0.57 mg GAE/g), flavonoids (69.94 ± 0.36 mg RE/g) and alkaloids (14.44 ± 0.79 mg/g) as active constituents of the extract. HPLC analysis showed high amount of phenolic compounds (Fig. 3) such as chlorogenic acid (59.27 ± 0.83 mg/g), caffeic acid (38.85 ± 0.82 mg/g), rosmarinic acid (40.52 ± 0.67 mg/g), gallic acid (0.77 ± 0.05 mg/g) and rutin (12.72 ± 0.08 mg/g).

3.3. Antioxidant activity

The extract of *S. corymbiflorum* leaves showed good results in the DPPH test which is reported method of antioxidant capacity screening. The SC_{50} value to extract was 23.94 ± 0.33 μ g/mL, similar to ascorbic acid and quercetin standards, which present SC_{50} value of 16.57 ± 0.78 μ g/mL and 14.79 ± 0.81 μ g/mL, respectively.

Another important question evaluated is action of reactive species on proteins, which has been demonstrated by increase of the formation of carbonyl groups (Zadra et al., 2012). Here, we demonstrated that the extract decrease the protein carbonyl levels when incubated with human blood serum ($SC_{50} = 54.79 \pm 0.67$ μ g/mL). Similarly, quercetin ($SC_{50} = 84.86 \pm 0.76$ μ g/mL) and ascorbic acid ($SC_{50} = 38.20 \pm 0.94$ μ g/mL) standards also decrease the protein carbonyl levels. The extract was more potent in reducing the protein carbonyl levels than quercetin but presented a lower potency than ascorbic acid.

4. Discussion

Traditionally, *S. corymbiflorum* leaves are empirically used in folk medicine to treat skin inflammatory disorders. Here, we demonstrated, by first time, the anti-inflammatory activity of the extract of *S. corymbiflorum* leaves, confirming its traditional use in inflammatory process of skin. This anti-inflammatory effect may be related to its antioxidant activity.

The extract of *S. corymbiflorum* leaves was able to reduce the ear edema and the inflammatory cell infiltration in a contact dermatitis model induced by croton oil. These results indicate that the anti-edematogenic activity presented by extract of *S. corymbiflorum* is related to reduction of inflammatory cells infiltration. These results are in according to other studies carried out with other *Solanum* species which presented anti-inflammatory activity, among them are *Solanum nigrum* (Elango et al., 2012), *Solanum lycopersicum* (Li et al., 2014) and *Solanum trilobatum* (Emmanuel et al., 2006). HPLC analysis demonstrated the presence of four phenolic acids (chlorogenic acid which is present in high amount-59.27 mg/g, rosmarinic acid, caffeic acid and gallic acid all presents in small quantities) and of the flavonoid rutin which is

found in considerable amount (12.72 mg/g). Additionally, previous studies showed that chlorogenic acid found in the eggplant of *Solanum aethiopicum* and *Solanum macrocarpon* are correlated with its anti-inflammatory activity (Plazas et al., 2014). Moreover, the chlorogenic acid content was also associated with the inhibition of nitric oxide synthesis, which is a free radical involved in many physiological processes in the human body including inflammatory diseases. Dos Santos et al. (2006) demonstrated that chlorogenic acid presents anti-edematogenic activity probably due the inhibitory action on release of inflammatory mediators such as tumor necrosis factor α and nitric oxide. Furthermore, *S. corymbiflorum* presents high amounts of phenolic compounds and considerable amount of flavonoids, which exhibit a wide range of biological effects, among them the anti-inflammatory activity (García-Lafuente et al., 2014). Addition of phenolic compounds present anti-inflammatory activity, Piana et al. (2013) showed that the flavonoid rutin, also found in the extract of *S. corymbiflorum* leaves, contributed largely in the anti-inflammatory activity of *Viola tricolor* flower.

Several studies have reported that besides polyphenols and flavonoids, the alkaloids are also related to anti-inflammatory activity of species of the same genus as the study of Aboyade et al. (2010) with *Solanum aculeastrum*. So, it is possible that the alkaloids also contribute to anti-inflammatory activity of *S. corymbiflorum* leaves.

The extract inhibited the DPPH radical *in vitro* and decreased the protein carbonyl levels demonstrating the antioxidant potential of this species. However, the result was not the same for the oxidation of DCFH-DA and TBARS assays. It is probable that these different activities were due the distinct mechanisms involved in the steps of the oxidation process (Pacheco et al., 2014).

5. Conclusion

In this study was verified that the extract of *S. corymbiflorum* leaves showed anti-edematogenic and anti-inflammatory activity in a contact dermatitis model croton oil-induced, confirming their popular use for the local treatment of skin inflammatory diseases. These results may be associated to high amount of phenolic compounds as chlorogenic acid and rutin quantified by HPLC.

Acknowledgments

The authors would like to thank Margareth Linde Athayde for advice and Renato Zacchia (Botanical Department of Federal University of Santa Maria, 13159) for providing the identification of *S. corymbiflorum*. The authors thanks the financial support of CNPq/CAPES/FAPERGS (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul) /Brazil.

References

- Aboyade, O.M., et al., 2010. Comparative studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of the aqueous extracts from fresh, dried and boiled berries of *Solanum aculeastrum* Dunal. Afr. J. Biotechnol. 9, 3011–3015.
- Chandra, S., Mejia, E.G., 2004. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinine reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. J. Agric. Food Chem. 52, 3583–3589.
- Choi, C.W., et al., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant Sci. 163, 1161–1168.
- Conforti, F., et al., 2008. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. J. Ethnopharmacol. 116, 144–151.

- da Cunha, F.M., et al., 2001. Additional evidence for the anti-inflammatory and anti-allergic properties of the sesquiterpene polygodial. *Life Sci.* 70, 159–169.
- Dos Santos, M.D., et al., 2006. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 2236–2240.
- Elango, V., et al., 2012. Anti-inflammatory activity of the flower extracts of *Solanum nigrum* in Rats. *Hygeia J. Drugs Med.* 4, 59–62.
- Emmanuel, S., et al., 2006. Antiinflammatory activity of *Solanum trilobatum*. *Fito-terapia* 77, 611–612.
- García-Lafuente, A., et al., 2014. In vitro anti-inflammatory activity of phenolic rich extracts from white and red common beans. *Food Chem.* 161, 216–223.
- Keller, H.A., Prance, G.T., 2012. Etnobotánica de las especies de *solanum*, subgénero *bassovia*, sección *pachyphylla*1 (solanaceae) de Misiones, Argentina. *Bonplandia* 21, 45–54.
- Krishnaiah, D., et al., 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod. Process.* 89, 217–233.
- Li, H., et al., 2014. Bioaccessibility, in vitro antioxidant activities and in vivo anti-inflammatory activities of a purple tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Food Chem.* 159, 353–360.
- Morabito, F., et al., 2004. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediat. Inflamm.* 13, 381–383.
- Nijveldt, R.J., et al., 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.
- Oliveira, S.M., et al., 2014. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A *Celecoxib* structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 124, 396–404.
- Pacheco, N.R., et al., 2014. *Cecropia pachystachya*: A species with expressive in vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant effects. *Biomed. Res. Int.* <http://dx.doi.org/10.1155/2014/301294>
- Piana, M., et al., 2013. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *J. Ethnopharmacol.* 150, 458–465.
- Plazas, M., et al., 2014. Reducing Capacity, chlorogenic acid content and biological activity in a collection of scarlet (*Solanum aethiopicum*) and gboma (*S. macrocarpon*) eggplants. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 17221–17241.
- Silva, C.R., et al., 2011. The involvement of TRPA1 channel activation in the inflammatory response evoked by topical application of cinnamaldehyde to mice. *Life Sci.* 88, 1077–1087.
- Soares, E.L.C., Mentz, L.A., 2006. As espécies de *solanum* subgénero *bassovia* seção *pachyphylla* (= *cyphomandra* mart. ex sendtn.-solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesqui. Botânica* 57, 231–254.
- Sreevidya, N., Mehrotra, S., 2003. Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *J. AOAC Int.* 86, 1124–1127.
- Suzuki, K., et al., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* 132, 345–352.
- Woisky, R.G., Salatino, A., 1998. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apic. Res.* 37, 99–105.
- Zadra, M., et al., 2012. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* 17, 12560–12574.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guide lines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.

5. DISCUSSÃO GERAL

A fitoterapia constitui uma forma de tratamento que vem crescendo visivelmente ao longo dos anos e o principal fator que contribui consideravelmente nesse crescimento é a evolução das pesquisas científicas, principalmente dos estudos químicos e farmacológicos que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais empregadas na medicina popular (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; BELLIK et al. 2012).

O conhecimento das propriedades medicinais das plantas é uma das maiores riquezas da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração. Vivendo em permanente contato com a natureza, as tribos estão habituadas a estabelecer relações de semelhança entre as características de certas substâncias naturais e o seu próprio corpo. Adquirindo conhecimento sobre a flora medicinal que é utilizada de diferentes formas, por isso, sobretudo no Brasil, os índios foram e são os principais responsáveis pela descoberta da utilização de plantas para fins curativos (ROCHA; ROCHA, 2006).

As folhas e os frutos da espécie *S. corymbiflorum* foram avaliados quanto à presença de compostos fenólicos, flavonoides, taninos condensados e alcaloides. O EB das folhas apresentou quantidade superior de compostos fenólicos e flavonoides (195,28 mg GAE/g e 69,94 mg RE/g, respectivamente) em relação as frações tanto das folhas quanto dos frutos. Estes compostos são conhecidamente antioxidantes e por isso atuam evitando dano oxidativo em células por meio de mecanismos que permitam que eles atuem como agentes redutores, doadores de hidrogênio, sequestrantes de oxigênio singleto e quelantes de metais (OH et al., 2013).

Pesquisas realizadas por Oliveira et al. (2013) relacionaram a quantidade de polifenóis com a capacidade antioxidante em diversos extratos das folhas, frutos e cascas de *Solanum melongena*. Nesse mesmo estudo, assim como os resultados apresentados pela *S. corymbiflorum*, os extratos das folhas da *S. melongena* apresentaram quantidade superior de compostos fenólicos comparado aos dos frutos.

Nos diferentes ensaios utilizados para avaliar a atividade antioxidante, foram utilizados valores de IC₅₀ (µg/mL), que correspondem a concentração de EB ou fração que é capaz de reduzir em 50% o radical DPPH no teste da capacidade antioxidante, reduzir em 50% a formação de espécies reativas no ensaio da oxidação da DCFH-DA, reduzir em 50% a peroxidação lipídica no ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e

reduzir essa porcentagem no conteúdo de proteínas carboniladas. Logo, quanto menor o valor de IC₅₀ melhor será a atividade antioxidante do EB ou fração.

Quando avaliamos a capacidade antioxidante do EB e das frações clorofórmica (CHCl₃), acetato de etila (AcOEt) e butanólica (*n*-BuOH) das folhas e dos frutos de *S. corymbiflorum* verificamos que o EB das folhas foi mais potente em inibir o DPPH do que as outras frações, com um IC₅₀ de 23,94 µg/mL. Estes resultados podem ser explicados pela maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides encontrados no EB em relação a essas frações das folhas e dos frutos.

As frações CHCl₃, AcOEt e *n*-BuOH das folhas de *S. corymbiflorum*, resultantes do fracionamento do remanescente aquoso foram menos potentes em inibir o radical DPPH quando comparado ao EB. O processo de fracionamento de extratos é muito utilizado para concentrar moléculas com polaridades próximas ou semelhantes e assim melhorar uma determinada atividade. No entanto, isso não foi verificado no teste mencionado. Provavelmente, ocorreu uma redução do sinergismo entre as moléculas ocasionado pelo fracionamento.

Diversos métodos são utilizados para avaliar a atividade antioxidante de substâncias biologicamente ativas, os quais podem auxiliar na escolha das espécies para futuros estudos químicos e farmacológicos, e também comprovar a presença de substâncias antioxidantes em plantas (ALVES, 2010).

Um método muito utilizado para avaliar o dano oxidativo em células devido à alta sensibilidade é o da diclorofluoresceína (DCFH) utilizando sua forma diacetato. Quando adicionada às células, a DCFH-DA é hidrolisada liberando DCFH que, ao reagir com espécies reativas produzidas pelo metabolismo celular normal, forma o composto fluorescente 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) cuja intensidade pode ser medida em um fluorímetro (ROTA; CHIGNELL; MASON, 1999; BONINI et al., 2006). Assim, na presença de substâncias antioxidantes, essas reagem preferencialmente com as espécies reativas neutralizando-as, resultando em menor formação de DCF e, conseqüentemente, uma menor intensidade da fluorescência é observada.

Observamos em nossos experimentos que somente as frações CHCl₃ das folhas e dos frutos inibiram a oxidação DCFH, com IC₅₀ de 57,55 µg/mL e 136,17 µg/mL, respectivamente. Nossos resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Zadra et al. (2012). Eles avaliaram a capacidade do EB e frações das folhas de *Solanum guaraniticum* de inibir a oxidação DCFH. Entre as amostras avaliadas, a fração CHCl₃ foi capaz de reduzir a oxidação DCFH na maior concentração testada (250 µg/mL).

No ensaio para avaliar a peroxidação lipídica, a fração CHCl₃ das folhas foi mais potente em inibir o dano lipídico (IC₅₀ de 100,73 µg/mL) do que a fração AcOEt das folhas (IC₅₀ de 162,29 µg/mL). Além disso, apenas a fração CHCl₃ dos frutos foi capaz de reduzir a peroxidação lipídica (IC₅₀ de 105,59 µg/mL) indicando melhor atividade antioxidante quando comparado às outras frações.

Nossos resultados estão de acordo com os estudos realizados por Priyadharshini e Sujatha (2013) onde foi verificado que o extrato cetônico das folhas e o extrato metanólico dos caules de *Solanum erianthum* apresentaram bons resultados relacionados à inibição da peroxidação lipídica. Nossos resultados também estão em concordância com a pesquisa realizada por Zadra et al. (2012), onde foi verificado que entre as diferentes frações analisadas de *S. guaraniticum*, a CHCl₃ foi mais efetiva em inibir a peroxidação lipídica, indicando que os flavonoides, taninos condensados e alcaloides podem ter contribuído para a atividade antioxidante da espécie.

O processo de oxidação das proteínas é uma das alterações que conduzem a uma grave redução nas funções biológicas, e até mesmo a morte celular. O EB da espécie estudada mostrou considerável redução no conteúdo de proteínas carboniladas (IC₅₀ de 54,79 µg/mL). Nossos resultados estão de acordo com as pesquisas realizadas por Bahramikia, Ardestani e Yazdanparast (2009), que relacionaram a atividade antioxidante pelo mesmo ensaio, dos extratos de *Teucrium polium*, *Cyperus rotundus*, *Anethum graveolens* e *Nasturtium officinale* ao conteúdo de polifenóis presente nessas espécies.

Em relação a atividade antioxidante, vários testes *in vitro* têm se tornado importantes ferramentas que auxiliam na busca por substâncias bioativas, bem como na seleção de matéria-prima para estudo. Então, devido aos diferentes tipos de radicais livres e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (ALVES et al., 2010).

Uma possível hipótese relacionada à melhor atividade antioxidante da fração CHCl₃ no ensaio da oxidação da DCFH-DA e no ensaio para avaliar a peroxidação lipídica seria o sinergismo ocorrido entre os diferentes compostos presentes nessa fração, polifenóis e alcaloides. Outra hipótese seria uma maior interação dos alcaloides presentes em maior quantidade nessa fração (mais apolar) com o tecido cerebral de ratos (substrato utilizado nos ensaios), uma vez que as membranas celulares são constituídas por uma bicamada de fosfolipídios.

A atividade antioxidante das frações das folhas e dos frutos foi avaliada por três diferentes métodos, logo apresentaram variadas respostas. Para todos os métodos utilizados as frações das folhas apresentaram melhores resultados antioxidantes quando comparado as frações dos frutos. Desta forma, o EB das folhas foi utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória levando em consideração o uso popular descrito por Keller e Prance (2012), e o melhor desempenho no teste de capacidade antioxidante utilizado.

O EB das folhas de *S. corymbiflorum* apresentou considerável atividade anti-edematogênica, avaliada pela redução do edema de orelha induzido por agente irritante com inibição de $87\pm 3\%$ na maior concentração testada ($1000\ \mu\text{g}/\text{orelha}$), em um modelo de dermatite de contato irritante. Este efeito foi semelhante ao efeito provocado pelo glicocorticóide dexametasona ($89\pm 3\%$) que foi utilizado como controle positivo no estudo por ser utilizado clinicamente para o tratamento de várias doenças, inclusive doenças de pele. Além disso, foi verificado que o EB das folhas de *S. corymbiflorum* foi capaz de reduzir a atividade da enzima MPO (marcador da infiltração de neutrófilos) com redução de $45\pm 7\%$ na maior concentração testada, enquanto a dexametasona apresentou uma redução de $50\pm 3\%$. Esses resultados confirmam que a atividade anti-inflamatória apresentada pelo EB das folhas de *S. corymbiflorum* está relacionada à redução da infiltração de células inflamatórias. Possivelmente um dos compostos fenólicos que contribuíram para a atividade antioxidante e anti-inflamatória foi o ácido clorogênico, presente em grande quantidade ($59,27\ \text{mg}/\text{g}$) no EB das folhas.

A avaliação etnofarmacológica da espécie *S. corymbiflorum* foi anteriormente realizada por Keller e Prance (2012). A partir deste estudo, e levando em consideração as análises fitoquímicas, e as atividades antioxidante e anti-inflamatória apresentadas pelos extratos de *S. corymbiflorum*, acreditamos que os extratos das folhas sejam promissores se utilizados para fins terapêuticos. Foi possível verificar que tanto as folhas quanto os frutos de *S. corymbiflorum* possuem atividade antioxidante e que as folhas apresentam atividade anti-inflamatória, confirmando o seu uso popular.

6. CONCLUSÃO

Na análise das principais classes de metabólitos secundários presentes nas folhas de *S. corymbiflorum*, verificou-se que o EB das folhas apresentou maior quantidade de polifenóis e de flavonoides, os taninos condensados estavam presentes apenas nas frações AcOEt e *n*-BuOH e os alcaloides em maior quantidade na fração CHCl₃. Os frutos apresentaram a maior quantidade de polifenóis na fração AcOEt, flavonoides na fração AcOEt e *n*-BuOH, taninos condensados na fração *n*-BuOH e alcaloides na fração CHCl₃.

Em relação à capacidade antioxidante pelo método do DPPH, o EB das folhas se destacou com o menor IC₅₀ e reduziu a oxidação de proteínas no soro, através do ensaio da proteína carboniladas,

A análise por CLAE do EB e das frações das folhas e dos frutos revelou a presença de ácido cafeico, ácido gálico, ácido rosmarínico e rutina, sendo que o ácido clorogênico foi encontrado em maior quantidade no EB das folhas e fração AcOEt dos frutos.

As frações CHCl₃ das folhas e dos frutos apresentaram melhores resultados relacionados à inibição da peroxidação lipídica através do ensaio de TBARS e melhores resultados relacionados à formação de espécies reativas pelo ensaio da oxidação DCFH-DA.

O EB das folhas apresentou atividade anti-inflamatória devido a redução do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e redução da atividade enzima MPO.

O EB das folhas e frações das folhas e frutos de *S. corymbiflorum* possuem diferentes compostos fenólicos, entre eles o ácido clorogênico e a rutina, que são responsáveis, em parte, pela pronunciada atividade antioxidante demonstrada por diferentes métodos. Além disso, o EB das folhas mostrou boa atividade anti-inflamatória em um modelo de dermatite de contato irritante, comprovando o uso popular da espécie. Esses resultados incentivam a realização de novos estudos visando uma avaliação toxicológica da espécie em estudo e isolamento de outros compostos ativos responsáveis pelas atividades descritas.

7. PERSPECTIVAS

Esses resultados incentivam a realização de novos estudos por isso temos como perspectiva:

- Avaliar a possível toxicidade do EB das folhas de *S. corymbiflorum* em ratos;
- Analisar o provável efeito antiúlcera dos seus frutos devido à considerável presença de ácido clorogênico;
- Obter uma fração rica em alcaloides e utilizá-la para avaliar uma provável atividade contra células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S.A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.
- AGRA, M.F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L.R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, n. 3, p. 826-842, 2009.
- AGUILAR-SANTAMARÍA, L. et al. Toxicology, genotoxicity, and cytotoxicity of three extracts of *Solanum chrysotrichum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150 n.1, p. 275-279, 2013.
- ALBUQUERQUE, L.B; VELAZQUEZ, A.; VASCONCELLOS-NETO, J. Composição florística de Solanaceae e Suas síndromes de Polinização e Dispersão de sementes em florestas Mesófilas Neotropicais. **Interciencia**, v. 31, n.11, p. 822-827, 2006.
- ALESSANDRI, A.L. et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacology & therapeutics**, v. 139, n. 2, p. 189-212, 2013.
- ALVES, C.Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMBRIZ-PÉREZ, D.L. et al. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, vol. 2, n. 1, p. 11131412, 2016.
- ANATOLIOTAKIS, N. et al. Myeloperoxidase: expressing inflammation and oxidative stress in cardiovascular disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 115-138, 2013.
- ANOSIKE, C.A.; OBIDOA, O.; EZEANYIKA, L.U. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 76, n. 20, p. 1-7, 2012.
- BAHRAMIKIA, S.; ARDESTANI, A.; YAZDANPARAST, R. Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. **Food Chemistry**, v. 115, n. 1, p. 37-42, 2009.
- BALACHANDRAN, C. et al. Antimicrobial and Antimycobacterial Activities of Methyl Caffate Isolated from *Solanum torvum* Swartz. Fruit. **Indian journal of microbiology**, v. 52, n. 4, p.676-681, 2012.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, W.L.R. et al. Selecting medicinal plants for development of phytomedicine and use in primary health care. **Bioactive Compounds in Phytomedicine**, p. 3-24, 2012.

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

BLANKEMEYER, J.T. et al. Development toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 5, p. 383-389, 1998.

BELLIK, Y. et al. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. **Molecules**, n. 18, v.1, p. 322-353, 2012.

BONINI, M.G. et al. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: A self-fulfilling prophesy? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 968-975, 2006.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução de Diretoria Colegiada N. 14, de 31 de março de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos**. DOU Nº 63, 5 de abril de 2010.

BRUM, T.F. et al. Análise fitoquímica preliminar das folhas de *Vitex megapotamica* (Sprengel) Moldenke. **Saúde**, v. 37, n. 2, p. 57-62, 2011.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação Estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21 n. 1, p. 99 - 105, 1998.

COTINGUIBA, G.G. et al. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 230-237, 2013.

COUTINHO, E.M.O. **Estudo fitoquímico e de atividade biológica de espécies de Solanum (Solanaceae)**. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

DAVIES, M.J. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 48, n. 1, p. 8-19, 2010.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

EISENBERG, D.M. Trends in alternative medicine use in United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. **The Journal of the American Association**, v. 280, n. 18, p.1569-1575, 1998.

EMMANUEL, S. et al. Antiinflammatory activity of *Solanum trilobatum*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 7, p. 611-612, 2006.

FERREIRA, B.I.A.L.S. et al. Dermatites: diagnóstico e terapêutica. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.5, n. 2 p. 22-26, 2014.

FERREIRA, C.F.R.I; ABREU, M.V.R. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-39, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidantes, estresse oxidativo e na biologia do envelhecimento. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, 2000.

FRANGOIANNIS, N.G.; SMITH, C.W.; ENTMAN, M.L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovascular research**, v. 53, n. 1, p. 31-47, 2002.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human diseases: curiosity, cause or consequence? **The Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B. et al. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601-617, 1995.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HAMINIUK, C.I. et al. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023-2044, 2012.

HAN, S. et al. The aqueous extract of *Solanum melongena* inhibits PAR2 agonist-induced inflammation, **Clinica Chimica Acta**, v. 328, n. 1, p. 39-44, 2003.

HENGGE, U.R. et al. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, n. 1, p. 1-15, 2006.

KEAWSA-ARD, S. et al. Anticancer and Antibacterial Activities of the Isolated Compounds from *Solanum spirale* Roxb. Leaves. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 39, n. 3, p. 445-454, 2012.

KELLER, H.A.; PRANCE, G.T. Etnobotánica de las especies de *Solanum*, subgénero *bassovia*, sección *pachyphylla*1 (solanaceae) de Misiones, Argentina. **Bonplandia**, v. 21, n. 1, p. 45-54, 2012.

KELLER, H. A. La doctrina de la signatura en una comunidad Mbya Guaraní de San Pedro, Misiones, Argentina. **Comunicaciones Científicas y Tecnológicas**, Resumen. Universidad Nacional del Nordeste, 2003.

KINUPP, V.F. Plantas alimentícias não convencionais da região metropolitana de Porto Alegre. Tese (Programa de Pós Graduação em Fitotecnia). **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, 2007.

KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. Tomo III. 2 ed. São Paulo: BASF, 2000.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n.3, p. 293-303, 2001.

LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479S-3485S, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**, 2002.

LOVATTO, P.B.; GOETZE, M.; THOMÉ, G.C.H. Efeito de extratos de plantas silvestres da família *solanaceae* sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência rural**, v. 34, n. 4, p. 971-978, 2004.

MAHESHWARI, D.T. et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2422-2428, 2011.

MELO, C.A.F. et al. Karyotype analysis for diploid and polyploid species of the *Solanum* L. **Plant Systematics and Evolution**. v. 293, n. 1-4, p. 227–235, 2011.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771-776, 2010.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, G.O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L. C. (org.) **Plantas Medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Editora UNESP, p. 69-85, 1996.

MOTTA, Antônio A. et al. Dermatite de contato. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 34, n. 3, p. 73-82, 2011.

NDEBIA, E.J.; KAMGANG, R.; NKEH-CHUNGAGANYE, B.N. Analgesic and anti-inflammatory properties of aqueous extract from leaves of *Solanum torvum* (Solanaceae). **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v.4, n. 2, p. 240-244, 2007.

NEGRI, M.G.G. Plants from Solanaceae family with possible anxiolytic effect reported on 19th century's Brazilian medical journal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 4, p. 772-780, 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger princípios da bioquímica, 3 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NUNES. C.R.; ABREU, A.M.O.W. Influência dos radicais livres e envolvimento do processo inflamatório na aterosclerose. **Vértices**, v. 14, n. 3, p. 53-69, 2012.

OH, J. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food**

Control, v. 31, p. 403-409, 2013.

OLIVEIRA, A.M.S., **Determinação do teor de fenóis e sua relação com a atividade antioxidante de *Solanum melongena* L (BERINJELA)**. In IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN. (2013).

PANDURANGAN, A.; KHOSA, R.L.; HEMALATHA, S. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of root extract of *Solanum trilobatum* Linn. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 217-221, 2010.

PASSOS, C.S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 140-149, 2009.

PEREIRA, A.L.F.; VIDAL, T.F.; CONSTANT, P.B.L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. **Journal of Biotechnology**, v.3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PETERS, E.M. et al. Neuropeptide Control Mechanisms in Cutaneous Biology: Physiological and Clinical Significance. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, p. 1937-1947, 2006.

PIANA, M. et al. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150 n. 2, p. 458-465, 2013.

PINTO, F.C.L. et al. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 284-288, 2011.

PRIYADHARSHINI, S.D.; SUJATHA, V. Antioxidant profile and GC-MS analysis of *Solanum erianthum* leaves and stem-a comparison. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 652-658, 2013.

RADAK, Z., et al. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, p. 305- 315, 2011.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem do ensino de farmacognosia. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e do comércio exterior, Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Chá a base de *Cyphomandra corybiflora* Sendtnb para auxiliar no tratamento de cálculos renais. BR n.0700195-9, 18 jan. 2007, 2 set. 2008.

REYES, G.C. et al. Disfunción endotelial y estrés oxidativo. **Revista de Endocrinología y Nutrición**, v. 14, n. 4, p. 233-236, 2006.

ROCHA, G.M.; ROCHA, M.E.D.N. Uso popular de plantas medicinais. **Saúde & Ambiente em Revista**, v.1, n. 2, p.76-85, 2006.

- ROTA, C.; CHIGNELL, C.F.; MASON, R.P. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 7/8, p. 873-881, 1999.
- SACCO, J.C. et al. Ministério da Agricultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). Departamento de Difusão de Tecnologia. **Ervos daninhas do Brasil. Solanaceae I. Gênero *Solanum* L.** 58p. Jaguariúna, SP, 1985.
- SANTOS, M.D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.
- SANTOS, P.M.L. et al. A atividade antioxidante dos extratos de folhas de Jacarandá puberula Cham., Bignoniaceae, uma planta medicinal brasileira usada para depuração do sangue. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 147-53, 2010.
- SILVA, K.N.; AGRA, M.F. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Nicandra physalodes* e *Physalis angulata* (Solanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n. 4, p. 34-351, 2005.
- SILVA, M.J.D. et al. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (Mimosaceae). **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, v. 33, n. 2, p. 267-274, 2012.
- SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS / UFSC, 2010.
- SMITH L. B.; DOWNS R. J. **Solanáceas. Flora ilustrada catarinense**. Itajaí fasc. SOLA. 1966. 321p
- STICKEL, F., PATSENKER, E., SCHUPPAN, D. Herbal hepatotoxicity. **Journal of Hepatology**, v. 43, P. 901-910, 2005.
- SOARES, E.L.C; MENTZ, L.A. As espécies de *Solanum* subgênero *bassovia* seção *pachyphylla* (= *cyphomandra* mart. ex sendtn. - solanaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Pesquisas botânica**, p. 231-254, 2006.
- SOARES, E.L.C.; VIGNOLI-SILVA, M.; MENTZ, L.A. Sinopse taxonômica e chave ilustrada dos gêneros de Solanaceae ocorrentes no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, n. 25, v. 2, p. 346-362, 2011.
- SOARES-MOTA, M.R. et al. Toxicological evaluation of 10 % *Solanum lycocarpum* St Hill fruit consumption in the diet of growing rats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, n. 5, p. 549-53, 2010.
- SPJUT, R.W.; PERDUE JUNIOR, R.E. Plant folklore: a tool for predicting sources of antitumor activity? **Cancer Treatment Reports**, v. 60, n. 8, p. 979-985, 1976.

SUCUPIRA, N.R. et al. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263-269, 2012.

VANHAELEN, M.; LEJOLY, J.; HANOCQ, M. et al. **The Medicinal Plant Industry, USA**, 1991.

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

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A.C.; WEBER, G.E.B. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. 16p. Embrapa clima temperado. Documento 316. Pelotas, RS, 2010.

VORONTSOVA, M.S.; KNAPP, S. A new species of *Solanum* (Solanaceae) from South Africa related to the cultivated eggplant. **PhytoKeys**, n. 8, p.1-11, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines**. A worldwide review, Geneva, 1998.

ZADRA, M. et al. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. **Molecules**, v. 17, p. 12560-12574, 2012

ZAKARIA, Z.A. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic effects of *Solanum nigrum* aqueous extract in animal models. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 81-88, 2009.

ZHANG, R. et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 48, p. 46116-46122, 2002.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO ANIMAIS.

ANEXO B – LICENÇA PARA REUTILIZAÇÃO DO ARTIGO “Topical anti-inflammatory activity of *Solanum corymbiflorum* leaves”.



Santa Maria, 25th March 2015

CERTIFIED

We certify that the Research "Topical antiinflammatory activity of the crude extract Solanum corymbiflorum and Poikilacanthus glandulosus on ear edema induced by croton oil.", protocol number CEUA 5786050215, utilizing 192 Heterogenics mice (192 males), under the responsibility Sara Marchesan De Oliveira, was approved in the meeting of day 03/25/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of Federal University of Santa Maria.

Certificamos que o Projeto intitulado "Atividade anti-inflamatória tópica do extrato bruto de Solanum corymbiflorum e Poikilacanthus glandulosus sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.", protocolado sob o CEUA nº 5786050215, utilizando 192 Camundongos heterogênicos (192 machos), sob a responsabilidade de Sara Marchesan De Oliveira, foi aprovado na reunião de 25/03/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria.

yours faithfully,

Vânia Lucia Loro

Coordinator of the Ethics Committe on Animal Use
Federal University of Santa Maria



RightsLink®

[Home](#)
[Account Info](#)
[Help](#)


Title: Topical anti-inflammatory activity of Solanum corymbiflorum leaves

Logged in as:
Mariana Piana

Author: Mariana Piana, Camila Camponogara, Aline Augusti Boligon, Michel Mansur Machado, Thiele Faccim de Brum, Sara Marchesan Oliveira, Liliane de Freitas Bauermann

[LOGOUT](#)

Publication: Journal of Ethnopharmacology

Publisher: Elsevier

Date: 17 February 2016

Copyright © 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Order Completed

Thank you for your order.

This Agreement between Mariana Piana ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

Your confirmation email will contain your order number for future reference.

[Printable details.](#)

License Number	4055470792262
License date	Feb 24, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Ethnopharmacology
Licensed Content Title	Topical anti-inflammatory activity of Solanum corymbiflorum leaves
Licensed Content Author	Mariana Piana, Camila Camponogara, Aline Augusti Boligon, Michel Mansur Machado, Thiele Faccim de Brum, Sara Marchesan Oliveira, Liliane de Freitas Bauermann
Licensed Content Date	17 February 2016
Licensed Content Volume	179
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	6
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E ANTI-INFLAMATÓRIA DE Solanum corymbiflorum
Expected completion date	Feb 2017
Estimated size (number of pages)	55
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Mariana Piana Serafim Valandro Santa Maria, 97015631 Brazil Attn: Mariana Piana
Total	0.00 USD

[ORDER MORE](#)

[CLOSE WINDOW](#)

